JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

DISERTAČNÍ PRÁCE

Monitoring výskytu autochtonních kmenů entomopatogenních hub a jejich využití v integrované ochraně rostlin

Autor disertační práce:
Ing. Jan KUBÍČEK

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

České Budějovice
září 2007

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracoval samostatně na základě vlastních zjištění a materiálů uvedených v seznamu literatury.

.....

Ing. Jan KUBÍČEK

v Českých Budějovicích, září 2007

Rád bych poděkoval svému školiteli prof. Ing. Zdeňku Landovi, CSc., za metodické a odborné vedení, podnětné připomínky a cenné praktické rady, které mi poskytoval v průběhu doktorandského studia.

Dále děkuji pracovnicím Katedry rostlinné výroby, Oddělení ochrany rostlin Marii Nýdlové a Olze Divišové za praktickou pomoc a vytváření vhodných pracovních podmínek.

Řešení tématu disertační práce bylo podporováno z následujících grantů:

IG 05/03	–	Polyfaktoriální charakteristika kmenů entomopatogenních hub
FRVŠ 1154/2004	–	Polyfaktoriální charakteristika autochtonních kmenů entomopatogenních hub
IG 05/04	–	Selektivní charakteristika kmenů entomopatogenních hub využívaných v integrované ochraně rostlin
FRVŠ 2909/2005	–	Využití RAPD analýzy pro studium genetické variability autochtonních kmenů entomopatogenních hub izolovaných z jihočeského regionu
Eureka - E!2718	–	Vývoj a využití biopreparátů a organominerálních hnojiv podporujících rozklad organických látek a zvyšujících supresivitu půdy

OBSAH

0. ZKRATKY A POZNÁMKY 1
1. ÚVOD 2
2. CÍL PRÁCE 3
3. LITERÁRNÍ REŠERŠE 3
3.1. Entomopatogenní houby v integrované ochraně rostlin 4
3.2. Houby součástí půdního podsystému 4
3.3. Obecná charakteristika entomopatogenních hub 5
3.3.1. Klasifikace entomopatogenních hub 7
3.3.2. Obecná charakteristika vztahů entomopatogenních hub k hostitelům 7
3.3.3. Vývojový cyklus entomopatogenních hub (Deuteromycotina resp. Mitosporické houby, Hyphomycetes) 10
3.3.4. Nejvýznamnější rody a druhy enotmopatogenních hub (Hyphomycetes, Moniliales) asociovéné s půdním prostředím 14
3.4. Faktory prostředí ovlivňující účinnost a perzistenci entomopatogenních hub 14
3.4.1. Obecný vliv prostředí na vývojový cyklus 14
3.4.2. Relativní vlhkost 15
3.4.3. Teplota 16
3.4.4. UV záření 17
3.4.5. Půdní abiotické a biotické faktory 18
3.5. Metody izolace entomopatogenních hub z půdy 19
3.5.1. *Galleria* bait method (GBM) (metody živých pastí) 19
3.5.2. Selektivné media 21
3.6. Použití genetických metod při identifikaci izolovaných kmenů entomopatogenních hub 21
3.6.1. Molekulární markery 22
3.6.2. Polymerázová řetězová reakce – PCR (Polymerase Chain Reaction) 22
3.6.3. Fáze PCR reakce 23
3.6.4. RAPD analýza (Random Amplified Polymorphic DNA – polymorfismus náhodně amplifikované DNA) 24
3.7. Mykoinsekticidy v integrované ochraně rostlin 24
3.7.1. Problematika uvádění biopesticidů do praxe 24
3.7.2. Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub (produkce, stabilizace a formulace) 26
4. MATERIÁL A METODIKA 26
4.1. Entomopatogenní houby používané v pokusech 27
4.2. Metody použité při detekci a izolaci entomopatogenních hub z půdy 27
4.2.1. Odběr a skladování půdních vzorků 27
4.2.2. Izolace entomopatogenních hub z půdy pomocí „*Galleria* bait method“ (metoda živých pastí) 28
4.2.2.1. Kontinuální časově synchronizovaný chov zavíječe voskového (*G. mellonella*) 28
4.2.3. Izolace entomopatogenních hub z půdy pomocí selektivního agarizovaného média s fungicidní složkou dodine 29
4.2.4. Purifikace a identifikace entomopatogenních hub 29
4.2.5. Enkapsulace entomopatogenních hub do Na-alginátových pelet 30
4.3. Polyfaktoriální hodnocení entomopatogenních hub 30
4.3.1. Re-aktivace entomopatogenních hub z pelet a příprava konidiové suspenze ... 30

4.3.2. In vitro testy 30
4.3.2.1. Standardní test klíčivosti – GI (Germination Index) 30
4.3.2.2. Stanovení radiálního růstu 31
4.3.2.3. Výtěžnost konidií na umělém médiu a/nebo přirozeném živném substrátu 31
4.3.2.4. Submersní kultivace a produkce blastospor 32
4.3.3. In vivo testy 32
4.3.3.1. Standardní laboratorní biotest na larvách molice skleníkové (*Trialeurodes vaporariorum*) – FDGI (Fungus Development and Growth Index) 32
4.3.3.2. Standardní laboratorní biotest na larvách zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) 33
4.3.4. Statistické hodnocení 34
4.4. Stanovení genetické variability kmenů entomopatogenních hub pomocí RAPD analýzy 34
4.4.1. Extrakce DNA 34
4.4.2. RAPD analýza 35
4.4.3. Digitální obrazová analýza gelů a hodnocení dat 35
4.4.4. Clusterová analýza 35
4.4.5. Statistické zpracování dat 35
4.5. Předaplikační studie 36
4.5.1. Hodnocení kompatibility kmenů entomopatogenních hub s organominerálním hnojivem Beta-liq 36
4.5.2. Hodnocení životaschopnosti kmenů entomopatogenních hub po krátkodobém zamražení 36
4.5.3. Produkce biomasy infekčních propagulí entomopatogenních hub a jejich úprava 36
4.6. Lokalita odběru půdních vzorků a způsob aplikace entomopatogenních hub na pokusné lokalitě 37
4.7. Základní přístrojové vybavení použité v pokusech 39
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY 40
5.1. Monitoring přirozeného výskytu vláknitých entomopatogenních hub (Deuteromycotina resp. Mitosporické houby, Hyphomycetes, Moniliales) v půdě 40
5.1.1. Plošný monitoring přirozeného výskytu vláknitých entomopatogenních hub v půdě na území jihočeského regionu 40
5.1.2. Monitoring přirozeného výskytu entomopatogenních hub v půdě na pokusné lokalitě Smržice a VÚP Troubsko 49
5.1.3. Monitoring přirozeného rozšíření entomopatogenních hub na orné půdě zemědělského podniku UNIAGRIS Pěnčín s.r.o. před a po záměrné velkoplošné aplikaci vláknitých hub 50
5.2. Polyfaktoriální charakteristika izolovaných kmenů entomopatogenních hub z půdy 53
5.2.1. Hodnocení kmenů entomopatogenních hub izolovaných z půdy v jihočeském regionu pomocí „in vitro“ testů 53
5.2.2. Standardní laboratorní biotest na larvách zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) 57
5.2.2.1. Stanovení optimální délky (bio)testu pro jednorázové vyhodnocení rychlosti vývoje entomopatogenní houby *B. bassiana* na larvách zavíječe voskového (*G. mellonella*) 57
5.2.2.2. Hodnocení vývoje kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na larvách zavíječe voskového (*G. mellonella*) po 96 hodinách (bio)testu 59

5.2.3. Polyfaktoriální hodnocení kmenů entomopatogenních hub izolovaných na pokusné lokalitě VÚP Troubsko 61
5.3. Využití RAPD analýzy pro hodnocení genetické variability na vybrané sadě kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* izolovaných z jihočeského regionu 66
5.4. Předaplikační studie 69
5.4.1. Hodnocení kompatibility a produkčních charakteristik kmenů entomopatogenních hub v kombinaci s organominerálním hnojivem Beta-liq 69
5.4.2. Hodnocení životaschopnosti vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* a *M. anisopliae* po krátkodobém zamražení 79
5.4.3. Demonstrace použití RAPD analýzy pro rozlišení kmene entomopatogenní houby *B. bassiana* 80
5.4.4. Produkce biomasy infekčních propagulí vybraných kmenů entomopatogenních hub a její úprava 81
5.5. Persistence entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* po záměrné introdukci do půdy na pokusné lokalitě Žabčice u Brna 85
5.5.1. Vstupní monitoring entomopatogenních hub na pokusné lokalitě Žabčice u Brna realizovaný před aplikací kmene M062 (*B. bassiana*) 85
5.5.2. První monitoring entomopatogenních hub na pokusné lokalitě MZLU v Žabčicích u Brna, 7 týdnů od cílené introdukce kmene M062 (*B. bassiana*) 86
5.5.3. Hodnocení morfologické variability mezi introdukovaným kmenem M062, původními a re-izolovanými kmeny entomopatogenní houby *B. bassiana* 87
5.5.4. Hodnocení variability mezi původními a re-izolovanými kmeny entomopatogenní houby *B. bassiana* pomocí molekulárně genetické RAPD analýzy 93
5.5.5. Druhý monitoring entomopatogenních hub na pokusné lokalitě MZLU v Žabčicích u Brna, 8 měsíců od cílené introdukce kmene M062 (*B. bassiana*) 96
5.5.6. Hodnocení variability mezi původními a re-izolovanými kmeny entomopatogenní houby *B. bassiana* pomocí molekulárně genetické RAPD analýzy 97
6. DISKUZE 100
7. ZÁVĚRY 117
8. SEZNAM LITERATURY 120
9. SUMMARY 137
10. SEZNAM PŘÍLOH A PŘÍLOHY 139

ZKRATKY A POZNÁMKY

ZKRATKA	NÁZEV
Bba	*Beauveria bassiana*
CB	České Budějovice
CFU	Colony Forming Unit
CK	Český Krumlov
DOD	Viz. SM a.i. dodine
GBM	*Galleria* bait method
IOR	Integrovaná ochrana rostlin
JH	Jindřichův Hradec
L.spp	*Lecanicillium* spp.
Lle	*Lecanicillium lecanii*
Man	*Metarhizium anisopliae*
Pca	*Paecilomyces carneus*
PDA	Potato Dextrose Agar (agarizovaná bramborovo-dextrózová půda)
PDB	Potato Dextrose Broth (tekutá bramborovo-dextrózová půda)
Pfr	*Paecilomyces fumosoroseus*
PI	Prachatice
Pli	*Paecilomyces lilacinus*
SM a.i. dodine	Selektivní médium s aktivní (fungicidní) složkou dodine
ST	Strakonice
TA	Tábor
1)	Index GI (2,5 – 3,0) bylo možné použít pouze u druhů entomopatogenních hub, které mohou realizovat celý vývojový cyklus na umělé živné půdě (např. *Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae, Paecilomyces fumosoroseus, Lecanicillium lecanii*)
2)	Larva se nepohybuje, ale je zřejmý pohyb hřbetní cévy nebo reakce larvy na podráždění např. štětečkem
3)	Pokud byl stejný druh entomopatogenní houby detekován pomocí obou izolačních technik byl přednostně uložen kmen izolovaný pomocí *Galleria* bait method (GBM) ve sbírce kmenů katedry rostlinné výroby ZF JU v Českých Budějovicích pod označením uvedeným v tabulce 5.1.
4)	Výsledky nebylo možné získat vlivem kontaminace
5)	Celkové množství blastospor/ konidií v původní submerzní/ povrchové kultuře
6)	Standardní titr suspenzí používaných při provozních aplikacích
7)	Blastosporový/ konidiový koncentrát získaný odstředěním submerzní/ povrchové kultury
8)	Podíl z původní submerzní/ povrchové kultury (100% = původní suspenze před finalizací odstředěním)

1. ÚVOD

Přechod k tržnímu hospodářství znamenal výrazný tlak na přizpůsobení se zemědělství novým ekonomickým podmínkám a odbytovým možnostem z hlediska jejich rozměru, struktury a výkonnosti. Rozhodujícím kritériem uplatnění zemědělských produktů na trhu je v současné době cena přijatelná pro zákazníka a vysoká kvalita. Vlivem přirozeného vývoje, osvěty a možná i módních trendů je u spotřebitele kladen důraz na zdravotní nezávadnost produkce a způsob její produkce. Tím se zde vytváří de facto nový trh s produkty ekologického zemědělství, který svým růstem vytváří prostor pro alternativu ke konvenčnímu zemědělství.

Na rozdíl od konvenčních nejsou trvale udržitelné zemědělské technologie parametrizovány pouze standardními ekonomickými kritérii (např. náklady), ale i tím, jakým způsobem se podílejí (resp. nepodílejí) na spotřebě neobnovitelných přírodních zdrojů a jak přispívají k ochraně životního prostředí a lidského zdraví. V ochraně rostlin pěstovaných v konvenčních systémech jednoznačně dominují kurativní (reaktivní) aplikace syntetických pesticidů. V současné době, ale již existují teoreticky ucelené a prakticky i ekonomicky konkurenceschopné alternativní strategie, z nichž nejvýznamnější je integrovaná ochrana rostlin (resp. bio-intenzivní IOR), jejímž hlavním cílem je udržení četnosti populací škůdců a frekvence výskytu chorob na tolerovatelné úrovni.

Biologickou ochranu rostlin je možné definovat jako „Záměrné využívání přirozených nepřátel s cílem regulovat populace škůdců, chorob a plevelných rostlin". Ovšem z hlediska velkoplošné biologické ochrany má využití např. parazitoidů nebo predátorů své limitace v masové produkci, na rozdíl od patogenních mikroorganismů, jako jsou např. entomopatogenní houby.

Součástí registrovaných biopreparátů entomopatogenních hub jsou však nepůvodní (exotické) kmeny, které oproti přirozeně se vyskytujícím kmenům nejsou adaptovány na podmínky prostředí dané (agro)biocenózy a pouze opakované vnášení může zaručit žádoucí efekt. Z tohoto důvodu je re-introdukce autochtonních kmenů entomopatogenních hub budoucím řešením, jak předejít ekonomickým ztrátám a při tom nenarušit křehkou rovnováhu v (agro)biocenózách. Nezbytným předpokladem však zůstává legislativní zjednodušení této procedury.

2. CÍL PRÁCE

Disertační práce se zabývala přirozeným výskytem, frekvencí a druhovou diverzitou entomopatogenních hub v půdních podsystémech, polyfaktoriálním hodnocením izolovaných kmenů entomopatogenních hub a perzistencí záměrně introdukovaného kmene (*B. bassiana*) do půdy. Záměrem této disertační práce bylo doplnit mykologickou sbírku Katedry rostlinné výroby ZF JU v Českých Budějovicích o nové typové kultury kmenů entomopatogenních hub a jejich charakteristiky a dále metodicky přispět k využití těchto přirozených regulačních mikroorganismů v systémech integrované ochrany rostlin.

Jednotlivé dílčí cíle disertační práce:

- Realizovat plošný monitoring přirozeného výskytu entomopatogenních hub v půdě se zaměřením na obiloviny.
- Stanovit druhovou diverzitu a četnost výskytu entomopatogenních hub na jednotlivých pokusných stanovištích pomocí vstupního a popř. opakovaného monitoringu.
- Polyfaktoriálně charakterizovat izolované kmeny entomopatogenních hub pomocí „in vitro" a „in vivo" (bio)testů a na základě těchto hodnotících parametrů vybrat kmen(y) s optimálními růstovými, produkčními a biologickými vlastnostmi pro potřeby následných studií.
- Zhodnotit přípravek BETA-LIQ® (REDAM, Smržice s.r.o.) jako vhodný „nosič" entomopatogenních hub při jejich záměrné introdukci do půdy
- Realizovat modelovou studii zahrnující všechny předešlé kroky s cílem stanovit perzistenci selektovaného kmene entomopatogenní houby po jeho záměrné introdukci do půdy za pomoci molekulární metody RAPD.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. Entomopatogenní houby v integrované ochraně rostlin

Základní principy integrované ochrany rostlin (IOR) byly definovány na počátku 60. let minulého století jako teoretická a praktická alternativa vůči explozivnímu nárůstu spotřeby a globální aplikaci syntetických pesticidů, zejména nové generace organických insekticidů (Landa 2002). Vedle termínu IOR se v posledních letech běžně užívá také anglický termín IPM (Integrated Pest Management), termín zavedl v roce 1972 v USA Výbor pro ochranu životního prostředí (Hrdý et al. 1991). Klasická definice FAO z roku 1967 charakterizuje integrovanou ochranu rostlin jako „*Komplexní systém, opatření zaměřených na regulaci četnosti populací škůdců s ohledem na ekologické, ekonomické, toxikologické a hygienické požadavky, se záměrem udržet četnost populací škůdců na tolerovatelné úrovni, při záměrném preferování a vědomém využívání přirozených metod regulace populací škůdců*“ (Landa 2002). Cuperus et al. (2000) pohlíží na integrovanou ochranu rostlin jako na kombinaci biologických, kulturních, fyzikálních a chemických prostředků jako na způsob minimalizace ekonomických, zdravotních a environmentálních rizik.

Současná definice IOR zvyšuje důraz na záměrné využívání biologických a bio-racionálních metod regulace populací škůdců, jak upozorňuje Landa (2002), což je reakce na skutečnost, že IOR je již zcela běžně zaměňována a prezentována jako „*usměrněná aplikace pesticidů*“ resp. „*cílená chemická ochrana*“.

Metodologickým základem integrované ochrany rostlin proti živočišným škůdcům je přednostní využívání alternativních metod regulace četnosti jejich populací s cílem udržet populace škůdců na tolerovatelné úrovni. Mezi alternativní metody regulace četnosti škůdců patří (Landa 1994):

- *Agrotechnické metody* – zásah do prostředí, ve kterém se populace škůdců vyvíjejí, včetně záměrného využití komplexu vztahů fytofágů k hostitelským rostlinám

- *Fyzikální metody* – záměrná úprava abiotických faktorů

- *Bioracionální metody* – využití látek ovlivňujících vývoj a chování hmyzu (feromony, analogy hormonů hmyzu, inhibitory syntézy chitinu)

- *Genetické metody* – metody ovlivňujících rozmnožování hmyzu a využívající intraspecifické genetické prvky (např. introdukce sterilních samců u monogamních druhů (SIT), vnitrodruhová inkompatibilita, vnášení letálních genů nebo genů se změněnými vlastnostmi do populací apod.)

- *Biologické metody* – využití přirozených nepřátel, tj. parazitů, resp. parazitoidů; predátorů – dravců a patogenních mikroorganizmů.
  Mezi patogeny používané v biologické ochraně rostlin řadíme bakterie, houby, viry, protozoa a nematoda. Každá skupina zahrnuje stovky druhů, které mohou atakovat hmyz. Nicméně pouze některé druhy byly využity v biologické ochraně rostlin (Cuperus et. al 2000).

3.2. Houby součástí půdního podsystému

Půda je základní částí prostředí, kde rostou a vyvíjí se plodiny (Křen et al. 2005) a je patrně jediným přirozeným prostředím, kde jsou všechny podmínky pro rozvoj mikroorganizmů. Proto je půda neobyčejně hojně osídlena mikroorganizmy a prakticky ji můžeme pokládat za jejich základní rezervoár, ze kterého přicházejí do ostatních přirozených prostředí, do vody a do vzduchu (Leittgeb et al. 1988).

Půdní mikroorganizmy jsou živou součástí půdní organické hmoty s krátkou dobou obratu a spolu s odumřelými rostlinnými zbytky tvoří její nestabilní složku. Svou činností zprostředkovávají přeměnu organické hmoty v půdě a současně jsou důležitým zdrojem a zásobárnou živin (Šantrůčková 1993). Jejich rozmístění v půdě je nerovnoměrné. Zvlášť bohatě jsou jimi osídleny povrchové horizonty (do 30 cm) (Leittgeb et al. 1988). Půdní mykoflóra, tj. soubor zástupců různých ekologických skupin hub, které se v půdě vyskytují ve formě spor nebo aktivního vegetativního mycelia, má v půdě velice významné postavení a spolu s bakteriemi, aktimomycetami, půdními řasami tvoří specifickou skupinu půdních mikroorganizmů nazývanou půdní mikroflóra (Řepová 1985). Nejzávažnější význam hub spočívá v jejich intenzivní spoluúčasti na všech rozkladných pochodech i jiných chemických procesech. Tlení a hnití organických látek, jež tvoří nejdůležitější složku, pokud jde o udržení přírodní rovnováhy, je důsledek společného působení bakterií a hlavně hub, jež jako reducenti převádějí nahromaděné organické sloučeniny do formy znova využitelných anorganických sloučenin (Svrček 1997).

Houby jsou polygeneticky rozmanitou skupinou eukaryotických heterotrofních mikroorganizmů, rozmnožujících se buď sexuálně nebo asexuálně (Inglis et al. 2001; Goettel et al. 2000), u nichž během evolučního procesu došlo k vytvoření celé škály adapačních mechanizmů umožňujících přizpůsobit se často velmi různorodém prostředí. Z evolučního hlediska představují polyfyletickou skupinu organizmů, jejíž členové ale plní podobné role v ekosystému, vytvářejí důležité symbiotické vztahy s živočichy a s cévnatými rostlinami a představují převážnou většinu patogenů hospodářsky využívaných rostlin (Bruns et al. 1991).

Entomopatogenní houby jsou unikátními přirozenými obyvateli půdy, kteří byli hodnoceni jako biologické regulační agens pro mnoho půdních škůdců (Krueger, Roberts 1997).

3.3. Obecná charakteristika entomopatogenních hub

Entomopatogenní houby jsou nejdéle známé a nejčastěji determinované entomopatogenní mikroorganizmy asociované s hmyzem, protože jejich růst na povrchu těla různých druhů hostitelů je na rozdíl od ostatních skupin entomopatogenních mikroorganizmů snadno vizuálně patrný (Landa, Oborník 1997). V současnosti je známo přibližně 750 druhů hub zahrnující jak fakultativní, tak i obligátní patogeny hmyzu, vyskytující se v rozmanitém přirozeném prostředí (Tanada, Kaya 1993; McCoy et al. 1988). Entomopatogenní houby mají unikátní schopnost pronikat přes vnější ochranné bariéry hostitele. Endoparazitický status entomopatogenních hub je poměrně výjimečný (pouze některé druhy z Mitosporických hub a převážná část zástupců z řádu (*Laboulbeniales*) (Landa, Oborník 1997). Mnoho druhů entomopatogenních hub patřících do tříd Hyphomycetes a Zygomycetes vyvolává primární onemocnění u suchozemského hmyzu, zatímco houby náležející do třídy Chytridiomycetes a Oomycetes napadají převážně hmyz vodní (Butt, Goettel 2000). Hmyzí hostitel je zpravidla infikován sporami nebo konidiemi (Zygomycotina), konidiemi nebo blastosporami (Deuteromycotina resp. Mitosporické houby), zoosporami (Mastigomycotina) a askosporami (Ascomycotina) (Landa, Oborník 1997).

K označení pomocného oddělení Deuteromycotina Inglis et al. (2001) poznamenávají, že mnoho mykologů již neakceptuje Deuteromycota a jeho podskupiny jako oficiální taxonomické seskupení a tyto houby byly dohromady charakteristicky označeny jako „mitosporické houby".

3.3.1. Klasifikace entomopatogenních hub

Z hlediska odlišných revizí se pro klasifikaci entomopatogenních hub nejvíce ujal upravený klasifikační systém Ainswortha (Ainsworth 1973). V tomto klasifikačním systému jsou nejvyššími taxony hub kmeny Myxomycota a Eumycota. Kmen Myxomycota sdružuje houby vytvářející plasmodiální formy. U kmene Eumycota jsou zastoupeny houby, které zpravidla vytvářejí mycelium a netvoří formy plasmodiální. Všechny entomopatogenní houby patří do Eumycota, kde jsou zastoupeny v podkmenech Mastigomycotina (Chytridiomycetes, Blastocladiales); Zygomycotina (Zygomycetes: Entomophthorales, Mucorales); Ascomycotin (Pyrenomycetes: Spaeriales, Laboulbeniales) a Deuteromycotina resp. Mitosporcké houby (Hyphomycetes: Moniliales) (Ainsworth 1973; McCoy et al. 1988; Samson et al. 1988).

Termín entomopatogenní zahrnuje všechny typy asociací mezi hmyzem a houbami zapříčiňující onemocnění hmyzu. Entomopatogenní houby jsou součástí mnoha taxonomických skupin v říši hub (Charnley 1997). Nejznámějším zástupcem podkmene Mastigomycotina je rod *Coelomomyces.* Zahrnuje vodní druhy (produkující zoospory) obligátně parazitující na moskytech a ostatních *Diptera* (Charnley 1997; Goettel et al. 2000). Další velmi významnou skupinu hub tvoří druhy náležející do řádu Entomophthorales. Entomopatogenní houby zastoupené v tomto řádu (např. houby patřící do rodů *Conidiobolus, Entomophaga, Entomophthora, Erynia, Neozygites* a další) reprezentují obligátně parazitické druhy, jejichž vývojový cyklus je vázán výhradně na živého hostitele. Biotrofní charakter v podstatě znemožňuje praktické využívání těchto hub. Převážnou většinu hub z řádu Entomophthorales je možno produkovat pouze v „in vivo" systémech na přirozených hostitelích, což prakticky znemožňuje jejich masovou produkci, která je nezbytným předpokladem komercionalizace standardních biopreparátů (Papierok, Hajek 1999; Pell et al. 2001). Velká skupina hub, obsahující mnoho entomopatogenních taxonů, ztratila schopnost produkovat nebo pouze vzácně produkovat sexuální spory. Tato skupina byla tradičně umístěna do vytvořeného oddělení, Deuteromycota, uvnitř uměle vytvořené třídy, Hyphomycetes (Inglis et al. 2001).

Druhy u téměř každého rodu entomopatogenních Hyphomycetes se rozlišují podle morfologie jejich konidií, konidiogenních buněk a podle jejich hostitele (Humber 1997). Nejznámější entomopatogenní rody hub náležející mezi Hyphomycetes jsou *Aspergillus, Beauveria, Culicinomycetes, Hirsutella, Metarhizium, Nomuraea, Paecilomyces Tolypocladium* a *Verticilium*. Několik druhů entomopatogenních hub nicméně vůbec či jen zřídka produkují exogenní konidie. Dva příklady takovýchto hub jsou *Aschersonia* a *Sorosporella* (Inglis et al. 2001).

Přehled klasifikace entomopatogenních hub
(upraveno podle McCoy et al. 1988; Samson et al. 1988)

SUBPHYLUM	CLASSIS	ORDO	GENUS
Mastigomycotina	Chytridiomycetes	Chytridiales	Coclomycidium Myiophagus
	Chytridiomycetes	Blastocladiales	**Coelomomyces**
	Oomycetes	Leganidiales	Leganidium
	Oomycetes (Pozn.: Nově řazeny do říše Chromista)	Saprolegniales	Leptolegnia Couchia
Zygomycotina	Zygomycetes	Mucorales	Sporodiniella
	Zygomycetes	Entomophthorales	**Conidibolus** **Entomophaga** **Entomophthora** **Erynia** Massospora Meristacrium **Neozygites**
Ascomycotina	Hemiascomycetes	Endomycetales	Blastotendrion Metschnikowia Mycoderma Saccharomyces
	Plectomycetes	Ascophaerales	Ascophaera
	Pyrenomycetes	Sphaeriales	**Cordyceps** Torrubiella Nectria **Hypocrella** Calonectria
	Laboulbeniomycetes	Laboulbeniales	Filariomyces Hesperomyces Trenomyces
	Loculoascomycetes	Myriangiales	Myriangum
	Loculoascomycetes	Pleosporales	Podonectria
Deuteromycotina (Mitosporické houby)	Hyphomycetes	Moniliales	Akanthomyces **Aspergillus** **Beauveria** Culicinomyces Engyodontium Fusarium Gibellula **Hirsutella** Hymenostilbe **Metarhizium** **Nomuraea** **Paecilomyces** Parasaria Pleurodemospora Polycephalomyces Pseudogibellula Sorosporella Sporothrix Stilbella **Tolypocladium** **Verticillium**
	Coelomycetes		**Aschersonia** Tetranacrium
Mycelia sterilia			**Aegerita**
Basidiomycotina	Phragmo-basidiomycetes	Septobasidiales	Filobasidiella Septobasidium Uredinella

(zvýrazněný tisk) - rody se zastoupením druhů významných v biologické ochraně rostlin

3.3.2. Obecná charakteristika vztahů entomopatogenních hub k hostitelům

Houbová onemocnění u hmyzu jsou běžným a často se vyskytujícím jevem, který nezřídka může vyvolat epizoocii uvnitř populace hmyzu, kdy dochází k zdecimování celé hmyzí populace (Hajek, St Leger 1994). Entomopatogenní houby jsou unikátní v rámci hmyzích patogenů v tom, že infikují své hostitele přes jejich externí kutikulu, ačkoliv několik málo druhů je schopno infikovat hostitele i přes alimentální kanálek (přirozený tělní otvor) (Boucias et al. 1988). Takovéto specializace v životním cyklu vyžadují mnoho adaptací, jako například schopnost uvolňovat vhodné enzymy (Vilcinskas, Götz 1999). Při porovnání s většinou ostatních typů patogenů, houby mají nejširší hostitelské spektrum v rámci patogenů členovců (Inglis et al. 2001) a jsou asociované s hmyzem, žijícím v různém prostředí zahrnujícím sladkovodní zdroje, půdu, povrch půdy a nad povrchem (Hajek, St. Leger 1994). Můžeme zde nalézt vysoce specifické druhy, které se vyskytují pouze na jednom hostiteli nebo jen na určitém stádiu jednoho hostitele, a zároveň druhy, které napadají celou řadu druhů, rodů, čeledí nebo i vyšších systematických skupin (Weiser 1966). Z toho vyplývá, že parazitická valence entomopatogenních hub se pohybuje v rozmezí od druhové specializace (některé druhy Enthomophthorales) až po širokou polyfagii (Deuteromycotina resp. Mitosporické houby). Většina druhů široce polyfágních entomopatogenních hub (např. *Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae, Paecilomyces fumosoroseus, Paecilomyces farinosus a Verticillium lecanii* a další) (pozn. *Verticillium lecanii* resp. *Lecanicillium lecanii* (Zimmerman) Gams & Zare) může obecně parazitovat na širokém spektru hostitelů. S širokou polyfagií je často spojena tvorba druhově identických, nicméně značně různorodých kmenů (izolátů), které mohou vykazovat i úzkou specializaci (McCoy et al. 1988). Typickým příkladem je tvorba velmi specifických patotypů u polyfágních hub *B. bassiana, M. anisopliae a V. lecanii*, u kterých je hostitelské spektrum kmene výrazně predeterminováno druhem hostitele, z kterého byl konkrétní patotyp izolován (Fargues 1976).

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*) (Weiser 1966; Tanada, Kaya 1993; Landa 2002). Ne všechna vývojová stádia hmyzu mohou být infikována entomopatogenními houbami. V mnoha případech jsou juvenilní stádia hmyzu (larvy, nymfy) více náchylná k infekci než dospělci (Butt, Goettel 2000; Inglis et al. 2001).

V komplexu interakcí, které podmiňují spektra hostitelských druhů, sehrávají 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 (Vilcinskas, Götz 1999).

3.3.3. Vývojový cyklus entomopatogenních hub (Deuteromycotina resp. Mitosporické houby, Hyphomycetes)

Průběh a vznik přirozené infekce je závislý jak na vlastnostech patogena a hostitele, tak i na účinném mechanizmu přenosu infekčních propagulí mezi patogenem a hostitelem. Přenos a následné šíření houbových propagulí je závislé na celé řadě procesů jako je produkce, uvolnění a rozptýlení konidií, jejich perzistence a klíčivost (Hajek, St Leger 1994). Konidie, které vykazují větší perzistenci budou s větší pravděpodobností schopny setkat se s hostitelem a způsobit nákazu (Inglis et al. 2001).

Vývoj každého z druhů entomopatogenních deuteromycet má svá logická specifika, která jsou souhrnem interspecifických vztahů v konkrétním systému „patogen – hostitel".

Nicméně entomopatogenní deuteromycety mají charakter konzervativní skupiny patogenů a na souhrn jejich interakcí s hostiteli lze aplikovat obecný model. Vývoj těchto mykóz na hostitelích lze rozdělit do tří fází, které zahrnují primární interakce mezi patogenem a hostitelem a vývoj patogena od prvého kontaktu s hostitelem (Grafický list 8) do ukončení vývojového cyklu (Landa 1994).

1) Přichycení a klíčení konidií na povrchu kutikuly hostitele

2) Penetrace patogena kutikulou do tělní dutiny hostitele

3) Vývoj patogena až do fáze produkce nových konidií

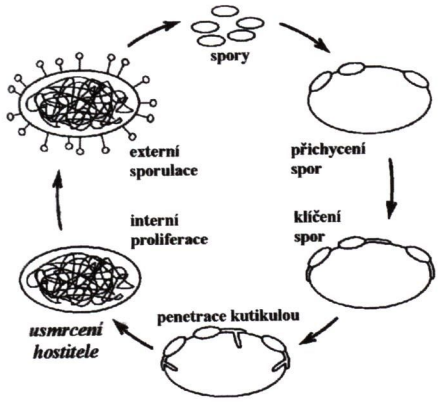


Schéma:
(Landa 2002)

Houbové onemocnění zpravidla iniciují vitální a virulentní konidie uchycené na těle hostitele (Vestergaard et al. 1999). Šíření konidií a mechanizmus zajišťující primární kontakt konidií s hostitelem jsou procesy zpravidla nahodilé, které jsou ve většině případů zprostředkovány pomocí abiotických faktorů (McCoy et al. 1988). Patogen se v prostředí může šířit několika způsoby – aktivním šířením infekčních propagulí (šíření na krátké vzdálenosti), pomocí povětrnostních faktorů (vítr a déšť) nebo pomocí biotických vektorů (šíření na dlouhé vzdálenosti) (Fuxa, Tanada 1987; Roy, Pell 2000). Častým mechanizmem šíření houbových nákaz v populacích hostitele je kontakt zdravých jedinců s jedinci infikovanými nebo tzv. autodiseminace (samošíření), při kterém dochází k šíření nákazy uvnitř populací v souvislosti s vnitropopulačními procesy (McCoy et al. 1988).

Vlastní proces adheze konidie k povrchu těla hostitele je procesem pasivním, ve kterém sehrává klíčovou úlohu povrchová struktura konidií. Konidie některých druhů entomopatogenních deuteromycet jsou pro fázi primárního kontaktu s hostitelem vybaveny želatinovým nebo mucilagenním povrchem (např. *Verticillium lecanii, Aschersonia aleyrodis, Hirsutella thompsonii* aj.) (Tanada, Kaya 1993). Jiné druhy entomopatogenních hub (např. *Beauveria bassiana, Paecilomyces fumosoroseus, Metarhizium anisopliae*) produkují suché, silně hydrofobní konidie s rozmanitě strukturovaným povrchem. Primární adheze takovýchto konidií je zajištěna přímou interakcí mezi dvěma hydrofobními povrchy, prostřednictvím elektrostatických sil, případně i molekulární interakcí mezi látkami, které jsou přítomny na povrchu konidií a kutikuly hostitele (např. hemaglutiny, N-acetylglucosamin, glykoproteiny, steroly, polární lipidy aj.) (Boucias et al. 1988; Sosa-Gomez et al. 1997; Altre et al. 1999; Vestergaard et al. 1999; Malsam et al. 2002).

S adhezí přímo souvisí i klíčení konidií. Aminokyseliny a uhlohydráty obsažené v hmyzí kutikule mohou být důležitým spouštěcím mechanizmem pro klíčení konidií (Smith, Grula, 1981; Woods, Grula 1984). Tyto živiny tak mohou urychlit infekční proces tím, že budou stimulovat klíčení konidií, ale na druhou stranu mohou potenciálně zasahovat do průběhu hmyzí nákazy, jestliže stimulují více vegetativní růst než tvorbu apresorií (Li, Holdom 1995). Význam exogenních živin na povrchu hmyzího hostitele pro stimulaci klíčivosti konidií *B. bassiana* demonstrovali ve své studii Woods, Grula (1984) a Hunt et al. (1984).

Klíčení konidií je první aktivní fází interakce patogena s hostitelem. Většina druhů entomopatogenních deuteromycet 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 externích živinách (Boucias et al. 1988), ale zároveň i na přítomnosti látek inhibiční povahy na povrchu kutikuly hostitele (mastné kyseliny, melanin) (Inglis et al. 2001). Nejdříve dochází k výraznému zvětšení konidie (bobtnání) a pak následuje tvorba primárního klíčku (Boucias et al. 1988). Od určité fáze naklíčení začíná primární klíček sloužit jako penetrující hyfa. V této fázi je již patogen zpravidla závislý na externím zdroji výživy a dochází k využívání látek přítomných v kutikule hostitele (Boucias et al. 1988). Entomopatogenní houby mohou penetrovat kutikulu přímo, příkladem je *Verticillium lecanii* a *Beauveria bassiana* nebo formují apresorium s penetrujícím hrotem (např. *Metarhizium anisopliae*) (Zacharuk 1970 a, b, c). Penetrace přes kutikulu je nejčastější způsob invaze do těla hmyzího hostitele (Ferron 1978), ale vznik infekce byl rovněž zaznamenán přes respirační systém (Clark et al. 1968), zažívací trakt (Miranpuri, Khachatourians 1991) a ústní ústrojí (Siebeneicher et al. 1992). Při penetraci kutikuly uplatňují entomopatogenní houby z třídy Hyphomycetes kombinaci biochemických (enzymy) a fyzikálně mechanických (tlak penetrující hyfy) prvků. Produkce exoproteáz je důležitá při penetraci hmyzí kutikuly houbou *M. anisopliae* a ostatními druhy hub, ale stejně tak se zapojují i ostatní enzymy jako jsou endoproteázy, esterázy, chitinázy a chitobiázy (St Leger et al. 1993). Proteázová a chitinázová aktivita rozhodujícím způsobem podmiňuje patogenitu entomopatogenních hub při invazi do hostitele (St Leger et al.1993). Koncová špička invazní hyfy proniká v enzymaticky narušeném místě penetrace. Častým místem penetrace jsou méně sklerotizované části na povrchu těla (Boucias, Pendland 1984).

Po penetraci hyfy do tělní dutiny hostitele nastupuje parazitická fáze vývoje patogena. V této fázi patogen kolonizuje tělní dutinu hostitele a využívá látky vázané v tělních tkáních (Weiser 1977). Za tímto účelem se u většiny entomopatogenních deuteromycet vytvářejí pučením uvnitř těla různé typy heterogenních tenkostěnných tělísek (blastospory, kvasničná tělíska, hyfální tělíska a fragmenty). Hyfy uvnitř hemocelu hostitele mají jedno či vícebuněčnou strukturu a postrádají klasickou buněčnou stěnu (Ingles et al. 2001). Inch (1988) prokázal, že z blastospor houby *P. fumosoroseus*, které se tvoří během infekce v hemocelu hostitele, je iniciováno zpětné pronikání mycelia na povrch hostitele. Kromě formování uvedených typů tělísek je pro tuto fázi typické i zvýšení 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 mikroorganizmů (sekundární metabolity) (McCoy et al. 1988; Tanada, Kaya 1993). Hmyz může na houbovou infekci odpovědět humorálními (např. fagocytóza, enkapsulace) mechanizmy (Bidochka et al. 1997; Boucias, Pendland 1998), nicméně hyfální tělíska (balstospory) některých druhů hub, jako je např. *Nomuraea rileyi*, se nezdají být fagocytovány hemocyty, a to z důvodu, že blastospory postrádají specificky povrchové látky a proto nemohu být opsonizovány humorálními lectiny, a nebo napodobují povrchové epitopy hmyzích hemocytů (Boucias, Pendland 1998). Z toho vyplývá, že uhynutí hmyzu může být výsledkem kombinace různých faktorů a je způsobeno potravní deficiencí hostitele, invazí patogena do tělních tkání a jejich destrukcí a produkcí toxinů. Např. *B. bassiana* produkuje množství toxických sloučenin zahrnující beauvericin, bassianolide a oosporein. Houba *M. anisopliae* produkuje toxiny, které jsou známy jako destruxiny. Některé z nich jsou známé tím, že způsobují nervovou paralýzu (Dumas et al. 1996), zatímco ostatní mohou mít imunosupresivní účinek (Cerenius et al. 1990). Po uhynutí hostitele začíná saprofytická vývojová fáze, kdy houby produkují různé metabolity (např. houba *B. bassiana a B. brongniartii* produkuje oosporein), které zabraňují v důsledku kompetičního působení kolonizaci odumřelého hostitele ostatními mikroorganizmy (Inglis et al. 2001). V této fázi vytváří většina entomopatogenních deuteromycet myceliální masu uvnitř tělní dutiny hostitele (mumifikace hostitele). Brzy po usmrcení hostitele, pokud jsou

k tomu příznivé podmínky, hyfy prorůstají z těla hostitele a vytvářejí konidiogenní buňky (Ingles et al. 2001), jejichž přítomnost signalizuje počátek poslední části vývojového cyklu patogena – konidiogenezi. V této fázi jsou nejpatrnější morfologické rozdíly mezi jednotlivými druhy entomopatogenních hub (konidiofor – uspořádání konidií, tvar a velikost konidií atd.). Druhy enotompatogeních hub vyskytujících se převážně v půdním prostředí (např. *M. anisopliae, B. bassiana*) zpravidla vytvářejí husté povrchové mycelium tvořené krátkými hyfami a krátké konidiofory, na kterých jsou konidie produkovány v obrovské mase po celém povrchu těla (Tanada, Kaya 1993).

3.3.4. Nejvýznamnější rody a druhy enotmopatogenních hub (Hyphomycetes, Moniliales) asociovéné s půdním prostředím

Beauveria bassiana (Bals.-Criv.) Vuill.

Beauveria bassiana (Bals.-Criv.) Vuill. (Deuteromycotina resp. Mitosporické houby: Hyphomycetes) je kosmopolitně rozšířenou entomopatogenní houbou (Gaugler et al. 1989; Bidochka et al. 1998), která reprezentuje široce polyfágní druh, který se běžně vyskytuje v půdě a parazituje na půdním hmyzu (Vanninen et al. 2000; Keller et al. 2003). Nákazy vyvolané těmito houbami jsou označovány jako „bílé muskardiny" (Weiser 1966; Kumar et al. 1999). Vedle druhu *B. bassiana* bylo popsáno dalších šest druhů hub rodu *Beauveria*, a to *B. brongniartii, B. tenella, B. amorpha, B. vermiconia, B. velata* a *B. caledonica* (Driver, Milner 1998).

Jako biologická alternativa k chemickým insekticidům je houbový patogen *B. bassiana* významně využíván jako mykoinsekticid proti několika hmyzím škůdcům (Castrillo et al. 2004). Tento patogen způsobuje primární onemocnění u více než 100 druhů hmyzu (Hajek, St Leger 1994), ale jen zřídka jsou sledovany epizootie v přirozených populacích hmyzu (Feng et al. 1994). Výskyt na škůdcích kolonizujících výhradně nadzemní části rostlin je velmi řídký (Weiser 1966), což může být dáno i nízkou perzistencí patogena na povrchu listů (Gardner et al. 1977). Gardner et al. (1977) zjistili, že při aplikaci houby *B. basssiana* na listy sóji ve formě vodní suspenze ztrácejí konidie během 5-10 dnů 50 % z jejich počáteční životnosti. Rychlou ztrátu životaschopnosti při aplikaci na listy bramboru (*Soanum tuberosum*) rovněž zaznamenali Storey a Gardner (1987). Nicméně v půdě je houba *B. bassiana* perzistentní až po dobu 2 let (Lingg, Donaldson 1981). Na povrchu infikovaného hostitele *B. bassiana* vytváří husté bílé mycelium (Humber 1997). Vývoj (konidiogeneze) je sympodiální, kdy se vytvářejí jednotlivé konidie na cik-cak strukturách. Konidiogenní buňky jsou lahvovitého tvaru. Konidie jsou hyalinní, kulovitého nebo elipsovitého tvaru (Anonym 3, 2007).

Mnoho kmenů houby *B. bassiana* se vyznačuje i rozdílnou patogenitou k různým přirozeným hostitelům a jejich vývojovým fázím (Fargues, Remaudiere 1977; Poprawski et al. 1985). V sortimentu hostitelů jsou zastoupeni zástupci z řádu rovnokřídlí (např. krtonožky), brouci (např. larvy a kukly chroustů a chroustků, mandelinky bramborové, lalokonosců a mnoho dalších druhů), larvy a kukly motýlů, dvoukřídlého a stejnokřídlého hmyzu (Landa 1998).

B. bassiana se běžně používá k regulaci populací zavíječe kukuřičného (*Ostrinia nubilalis*) (Lepidoptera: Crambidae) (Bruck, Lewis 2002) a kromě toho byl prokázán i endofytický vztah mezi *B. bassiana* a hostitelskou rostlinou (kukuřicí), což znamená, že *B. bassiana* je schopná vyvolat infekci i u larev škodících uvnitř rostliny (Bing, Lewis 1991). Konidie na povrchu listů kukuřice klíčí a prodlužující klíček penetruje do epidermis listu (Wagner, Lewis 2000). Klíčení konidií probíhá bez ohledu na topografické signály na povrchu listu a klíčící hyfa přímo penetruje do rostlinné kutikuly. Houba *B. bassiana* rovněž

způsobovala přirozenou infekci u klíšťat druhů Hyalomma anatlicu a Ixodes ricinus (Costa et al. 2001) a několik studií ukazuje , že *B. bassiana* je běžný patogen vyvolávající onemocnění u hmyzu žijícího na jehličnatých stromech (Doane 1959; Balazy 1965). Při aplikaci háďátek druhu Heterorhabditis bacteriophora a houby *B. bassiana* byla pozorovaná celkově vyšší mortalita larev *Spodoptera exigua* (Lepidoptera, Noctuidae) (Barbercheck, Kaya 1991).

Na hmyzu infikovaném houbou *B. bassiana* je možné pozorovat melanizační skvrny a červený pigment (Vey, Fargues 1977; Ferron 1981). Přítomnost červeného pigmentu je způsobená antibiotikem (oosporein) inhibujícím růst bakterií na substrátu kolonizovaném houbou (Ferron 1981). Kromě toho je oosporein toxický k celé řadě organizmů (Eyal et al. 1994), což může způsobit vyšší mortalitu. Tvorba melanizačních skvrn je způsobena poškozením kutikuly penetrující konidií (Ferron 1981).

Kolonie houby *B. bassiana* vykazovaly maximální tempo růstu na umělém živném médiu v teplotním rozmezí 23 – 25 °C a při vyšší či nižší teplotě se tempo růstu snižovalo (Ferron 1967; Studdert, Kaya 1990). Optimální klíčivost, růst a sporulace houby *B. bassiana* byla zaznamenána při 100 % relativní vzdušné vlhkosti a teplotě 25 – 30 °C (Walstad et al. 1970).

Entomopatogenní houbu *B. bassiana* je možno snadno kultivovat na pevných i v tekutých živných půdách. Pro masovou produkci jsou využívány dvoufázové a submerzní technologie kultivace. Při submerzní kultivaci vzniká často směs bastospor a konidií. Konidie vznikají téměř stejně rychle jako balstospory, ale jsou stálejší (Feng et al. 1994).

Metarhizium anisopliae (Metschn.) Sorok.

M. anisopliae (Metschn.) Sorok., byla poprvé popsána jako entomopatogen asociovaný s vrubounovitými brouky čeledi Scarabeidae, např. *Anisoplia austriaca* Driver et al. (2000). Patří mezi kosmopolitně rozšířené houby s širokým spektrem hostitelů (Leland 2001). Rod *Metarhizium* zahrnuje zástupce (*M. anisopliae, M. flavoviride, M. album a M. brunneum*). Na základě RAPD analýzy mnoha kmenů je v současnosti druh *M. anisopliae* považován za polyfyletický a kmeny náležející do tohoto rodu (druhu) jsou dále děleny do čtyřech poddruhů: *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *majus*, *M. anisopliae* var. *lepidiotum*, *M. anisopliae* var. *acridum* Driver et al. (2000). Například *M. anisopliae* infikuje více než 200 druhů hmyzu a patří mezi běžné zástupce půdní mykoflóry (Bridge et al. 1993; Dromph, Vestergard 2002).

Nákazy vyvolané houbou *M. anisopliae* jsou označovány jako „zelená muskardina", protože infikovaný jedinec porůstá hustým, tmavě zeleným myceliem. Konidiofory jsou větvené, tvořící útvary podobné hustým mnohoramenným svícnům. Na krátkých fialidách vyrůstají dlouhé, tyčinkovité konidie, které vytvářejí kompaktní sloupce (řetízky) (Humber 1997). Vzdušné konidie obsahují na svém povrchu látku ze skupiny monoaminů známou jako hydrophobis, která poskytuje ochranu konidiím v přirozeném prostředí a zvyšuje jejich hydrofobní vlastnosti. Stejná látka je přítomna i na povrchu konidií entomopatogenní houby *B. bassiana* (Bidochka et al. 1995). *M. anisopliae* používá při penetraci hmyzí kutikuly podobně jako většina ostatních druhů entomopatogenních hub kombinaci biochemických (enzymy) a fyzikálně mechanických (mechanický tlak penetrující hyfy) prvků. Nejvýznamnějším kutikulu degradujícím enzymem je subtilisin např. Pr1 (Wang et al. 2002)

Optimální teplota pro většinu kmenů *M. anisopliae* je 25 °C, nicméně teplotní růstový poměr se u jednotlivých kmenů značně liší. Některé kmeny mají široké teplotní rozmezí ležící kolem optima, zatímco u ostatních kmenů je teplotní rozmezí mnohem užší. Při testování 22 kmenů houby *M. anisopliae* se maximální růstový poměr při teplotě 25 °C pohyboval od 2,5 mm do 5,9 mm za den. Většina kmenů rostla v teplotním rozmezí 11 – 35 °C, i když u

několika kmenů byl zaznamenán růst i v teplotním rozmezí 8 – 37 °C. Optimální teplota se pohybovala v rozmezí 25 – 32 °C (Ouedraogo et al. 1997).

Paecilomyces fumosoroseus (Wize) A.H.S.Br. & G. Srn.

P. fumosoroseus (Wize) A.H.S.Br. & G. Sm., náleží do vláknitých entomopatogenních hub (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Rod *Paecilomyces* (*P. fumosoroseus, P. farinosus, P. lilacinus, P. variotii*) reprezentuje široce polyfágní entomofágní, akarifágní a nematofágní druhy hub, které iniciují nákazy na zástupcích z mnoha řádů hmyzu (*Orthoptera, Thysanoptera, Coleoptera, Homoptera, Lepidoptera, Diptera*) (Osborne, Landa 1992; Hoddle 2004), fytofágních roztočích (např. sviluškovití – *Tetranychidae*) (Shi, Feng 2004) a některých druzích háďátek (např. cystotvorná háďátka z rodů *Globodera, Heterodera)* (Franco et al. 1981; Siddiqui, Mahmood 1994).

Patogen byl popisován a evidován pod řadou různých jmen (např. *Isaria fumosoroseus* WIZE, *Sicaria aphodii* Vuill, *Spicaria cossus* Portier a Sartory, *Penicillium hibernicus* Kennelly a Grines, *Penicillium isarioides*, aj.) (Samson, Rombach 1985, Osborne, Landa 1992). Na přirozeném hostiteli i na umělých živných půdách vytváří *P. fumosoroseus* zprvu bílé vatovité kolonie (průměr okolo 4cm za 14 dnů při 25 °C), které později mění barvu od odstínů narůžovělé přes nafialovělou až do šedofialové barvy (Bajan 1973). Změna barvy kolonií přímo koreluje s vývojem 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. Tvorba synnemat je u tohoto druhu častá Humber (1997). Konidiofory se většinou vytvářejí na vzdušných hyfách (Barnett 1962), nesoucí přeslenovitě rozbíhavé (divergentní) větve a konidiogenní buňky (fialidy) (Humber 1997). Konidiogenní phialidy se na koncích konidioforů formují v počtu 3 – 6 fialid /1 konidiofor, na kterých se vytvářejí oválné konidie. Konidie se na koncích philid 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). *P. fumosoroseus* může mít ještě další morfologické stádium (blastospory), tvořící se při kultivaci v submerzní kultuře (tekutá živná půda) (Vidal et al. 1997).

P. fumosoroseus je kosmopolitní široce polyfágní houbový patogen, který byl v přirozených podmínkách nejčastěji izolován ze zástupců z řádu Lepidoptera, Diptera a Coleoptera (Bajan 1973). Infekční cyklus *P. fumosoroseus* je obzvláště rychlý ve srovnání s jinými entomopatogenními houbami. V pokusech bylo dokázáno, že infekční cyklus PFR je o 1 – 3 dny kratší než u *Verticillium lecanii* a o 4 – 7 dní kratší než u *Aschersonia aleyrodis* (Landa, Jiranová 1988).

Teplota vzhledem k r. v. v. je méně limitujícím faktorem. Optimální tempo růstu bylo dosaženo při 20 – 30 °C a růst houby dosahoval 0 – 5,2 mm za den. Vyšší teploty (30 – 40 °C) omezovaly růst více než teploty nižší (8 – 11°C). Výsledky ukázaly částečnou variabilitu týkající se mikroklimatu houbového biotopu. Nejvíce izolátů pochází z Evropy (mírné podnebí), kde se teplotní rozsah pro růst pohybuje od 8 – 30 °C s optimálním tempem růstu při 20 °C, 20 – 25 °C nebo 25 °C. Teplotní rozsah pro izoláty z Jižní Ameriky (vlhké a suché subtropické podnebí) a ze západní Asie (vlhké, tropické podnebí) byl širší (8 – 35 °C)s optimálním růstem při 25 °C, 25 – 28 °C nebo 28 °C. Indické izoláty (monzunové podnebí) vykazovaly nejlepší snášenlivost k vysoké teplotě (32 – 35 °C) (Vidal et al. 1997).

Paecilomyces lilacinus (Thom) Samson

Houba *P. lilacinus* byla opakovaně izolována z larev různého druhu hmyzu. První kmen izolovaný z vajíček půdních háďátek z rodu *Meloidogyne* byl zaznamenán v Peru, ale jak uvádí Jatala (1982), houba je schopná infikovat vajíčka i ostatních druhů půdních nematod, např. *Globodera rostochiensis* WOLLENWEBER, *Heterodera glycines* ICHINOHE. Za určitých okolností může houba *P. lilacinus* způsobit infekci i u pohyblivých vývojových stádií nematod a nebo sedentérních samiček, ale nejvyšší účinnost vykazuje proti vajíčkům (Cabanillas et al. 1989). Kromě toho bylo zjištěno, že *P. lilacinus* je potenciálně využitelné bioagens proti houbě *Rhizoctonia solani*, která je původcem celé řady onemocnění u kulturních rostlin. V podmínkách in vitro se prokázalo, že houba *P. lilacinus* produkuje substance inhibující růst *R. solani* a způsobující morfologické abnormality na hyfách (Jacobs et al. 2003).

Kolonii *P. lilacinus* je možné charakterizovat jako rychle rostoucí, vytvářející chomáčovité mycelium, vínově červené až po fialovou barvu. Konidiofory vztyčené, 400 – 600 μm na délku, příležitostně formovány v trsy až do 2 mm výšky, nesoucí větve s hustě nakupenými fialidami. Konidiofor 3 – 4 μm široké, od žluté do nachové, s hrubým povrchem (tečky). Fialidy se z rozšířené bazální části zužují v úzký krk. Konidie jsou elipsoidní až vřetenovité, hyalinní (2,5 – 3,0 x 2,0 – 2,2 μm) v řetízku (Hoog et al. 2000).

Lecanicillium lecanii (Zimmerman) Gams & Zare (dříve *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas)

Lecanicillium lecanii, revize rodu provedena v roce 2001 (Zare, Gams 2001a,b). *L. lecanii* (Deuteromycotina resp. Mitosporické houby, Hyphomycetes) je kosmopolitně rozšířený druh entomopatogenní houby, který byl poprvé popsán po izolaci z červce *Coccus viridis* (Hall 1976; Hall 1981). *L. lecanii* je velmi dobře známá polyfágní entomopatogenní houba. Spontánní epizootie způsobené tímto patogenem jsou nejčastěji zaznamenány v populacích hmyzu řádu Homoptera, zvláště pak v populacích různých druhů mšic, molic a červců (Hall 1976). Méně časté jsou záznamy týkající se výskytu *L. lecanii* v populacích hostitelů patřících do jiných řádů hmyzu, nicméně v sortimentu hostitelů patogena byly zaznamenáni zástupci řádů *Orthoptera, Heteroptera, Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera* a *Thysanoptera*, z nichž zejména některé druhy třásněnek patří k velmi běžným hostitelům. Spektrum parazitizmu *L. lecanii* však není omezeno pouze na hmyz. Spontánní epizootie způsobené *L. lecanii* byly zjištěny i v populacích některých druhů roztočů (např. *Tetranychus urticae* a vlnovníků z čeledi Eryophidae) (Osborne, Landa 1992). 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*) a na konidiích padlí okurkového *Sphaerotheca fuliginea*. *L. lecanii* je biotrofní parazit, který usmrcuje padlí okurkové po penetraci do hostitelských buněk a následné utilizaci živin (Deacon 1983; Askary et al. 1997).

Hlavní 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. Konidiofory jsou na myceliu umístěny v přeslenech a z jedné zóny protilehle vyrůstají 2, 3 až 4 konidiofory. Na koncích hyf může být přeslen tvořen i více konidiofory. Konidiofory jsou vytvářeny postupně a vždy nová mladší konidie odtlačuje dříve vytvořenou konidii do postupně se tvořícího shluku, který má podobu kuličky. V závěrečné fázi sporulace se kuličky pokrývají mucilagenní hmotou, která udržuje kompaktní tvar finálního útvaru (Hall 1985).

3.4. Faktory prostředí ovlivňující účinnost a perzistenci entomopatogenních hub

3.4.1. Obecný vliv prostředí na vývojový cyklus

Patogenicita je kvalitativní schopnost patogena způsobit onemocnění a je podmíněna řadou faktorů, zahrnující fyziologii hostitele (t.j,. obranné mechanizmy), fyziologii houby (patogenní schopnosti jako produkce enzymů a toxinů) a faktory prostředí (Inglis et al. 2001).

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 fenomény prostředí (složení a pohyb vzduchu, světlo a fotoperioda). Tyto 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 et al. 1993; Inglis et al. 2001). Optimální teplotní zóna aktivity většiny entomopatogenních deuteromycet 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 (Landa 1994).

3.4.2. Relativní vlhkost

Klíčovým faktorem prostřední je vlhkost. Většina konidií entomopatogenních deuteromycet klíčí pouze při r.v.v. vyšší než 90 %, ale přímé smočení konidií ve vodě může klíčivost inhibovat (McCoy at al. 1988). Pro sporulaci je u deuteromycet zvýšený požadavek na r.v.v nad 92,5 % (Walstad et al. 1970). V souhrnu interakcí „patogen - % relativní vzdušná vlhkost" se více prosazuje vliv mikroklimatu než hodnoty zjištěné v makroklimatickém okruhu. V porovnání s ostatními faktory prostředí je vlhkost jednoznačně faktorem nejvýznamnějším (Landa 1994).

Relativní vlhkost je důležitá nejen pro klíčení konidií, ale také pro konidiogenezi na povrchu mrtvého hostitele. Ve všech případech konidiogeneze na povrchu kadaveru vyžaduje vysokou vlhkost (Inglis et al. 2001). Některé druhy hub mohou tolerovat extrémní teploty při vyšší vzdušné vlhkosti nebo při snadné kondenzaci vody, kdy ztráta vody je minimální (McCoy et al. 2002).

Relativní vlhkost může ovlivnit úspěšnost houby různými způsoby. Vlhkost v kombinaci s teplotou ovlivňuje evaporaci, která může vyústit ve ztrátu malých kapének vody a negativně tak ovlivnit průběh nákazy (Roberts, Campbell 1977). Vlhkost může také velmi významně ovlivnit perzistenci houbového inokula (Goettel et al. 2000). To je zjevné především při chladných a suchých podmínkách, kdy konidie většiny entomopatogenních druhů vykazují vyšší stabilitu v prostředí. (Hedgecock et al. 1995). Vliv teploty a vlhkosti spolu velmi úzce koreluje. Některé druhy hub mohou tolerovat extrémní teploty při vyšší vzdušné vlhkosti nebo při snadné kondenzaci vody, kdy ztráta vody je minimální (McCoy et al. 2002). Pro většinu hub je příznivější prostředí suché s nižšími teplotami, avšak některé druhy jako *M. anisopliae* přežívá lépe v prostředí s vyšší relativní vlhkostí a mírnými teplotami (Goettel et al. 2000). Například Fargues and Luz (2000) zjistili, že relativní vlhkost minimálně 97 % byla nezbytná pro produkci konidií *B. bassiana* na mumifikovaném hostiteli *Rhodnius prolixus* a to naznačuje, že vysoká vlhkost je klíčovým klimatickým faktorem ovlivňujícím schopnost dokončení vývojového cyklu *B. bassiana*. Zatímco vysoká vlhkost prostředí je předpokladem pro konidiogenezi na povrchu hostitele, Fernandes et al. (1989)

zjistil, že některé druhy entomopatogenních hub (např. *B. bassiana*) mohou vytvářet v hemocelu hmyzu konidie i v podmínkách nízké vlhkosti.

Předpoklad vlhkosti během klíčení entomopatogenních hub vedl k všeobecnému závěru, že vlhkost je nezbytnou podmínkou pro efektivní využití hub v integrované ochraně rostlin. Toto může být pravdivé pro některé taxony hub, avšak je nepravděpodobné, že všeobecně platí ve všech podmínkách. Mnohé studie naznačují, že suché prostředí během či bezprostředně po aplikaci houbových propagulí má méně škodlivý účinek než se předpokládalo. Například okolní vlhkost neměla vliv na vyvolání onemocnění hmyzu houbou *B. basiana* a *M. anisopliae* (Fargues et al. 1997). Schopnost těchto hub klíčit a infikovat hostitele v podmínkách snížené okolní vlhkosti je přisuzován dostatečné vlhkosti v rámci mikroprostředí (Inglis et al. 2001). Vítr může také významně změnit vlhkost určitého mikroklimatu a velmi tak ovlivnit chování hub (McCoy et al. 2002). Prostředí na povrchu kutikuly živého hostitele zřejmě také ovlivňuje klíčení entomopatogenní houby bez ohledu na relativní vzdušnou vlhkost okolí (Ramoska 1984).

Další studie vlivu relativní vzdušné vlhkosti na infekci hostitele entomopatogenní houbou naznačují, že např. *B. bassiana* a *M. anisopliae* způsobují stejný stupeň infekce u larev *Scolytus scolytus* v rozmezí od 51 – 97,5 (100) %. Ovšem při vyšší vlhkosti byla u sledovaných kmenů v důsledku houbové infekce zaznamenána rychlejší mortalita (Doberski 1981). Z výsledků je zřejmé, že rozmezí relativní vlhkosti pro úspěšnou infekci hostitele je značně široké a to i při nižší relativní vlhkosti (Doberski 1981; Studdert, Kaya 1990), za předpokladu, že koncentrace konidií je dostatečná. Studdert, Kaya (1990) sledovali účinnost houby *B. bassiana* na larvách mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineate*) a zjistili, že celková mortalita ve všech sledovaných vlhkostních režimech (55 %, 75 % a 100 % r.v.v.) byla velmi obdobná. Na základě těchto zjištění lze předpokládat, že nízká relativní vlhkost nezabrání infekci hmyzích hostitelů houbou *B. bassiana*. Ovšem vyšší vlhkost je důležitá pro tvorbu konidioforů na infikovaných jedincích.

Srážky napomáhají k uvolnění propagulí ze substrátů a jejich šíření do prostředí, kde mohu přilnou ke kutikule hmyzu (Boucias et al., 1988). Poslední poznatky naznačují, že déšť může způsobit významné omývání konidií *B.bassiana* a *M. anisopliae* z listů jednoděložných i dvojděložných rostlin i povrchu larev (Inglis et al., 2000).

3.4.3. Teplota

Teplota je dalším klíčovým faktorem ovlivňujícím účinnost patogena. Je dobře dokumentováno, že okolní teplota ovlivňuje rychlost infekce a čas, ve kterém dojde k usmrcení hostitele nakaženého entomopatogenní houbou (Inglis et al. 2001). Např. optimální teplota pro *M. anisopliae* infikující dospělce třásněnek je 23°C a její pokles o 3 – 5 °C způsobuje prodloužení doby potřebné k usmrcení hostitele o jeden den (Vestergaard et al. 1995). Prodloužení doby potřebné k usmrcení hostitele může být kritické v případech potlačování škůdců s explozivních populací a taktéž u ochrany plodin velkého ekonomického významu (Inglis et al. 2001).

Optimální teploty pro většinu Hyphomycets je v rozmezí 20 až 25 °C, avšak infekce a nákaza se mohou rozvinout v teplotách v rozmezí 15 – 30°C. Nad 30°C je růst obvykle potlačen a kolem 37 °C zcela ustává (Inglis et al. 2001). Například Fargues et al. (1997) objevil, že čtyři izoláty *M. anisopliae* var. *acridum* jasně způsobily úhyn 98 – 100% hostitelů v podmínkách o teplotě 25 – 30 °C a 0 % při 40 °C. Zaznamenány byly však velké odchylky při teplotě 35°C, kdy byla zjištěna mortalita od 40 – 100%. Cammon, Rath (1994) odizolovali kmen houby *M. anisopliae*, který je infekční i v 5 °C a vykazuje perzistenci po dobu 2 let. U hub *B. bassiana* a *P. farinosus* byla sledována schopnost klíčit a růst s následnou infekcí hostitele i při teplotách nižších než 10 °C v porovnání s *M. anisopliae* (Doberski 1981).

Vänninen (1995) pozorovala u několika finských kmenů *M. anisopliae* schopnost růstu a sporulace dokonce i při 8 °C, i když tento růst byl velmi pomalý.

Podobně jako u vnímavosti k slunečnímu záření je patrná variabilita mezi genotypy v teplotních charakteristikách (Inglis et al. 2001). Při porovnání účinnosti jednotlivých kmenů entomopatogenních hub na larvy *Scolytus scolytus* v závislosti na teplotě vykazoval jeden kmen *B. bassiana* a *P. farinosus* schopnost vyvolávat infekci na larvách *Scolytus scolytus* dokonce i při teplotě 2 °C (Doberski 1981).

V rámci polních pokusů mohou teploty během dne výrazně kolísat. Teplotní fluktuace během dne podle výsledků mnohých pokusů významně ovlivňují in vitro růst mnoha Hyphomycets. Optimální teplota půdy pro přežívání a perzistenci hub se velmi mění v závislosti na druhu, respektive kmenu entomopatogenní houby, půdním typu (druhu) a na přítomnosti přirozených antagonistických organizmů (Inglis et al. 2001). Při testování růstu jednotlivých kmenů v různých teplotních režimech se prokázalo, že kmeny *B. bassiana* odizolované na zemědělsky obhospodařovaných půdách rostly významně lépe při vyšší teplotě (37 °C) a byly více odolné vůči ultrafialovému záření na rozdíl od kmenů odizolovaných v lesních a arktických podmínkách, které vykazovaly lepší růst při teplotách nižších (8 °C) (Bidochka et al. 2002). Asociace s přirozeným prostředím a teplotním profilem byla rovněž prokázána i u houby *M. anisopliae* (Bidochka et al. 2002), což potvrdili i Cammon a Rath (1994), kteří zjistili, že rychlost klíčivosti a teplotní rozmezí, ve kterém je houba *M. anisopliae* schopná realizovat svůj vývojový cyklus, se u jednotlivých kmenů odizolovaných z různých klimatických oblastí velmi liší a pohybuje se v rozpětí 2,5 – 37 °C.

3.4.4. UV záření

Sluneční záření je jedním z nejvýznamnějších faktorů ovlivňujících perzistenci propagulí nad povrchem půdy. Konidie a mycelium všech druhů entomopatogenních hub jsou vysoce vnímavé ke slunečnímu záření (290 – 400 nm) a obzvláště k frakci UVB slunečního spektra (Inglis et al. 2001). Perzistence houbových propagulí na subtrátech vystavených přímému slunečnímu záření je významně redukována v porovnání s propagulemi na chráněných lokalitách (Gottel et al. 2000). Mikroklima, ve kterém houby žijí je významným faktorem ovlivňujícím jejich perzistenci. Vliv mikroklimatu by neměl být přehlížen, protože mnoho druhů hmyzu žije v období, kdy půda není chráněna rostlinným pokryvem. Perzistence konidií na substrátu, který je exponován přímému slunečnímu záření, je podstatně snížena ve srovnání s propagulemi, které jsou před přímým slunečním zářením chráněny např. rostlinným pokryvem (Inglis et al. 1993). Většina studií zabývajících se vlivem slunečního záření na perzistenci konidií se zaměřovala na přežívání konidií na povrchu rostlin nebo na neživých susbstrátech, ale zatím je velmi málo známo o perzistenci konidií na hmyzu – konidie na povrchu hmyzu jsou ke slunečnímu záření stejně vnímavé jako na povrchu listů a na substrátu. zjistil Inglis et al. 1997.

Nicméně byly pozorovány významné odchylky ve vnímavosti k slunečnímu záření mezi kmeny uvnitř druhu (Gottel et al. 2000). Například Fargues (1996) zaznamenal, že konidie *M. anisopliae* var. *acridum* byly obvykle odolnější k umělému slunečnímu záření (295-1100 nm při záření UVB 0.3 W/m2) následované konidiemi *B. bassiana, M. anisopliae, P. fumosoroseus*. Zatímco mechanizmus odolnosti proti slunečnímu záření nebyl podrobněji studován, odolnost vůči poškození vlivem UV může být považována za selekční faktor pro genotyp hub použitelných v IOR. Zatímco UVB složka záření má škodlivý efekt, vyšší vlnové délky mohou být prospěšné stimulací fotoreaktivity působící proti škodlivému účinku UVB spektra (Gottel et al. 2000). Ultrafialové sluneční záření (především UVB, 280 – 320 nm) má přímý účinek na strukturu chromozomální DNA uvnitř buněk nebo způsobuje nepřímé poškození v důsledku vzniku molekul reaktivního kyslíku (Ignoffo 1992; Ignoffo, Garcia

1994). Vlivem UV záření se u konidií, které zůstaly životaschopné, snižuje rychlost klíčení, což může být způsobeno následkem přímého poškození nukleových kyselin a proteinů, obrannou reakcí konidií proti UV záření nebo časovou prodlevou či využitím energie na odstranění poškození vzniklého v důsledku UV záření (Moore et al. 1993).

Rychlá inaktivace infekčních propagulí slunečním zářením je mnohými považována za hlavní překážku úspěšné komercionalizace entomopatogenů škůdců polních plodin a proto se pozornost přenáší na ochranu entomopatogenů (Inglis et al. 2001). Nejoblíbenějším postupem je použití slunečních „blockerů" a/nebo UVB-absorbujících chemikálií (tzv. sunscreenů) ve formulacích propagulí. Na rozdíl od hub byla testována celá řada „sunscreenů" v kombinaci s entomopatogenními viry a *Bacillus thuringiensis*. Souhrn „sunscreenů" k ochraně mikroorganizmů je dostupný v pracích Bernhard et al. (1998) a Burgese, Jones (1998) jak uvádí Inglis et al. (2001). Zatímco množství „sunscreenů" vykazovalo výborné ochranné vlastnosti v kontrolovaném prostředí, pokusy ke zvýšení perzistence či efektivity v polních pokusech jsou méně běžné. Například mnohé v olejích rozpustné „sunscreeny" významně zvýšily přežití konidií *B. bassiana* a *M. anisopliae* vystavených umělému ozáření (Moore et al. 1993), ale nevykazovaly zlepšení přežití konidií *B. basiana* aplikovaných na listech v polních podmínkách (Inglis et al. 1995). Mezi další ochranné faktory je možné zařadit pigmentaci konidií u některých Hyphomycets, protože může příznivě ovlivnit odolnost propagulí k slunečnímu svitu oproti nepigmentovaným konidiím (Liu et al. 1993a). Další strategií pro zvýšení perzistence konidií je aplikace konidií na spodní stranu listů, avšak provedení takovéto aplikace může být obtížné.Úspěch této metody také závisí na potravních zvyklostech cílové skupiny hmyzu (Sopp et al. 1990).

3.4.5. Půdní abiotické a biotické faktory

Mnoho Hyphomycets je považováno za půdní organizmy s vysokým potenciálem v boji proti půdním škůdcům. Nicméně, půda je velmi komplexní životní prostředí a perzistenci či účinnost entomopatogena zde ovlivňuje celá řada faktorů jako půdní typ, vlhkost či přítomnost živé půdní mikroflóry (Inglis et al. 2000). Houby obývající půdní niku jsou chráněny proti vysychání, ultrafialovému záření a extémním teplotám, nicméně jejich rozšíření je sezónní a reflektuje celkové prostorové rozšíření, které se blíží zápornému binomu (McCoy et al. 2002).

Význam konkrétních vlastností půdního prostředí (vodní potenciál, teplota, relativní vlhkost, obsah jílových minerálů apod.) na vytrvání hub v půdě byl nezávisle zjišťován v celé řadě studií (např. Hywel-Jones, Gillespie 1990; Fargues 1976; Lingg, Donaldson 1981).

Půdní voda významně ovlivňuje persistenci konidií v půdě. Vytrvání konidií např. u houby *B. bassiana* se snižuje se zvyšujícím se obsahem vody v půdě (Lingg, Donaldson 1981). Vyšší přežívání konidií *B. bassiana* bylo zaznamenáno v půdách s nižším obsahem organické hmoty, ale perzistence konidií se snižovala se zvyšujícím se obsahem vody v půdě (Studdert, Kaya 1990). Voda není pravděpodobně limitujícím faktorem ovlivňujícím klíčivost konidií v půdě, protože kromě extrémně suchých podmínek je relativní vlhkost půdní atmosféry vysoká (Lingg, Donaldson 1981).

Fyzikální vlastnosti půdy mohou ovlivnit perzistenci a prostorovou interakci mezi houbovým patogenem a půdním hmyzem (Villani et al. 1994). Vlivem mechanické filtrace půdy se 86 – 95 % konidií nachází v hloubce do 5 cm, ale i přesto zbývající část konidií nacházejících se v hloubce 5,1 – 15 cm je schopná vyvolat infekci u vnímavého hostitele (Storey et al. 1989).

Lingg, Donaldson (1981) studovali nepříznivý vliv obsahu dusíkatých látek (čerstvý hnůj) na perzistenci konidií. Půda obsahující čerstvý hnůj poskytovala nepříznivé podmínky pro vytrvání houby *B. bassiana* v půdě. Naproti tomu půda obohacená o kompost vykazovala

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

vyšší nárůst počtu kolonií (Colony Forming Units) oproti kontrolním variantám (Lingg, Donaldson 1981), což může znamenat, že houba *B. bassiana* je schopná se vyskytovat jako saprofyt (Tanada, Kaya 1993). Lingg, Donaldson (1981) uvádí, že přežívání konidií *B. bassiana* je vyšší v půdách s nízkým obsahem organické hmoty.

Většina druhů entomopatogenních hub je tolerantní k širokému rozpětí pH (pH 5 – 10), kdy neutrální půdní reakce (pH 7) se považuje za optimální. Chemické vlastnosti charakteristické pro jednotlivé půdní druhy (typy) mohou ovlivňovat přežívání hub v půdě a vnímavost hostitele k houbové infekci podobně jako kationtová výměnná kapacita a určité minerály (např. měď a síra), které jsou do půdy obvykle vnášeny ve formě hnojiv (McCoy et al. 2002). Účinek fungicidů, insekticidů, akaricidů, herbicidů a růstových stimulátorů ovlivňuje vytrvání entomopatogenních hub v půdě. Tyto prostředky zasahují do houbových epizootií snížením populací přirozených hostitelů nebo inhibičním působením na klíčivost konidií a vegetativní vývoj hub (Gardner, Storey 1985).

Houbové propagule jsou kromě abiotických faktorů ovlivněny i faktory biotickými, především pak antagonisticky působícími bakteriemi (Old, Robertson 1970). Zdá se, že přirozeně se vyskytující půdní mikroorganizmy a jejich sekundární metabolity vykazují v určitých půdních podmínkách antagonistické působení ovlivňující infekčnost a přežívání entomopatogenních hub v půdních ekosystémech (McCoy et al. 2002).

3.5. Metody izolace entomopatogenních hub z půdy

Základem studia druhového složení půdní mykoflóry je izolace půdních hub. Většina izolačních metod patří mezi nepřímé metody studia půdních hub a je nemožné jimi rozlišit, které druhy vyrostou ze spor a které z aktivního mycelia (Řepová 1985). Entomopatogenní houby jsou v půdě heterogenně rozšířeny, proto smísením půdních vzorků docílíme zvýšení frekvence izolace entomopatogenních hub z půdy (Goettel, Inglis 1997).

Běžně používanou izolační technikou je metoda zřeďovací – *„soil dilution plate method"* (Garrett 1963). Tato metoda slouží nejen k identifikaci izolovaných hub, ale také k určitému vyjádření kvantitativního zastoupení hub v půdě – stanovení celkového počtu kolonií (Řepová 1985). Běžným postupem je homogenizace určitého množství půdy ve sterilní vodě nebo pufru (pH 6 – 7) a poté je poměrná část rozptýlena, např. pomocí kuliček, na semi-selektivním mediu (Goettel, Inglis 1997).

Další běžně používanou metodou izolace půdních hub je Warcupova *„soil plate method"* (Warcup 1967), která poskytuje přibližně stejné výsledky druhového zastoupení hub v půdě jako předcházející metoda (Řepová 1985). V některých případech může být žádoucí rozptýlit půdu na misku přímo, což je rychlejší než zřeďování půdních vzorků. Nejjednodušším postupem je pak rozprášit půdní částice na povrch agarového media a nechat houby paprsčitě se rozrůst z půdních částic. Pokud však není použito selektivní medium, tento způsob izolace poskytuje neuspokojivé výsledky, neboť kontaminující houby v určité fázi přerostou houby entomopatogenní (Goettel, Inglis 1997).

Další metodou je metoda hmyzích pastí (*insect baiting*) použitá pro nepřímou izolaci hub z půdy. Obvykle, entomopatogenní Hyphomycetes jsou považována za slabé saprofyty, ale protože mají schopnost infikovat žijící hmyz, mohou vniknout do žijícího hmyzu poměrně bez konkurence (Goettel, Inglis 1997). Entomopatogenní houby mají antibiotické vlastnosti pro všechny běžné saprofyty. Na hmyzu, jež uhynul v důsledku jiné nákazy (než entomopatogenními houbami), se běžně vyskytovaly rozmanité druhy druhotných saprofytických hub, zatímco hmyz, jež uhynul v důsledku nákazy entomopatogenní houbou, měl na svém těle jen zřídka přítomny i jiné druhy hub (Walstad 1970).

3.5.1. *Galleria* bait method (GBM) (metody živých pastí)

Jedná se o metodu pomocí které lze detekovat a následně i odizolovat entomopatogenní houby z půdy. Tato metoda byla původně určena pro detekci entomopatogenních hlístic v půdě. V roce 1975 Bedding a Akhurst zjistili, že larvy zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) pokud jsou zahrabány do půdy, mohou být použity jako návnada pro entomoparazitické hlísty. V průběhu dalších výzkumů Zimmermann (1986) ověřil, že tato prostá metoda může být také použita pro detekci entomopatogenních hub v půdě (Zimmerman 1986).

Principem GBM je schopnost larev zavíječe voskového selektivně odchytit entomopatogenní houby z analyzovaného půdního vzorku při dodržení optimálních, především vlhkostních podmínek. K detekci přirozeného výskytu entomopatogenních hub se používají larvy (třetího až čtvrtého larválního instaru) zavíječe voskového (*G. mellonella*), které mají relativně velký povrch těla, čímž se zvětší pravděpodobnost přichycení konidií patogeny na povrch kutikuly larvy. Zdá se, že druhy hmyzu žijící mimo půdu na speciálních substrátech (včelí úl, mouka, kůra, dřevo) jsou nejlépe použitelné pro zachycení entomopatogenních hub z půdy (Zimmerman 1986). Jedním z nejvýznamnějších zjištění je, že jedinci vystavení stresu jsou podstatně vnímavější k patogenům (Inglis et al. 2001). Předností této metody je její relativně vysoká citlivost, neboť pro larvy zavíječe voskového je půda nepřirozeným stresujícím prostředím (jiné životní podmínky, absence potravy), čímž se zvyšuje citlivost larev vůči entomopatogenním houbám a i nižší dávky houbového inokula v půdě jsou schopny vyvolat infekci (Zimmerman 1986). Další předností této metody je nenáročnost chovu larev zavíječe voskového při nízkých nákladech (pozn. autora).

Kromě larev zavíječe voskového (*G. mellonella)* je možné použít pro úspěšnou detekci entomopatogenních hub i larvy *Tribolium destructor* (Coleoptera, Terebrionidae), *Acanthocinus aedilis* (Coleoptera, Cerambycidae) (Zimmermann 1986) nebo *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Terebrionidae) (Vänninen et al. 1989, Kleespies et al. 1989). Při použití larev *Delia floralis* (Diptera, Anthomyiidae) v metodě živých pastí byla mnohem častěji detekována entomopatogenní houba *Typocladium cylindrosporum* než v případě běžněji používaného zavíječe voskového *(Galleria mellonella*) (Klingen et al. 2002).

Galleria bait method je jednoduchým a praktickým prostředkem pro hledání přirozeného výskytu a prostorového rozšíření širokého spektra entomopatogenních hub, stejně jako jednotlivých druhů, téměř v každém půdním typu nezávisle na hostiteli a období. Prostřednictvím této metody je možné odhalit i nové entomopatogenní kmeny hub, následně aplikovatelné v biologické ochraně (Zimmermann 1986). Tato metoda je považována za podstatně bezpečnější než některá selektivní média s vysokými koncentracemi chemických látek (Chandler et al. 1997).

3.5.2. Selektivné media

Selektivní media se obecně používají pro kvantitativní analýzu entomopatogenních hub v polních podmínkách. Pro izolaci entomopatogenních hub (*Metarhizium* spp. a *Beauveria* spp.) z půdy je možné použít široké spektrum fungicidů a antibiotik. První selektivní médium (Veen, Ferron 1966) obsahovalo chloramfenikol a cycloheximid (actidione) a bylo odvozené od selektivního media, které se používalo pro izolaci hub z klinických vzorků (Liu et al. 1993b). Později bylo toto medium zjednodušeno (Milner, Lutton 1976) a začalo se běžně používat pro kvantitativné izolaci *Metarhizium* spp. z půdy pod označením „Veen's medium".V roce 1982 se zjistilo, že medium obsahující dodine (pozn., CAS: dodecylguanidine monoacetate) umožňuje v porovnání s ostatními médii úspěšně izolovat houbu *M. anisopliae* z půdy (Beilharz et al. 1982). Toto zjištění vedlo k vývoji selektivního média na bázi dodine

zejména pro izolaci houby *B.bassiana* z půdy (Chase et al. 1986) a *M. anisopliae* ze švábů (Sneh 1991). Dodine byl uveden na trh v roce 1950 jako účinná látka proti původci strupovitosti jabloní (*Venturia inaequalis*) a ostatním chorobám (Shaw 1959). Způsob účinku založený na rychlé absorpci buněčnou stěnou (Curry 1962; Mitjans, Vinardell 1999), následkem čehož dojde ke změně permeability membrán narušující vzájemnou interakci mezi kationty a anionty (Brown, Sisler 1960; Cabral 1991).

Shimazu, Satoi (1996) vyvinuli nové selektivní medium pro izolaci houby *B. bassiana*, které se od těch předchozích selektivních médií, která hlavně obsahovala nutričně bohatý zdroj a fungicidní činidlo, liší tím, že poskytuje pro houby *B. bassiana* nepříznivé podmínky, které jsou však pro ostatní houby ještě nepříznivější a inhibují jejich růst. Toto selektivní médium obsahuje $CuCl_2$, krystalickou violeť, případně briliantovou zeleň a má nízký obsah cukrů. Při použití tohoto selektivního media pro izolaci houby *B. bassiana* z půdních vzorků byla prokázána větší účinnost než použití Veen & Ferron selektivního media.

V současné době je k dispozici celá řada selektivních medií pro izolaci entomopatogenních hub, přičemž některé z nich jsou uvedeny i v následujícím přehledu.

VEEN'S AGAR MÉDIUM (Veen, Ferron 1966)

- mykologický agar (Difco), nebo sójový pepton (Oxoid) – 35g,
- dextróza – 10g, agar No.1. (nebo Bacto-agar) – 15 g,
- chloramfenikol – 1g a cycloheximid (Actidione) – 0,5 g,
- vše do 1 litru destilované vody a důkladně rozmícháme,
- autoklávujeme po dobu 10-15 minut při tlaku 18-20 psi, zchladíme na 50 °C a rozléváme do Petriho misek.

OVESNÝ AGAR S PŘÍDAVKEM DODINE (Beilharz et al. 1982)

Příprava antibiotického zásobního roztoku:

- do sterilní destilované vody přidáme penicilin G (Sigma) – 4g a streptomycin v sulfátové formě (Sigma) – 10 g, (teplota skladování je 4 °C).

Příprava zásobního roztoku krystalické violeti:

- do 200 ml destilované vody přidáme 0,1 g krystalické violeti (Sigma).

Vlastí médium:

- do 0,5 l destilované vody pomalu přidáváme za stálého míchání 17,5 ovesného agaru (Difco) a 2,5 agaru (Fisons) a zahřejeme na bod varu,
- do média přidáme 0,5 ml dodine (N-dodecylguanidine monoacetate, Cyprex 65WP, American Cyanamid Co.) a 5 ml *zásobního roztoku krystalické violeti*,
- autoklávujeme po dobu 20 minut a tlaku 15 psi.,
- medium necháme vychladnout na teplotu 50 – 55 °C a sterilně přidáme 2 ml *antibiotického zásobního roztoku*,
- důkladně promícháme a rozléváme dokud je médium teplé.

SELEKTIVNÍ AGARIZOVANÉ MÉDIUM (Kerry et al. 1993)

(selektivní izolace *Paecilomyces* spp. a *Verticilium* spp. z půdy)

- karbendazim – 37,5 mg, thiabenzol – 37,5 mg, bengálská červeně – 75 mg, NaCl – 17,5 g, streptomycin v sulfátové formě – 50mg, aureomycin – 50mg, chloramfenikol – 50 mg, Triton X-100 – 3 ml a corn meal agar (Oxoid) – 17 g,
- vše přidáme do 1 litru destilované vody.

SELEKTIVNÍ MÉDIUM PRO IZOLACI (Mitchell et al. 1987)
(selektivní izolace *Paecilomyces lilacinus*)

- potato dextrose agar – 399g, NaCl – 120-30 g, Tergitol – 1g, pentachloronitrobenzen – 500 mg, benomyl – 500 mg, streptomycin v sulfátové podobě – 100 mg a chlorotetracyclin hydrochlorid – 50 mg.

SELEKTIVNÍ AGARIIZOVANÉ MÉDIUM OBSAHUJÍCÍ PŠENIČNÉ KLÍČKY (Sneh, 1991)
Příprava vodního extraktu z pšeničných klíčku:

- smícháme 30g pšeničných klíčků v 1 litru vody,
- autoklávujeme a poté přefiltrujeme přes 4 vrstvy jemné gázy,

Vlastní médium:

- *vodní extrakt* z pšeničných klíčků (1 litr) smícháme s 0,25 g chloramfenikolu + 0,8 mg benlate (50% benomyl), 0,3 g dodine (65% n-dodecyl-guanidine acetate), 10 mg krystalické violeti a s 15 g agaru,
- autoklávujeme a následně rozléváme do Petriho misek.

AGARIZOVANÉ SELEKTIVNÍ MÉDIUM NA BÁZI MĚDI (Baath, 1991)

- 1 litr selektivního média obsahuje 2% sladový výtažek (Oxoid) a 1,5% agar (Difco) upravený s 2 – 4 mg $CuSO_4$. 5 H_2O na litr.
- selektivita tohoto media je založená na skutečnosti, že *Cordyceps militaris* a *Paecilomyces farinosus* mají velmi dobrou toleranci k vysokému obsahu mědi (400 $mg.l^{-1}$),
- následuje *Metarhizium anisopliae* a *Beauveria bassiana*, většina ostatních půdních hub včetně nematofágních druhů rodu *Verticilium* je méně tolerantní.

3.6. Použití genetických metod při identifikaci izolovaných kmenů entomopatogenních hub

3.6.1. Molekulární markery

Obecně nejpoužívanější identifikační metodou je hodnocení morfologických znaků (tvar a charakter mycelia, velikost a tvar konidií, tvar a velikost fruktifikačních orgánů apod.), produkčních (zejména u farmaceuticky využívaných organizmů) a biologických vlastností (klíčení spor a jeho dynamika, testy biologické účinnosti – FGDI apod.) (Landa et al. 1994). Variabilita těchto znaků je však velmi vysoká, tyto vlastnosti jsou inducibilní a pouhá změna kultivačního média je vzhledem k rychlému generačnímu cyklu mikroorganizmů může výrazně pozměnit. Ani další fenotypové markery (jako např. detekce enzymatické aktivity) nepřinesly v celé problematice výraznější posun (Oborník 1995). Nové možnosti v identifikaci izolátů hub přinesly teprve molekulárně biologické metody, především detekce DNA polymorfismu jako potenciálního zdroje genetických DNA markerů. Molekulárně biologické metody přinášejí nový pohled na taxonomii nejnižších jednotek (v rámci rodu či druhu) mohou nabídnout jediný možný způsob rozlišení a klasifikace houbových kmenů (Bruns et al. 1991).

Pro „markerování" diverzity, pro detekci polymorfismu na úrovni nukleových kyselin (zejména DNA) je možné použít celou řadu různých molekulárních technik. Většina molekulárních markerů spadá do jedné ze tří kategorií technik (1) techniky využívající hybridizaci; (2) techniky založené na PCR reakci (amplifikace využívající náhodných primerů, *multi-locus* PCR); a (3) techniky založené na PCR reakci (amplifikace známých

cílových sekvencí, *single-locus* PCR). Některé techniky jsou navíc modifikacemi nebo kombinacemi dalších metodických postupů (Karp, Edwards 1997).

Techniky založené na hybridizaci bez použití PCR reakce jsou historicky prvními skupinami molekulárních markerů, které byly používány v „počátcích" molekulární biologie od 70. let. Do této skupiny je možné zařadit RFLP analýzu (*Restriction Fragment Length Polymorphism* tedy polymorfismus délky restrikčních fragmentů) (Grant, Shoemaker 1997). Vývoj PCR metod od poloviny 80. let 20. století odstranil nezbytnost složitých a náročných hybridizačních kroků. Do druhé skupiny technik založených na PCR reakci můžeme seskupit všechny PCR techniky, které k amplifikaci DNA produktů používají náhodné primery (Karp, Edwards 1997). Mezi tyto techniky je řazena RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA – polymorfismus náhodně amplifikované DNA). Díky vysoké proměnlivosti SSR (Simple Sequence Repeats) je popsáno mnoho metod a jejich modifikací, kdy jsou mikrosatelity použity jako primery (Vogel, Scolnik 1997). Amplifikace cílových sekvencí (*single-locus PCR*) pro tuto třetí skupinu technik je nezbytná znalost cílových sekvencí nebo sekvencí ohraničujících cílovou oblast. SSR markery označované také jako STMS (*Sequence-Tagged Microsatellite Site*) jsou velmi zajímavé, protože každý pár primerů identifikuje single-lokus, který díky vysoké proměnlivosti SSR lokusů může mít mnoho alel. Prvotní vývoj STMS může být ale obtížný a časově náročný (Haraštová 2003).

3.6.2. Polymerázová řetězová reakce – PCR (Polymerase Chain Reaction)

Polymerázová řetězová reakce byla objevena v roce 1984 (Saiki et al. 1985). PCR využívá principů DNA replikace. Pro PCR reakci stačí velmi malé množství DNA, v extrémních případech postačí DNA z 1 buňky (Li et al. 1988). Není vyžadována vysoká čistota DNA, metoda navíc vyniká citlivostí a extrémně vysokou rychlostí (Saiki et al. 1988).

DNA polymeráza používá jednořetězcovou DNA (ssDNA) jako templátu k syntéz nového komplementárního řetězce. Tyto jednořetězcové DNA templáty se získávají pouhým zahřátím dvoušroubovice DNA (dsDNA) na teplotu blízkou teplotě varu (denaturace). K započetí syntézy potřebuje DNA polymeráza malý úsek dsDNA. Tímto startovacím bodem pro syntézu DNA je komplex templát – oligonukleotidový primer. DNA polymeráza je směrována k syntéze specifického úseku DNA, který je vymezen DNA primery (resp. jejich cílovými, komplementárními sekvencemi), a to tak, že pro každý z obou řetězců – templátů (ssDNA) existuje pro vymezení amplifikavaného genu jeden specifický primer. Nový syntetizovaný řetězec DNA, jehož syntéza začíná od každého primeru, dosahuje až za místo, kde je napojen primer na protějším, komplementárním řetězci. Tak se vytvoří na každém novém řetězci DNA nové nasedací místo pro DNA primer. Reakční směs se následně opět zahřeje na denaturační teplotu, původní templátový řetězce DNA je oddělen od nově vytvořeného a ten je tím připraven k nasednutí DNA primeru, DNA syntéze a dalšímu oddělení řetězců, dalšímu amplifikačnímu cyklu (Watson et al. 1992).

3.6.3. Fáze PCR reakce

Reakce PCR probíhá v cyklech. Každý cyklus obsahuje 3 kroky: denaturaci, nasednutí (annealing), prodlužování (extension).

Prvním krokem reakce PCR je *denaturace DNA* při teplotě 90 – 95 °C. Při této teplotě dochází k rozdělení dvoušroubovice DNA (ds DNA) na jednoduché řetězce (ss DNA). Příliš vysoká teplota nebo prodloužená délka tohoto kroku může vést ke snížení enzymatické aktivity DNA polymerázy (Innis, Gelfand 1990).

Po denaturaci následuje druhý krok, kdy se teplota reakční směsi snižuje na teplotu vhodnou pro *nasednutí (annealing)* primeru na templát. Nasedací teplota (annealing

temperature) se obvykle pohybuje mezi 30 – 70 °C. Teplota a doba trvání tohoto kroku závisí na sekvenci primeru, jeho délce a koncentraci v reakční směsi (Innis, Gelfand 1990).

Posledním krokem PCR reakce je *prodlužování (extension)*. Syntéza DNA probíhá obvykle při teplotě 72 °C, což je optimální teplota pro Taq polymerázu (Innis, Gelfand 1990). Při teplotě 72 °C se rychlost Taq polymerázy pohybuje od 35 do 100 inkorporovaných nukleotidů za sekundu, v závislosti na použitém pufru, pH, koncentraci solí a původu DNA templátu (Samec 1993).

V každém cyklu vytvářejí PCR produkty dvouřetězcovou formu (ds DNA). Každý z těchto řetězců může fungovat jako templát v následném cyklu. Počet cyklů je obvykle mezi 20 – 25 cykly (Samec 1993).

3.6.4. RAPD analýza (Random Amplified Polymorphic DNA – polymorfismus náhodně amplifikované DNA)

Metoda RAPD detekuje malé převrácené nukleotidové sekvence roztroušené po celé genomické DNA (Welsh, McClelland 1990). RAPD technika používá pouze jeden primer o náhodné nukleotidové sekvenci (Tingey, Del Tufo 1993). Technika RAPD skýtá mnohé přednosti oproti ostatním genetickým metodám. Za prvé nevyžaduje znalost cílových sekvencí DNA. Dále to je její jednoduchost a rychlost. Pro získání PCR produktů postačuje pouze nanogramové množství DNA (Tingey, Del Tufo 1993). Tato technika je úspěšně používána pro rozlišení druhů a kmenů v rámci druhů u rostlin, bakterií, živočichů a hub (Williams et al. 1990).

RAPD technika je rozhodující např. pro houbu *B. bassian* při hodnocení persistence introdukovaného mikrobiálního agens, protože tato houba má široké rozpětí hmyzích hostitelů a běžně se vyskytuje v půdě (McCoy at al. 1988). V důsledku nedostatku charakteristických vlastností je téměř nemožné pouze pomocí morfologických znaků rozlišit individuální izoláty hub (Samšiňáková at al. 1983). Dostatečnou informaci pro identifikaci hub na poddruhové úrovni neposkytují ani žádné standardní laboratorní biotesty ani interakce s přirozenými hostiteli (Osborne at al. 1992). Molekulární metoda RAPD, založená na PCR, se proto osvědčila jako vhodný nástroj pro analýzu genetické variability entomopatogenních hub (Landa at al. 2001).

3.7. Mykoinsekticidy v integrované ochraně rostlin

3.7.1. Problematika uvádění biopesticidů do praxe

V porovnání s biologickými prostředky na bázi makroorganizmů představují biologické přípravky produkty, které jsou svým charakterem podstatně bližší klasickým pesticidním přípravkům. Biologický přípravek (též biopreparát) je definován obdobně jako konvenční syntetický pesticid. Účinným bioagens preparátů (analogie aktivní látky – a.i. pesticidů) je mikroorganismus přesně definovaný na poddruhové úrovni (kmen, populace). (Landa 2002). Biopesticidy jsou účinné ve velmi malých množstvích, také se všeobecně rychleji rozkládají, což zabraňuje jakýmkoli potenciálním problémům znečištění prostředí. Biopesticidy mají potenciál pro to, aby se staly základní složkou managementu integrované ochrany rostlin a tím značně snížily používání konvenčních pesticidů, současně ochránily přirozené nepřátele (biologická kontrola) a hubily škůdce rezistentní vůči konvenčním pesticidům (Anonym 2, 2005).

Biopesticidy byly prosazovány po dlouhou dobu, ale jejich použití zůstává limitováno na 1% celkového trhu s pesticidy (Whipps, Lumsden 2001). Bohužel tyto nové výrobky zatím nepronikají na trh tak rychle, jak by se dalo očekávat na základě výsledků výzkumu. Jednou z překážek jejich komerčního využití jsou např. ve Velké Británii vysoké náklady na jejich registraci ve srovnání s jejich potenciální komerční návratností (Anonym 1, 2005). Na rozdíl od biologických prostředků podléhají mikrobiální biopreparáty standardní registraci, která je v rozsahu požadavků buď shodná nebo dokonce náročnější než registrace klasických pesticidů (Landa 2002). V rámci nové legislativy Evropské komise je tento poplatek za registraci biopesticidu až dvakrát vyšší než poplatek za registraci chemické látky, a sice 45 000 liber (Anonym 1, 2005). Další překážkou zavádění biopesticidů je nevhodnost systému vytvořeného k hodnocení jejich účinnosti a eventuálních toxických účinků (Anonym 1, 2005). Postupně se tedy objevily na trhu preparáty, které vlastně pracují na bázi patogenů, ale jsou prezentovány jako růstoví promoteři, půdní kondicionery, biohnojiva, biologické aktivátory či podobné prostředky na bázi mikroorganizmů, které nevyžadují složitý proces registrace (Whipps, Lumsden 2001). Naneštěstí, bez přísných podmínek registrace zahrnující toxokologické testy a informace o účinnosti, nemůže být zaručeno bezpečné použití a ne vždy mohou být zřejmé prospěšné vlivy na ochranu rostlin a růst rostlin (Cook et al., 1996).

Navzdory velkému množství nových produktů přicházejících na trh např. ve Spojených států je jejich přijímání pěstiteli stále váhavé. Někdy je to tím, že biopesticidy z různých důvodů nefungovaly správně, a proto se mnozí zemědělci zdráhají vyzkoušet další (Anonym 1, 2005). Jedním z hlavních omezení v jejich použití v ochraně rostlin je nestálost v účinnosti například při velkoplošné aplikaci na pole, což může být zapříčiněno řadou faktorů, které mají podstatu v biologickém původu těchto mikroorganizmů. K řešení tohoto problému bylo navrženo, že všechny procesy výběru, pozorování a vývoje by měly přijmout ekologický přístup, který bere v úvahu znaky prostředí, kam bude agens aplikováno (Whipps, Lumsden 2001).

3.7.2. Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub (produkce, stabilizace a formulace)

Účinnou složku většiny biopreparátů na bázi entomopatogenních hub tvoří konidie nebo blastospory (Landa 2002). Většina entomopatogenních hub produkuje velké množství malých hydrofobních konidií v hustých masách. Konidie mají pevné hydrofobní stěny, které zajišťují stabilitu v prostředí. Tyto charakteristiky přispívají k efektivitě produkce a skladovací stabilitě a činí konidie vhodné k výběru pro komerční použití (Wraight et al. 2001). Konidie jsou produkovány v „in vitro" systémech povrchových kultivací na tekutých

živných půdách nebo na přirozených substrátech. Tenkostěnné blastospory jsou produkovány pomocí fermentačních technologií (submerzní kultivace v tekutém živném médiu) (Landa 2002). K běžným formulacím biopreparátů patří formulace WP, WDG, SC a jiné (Landa 1998). Zvláštní skupinu houbových biopreparátů představují přípravky jejichž aktivní složku tvoří buď neinfekční formy biomasy hub (mycelium) nebo infekční jednotky imobilizované v organických nebo anorganických nosičích. Tyto formulace byly cíleně vyvinuty pro účely půdních aplikací. Jedná se o *biopreparáty na bázi myceliových granulí* (patogen je finalizován do formy sušených myceliových fragmentů) nebo *biopreparáty na bázi alginátových pelet* (sušená biomasa – mycelium, blastospory, konidie patogena). Tyto formulace po aplikaci do půdy jímají vodu a aktivují se (Landa 2002).

Důležitou podmínkou komerční produkce bioinsekticidů je vyprodukovat 10^{13} spor při nákladech rovnajících se nákladům produkce chemického prostředku na hektar. Takovéto úrovně se již podařilo dosáhnout. Automatizované technologie pro produkci vzdušných konidií *B. bassiana* byly vyvinuty již v mnoha zemích (Feng et al., 1994). Významný fenomén a současný trend ve využívání biopreparátů přestavují nízkokapacitní produkce zaměřené na jednoduchou a levnou produkci biomasy určitého druhu (kmene) bioagens s cílem jeho přímého použití producentem (Landa 2002). Paradoxně jsou více využívány biopreparáty na bázi fakultativně entomopatogenních druhů některých vláknitých hub (Deuteromycotina: Moniliales), než na bázi druhů obligátně patogenních (Zygomycotina: Entomophthorales). Důvodem je skutečnost, že doposud nebyla zvládnuta biotechnologie masové produkce hub, které jsou svým vývojem obligátně vázány na živého hostitele Wraight et al. 2001 (viz. kapitola: Klasifikace entomoptogenních hub, odstavec 2).

Standardní biopreparáty na bázi entomopatogenních hub musí splňovat řadu kvalitativních a kvantitativních kritérií a obdobně jako syntetické pesticidy podléhají kompletnímu registračnímu procesu. Mezi klíčové parametry kvalitativní povahy patří garance druhu a kmene patogena. Mezi hlavní kvantitativní a kvalitativní parametry houbových biopreparátů patří: počet infekčních jednotek, klíčivost konidií, počet jednotek tvořících kolonie (CFU) (Landa 2002).

Příklady registrovaných biopreparátů na bázi vláknitých entomopatogenních hub (Landa 2002):

Druh patogenní houby	Obchodní název	Výrobce	Země registrace
Beauveria bassiana	Naturalis-L ™	Troy Biosciences	*USA, státy EU*
	Naturalis-H&G ™	Troy Biosciences	*USA, státy EU*
	Naturalis-T&O ™	Troy Biosciences	*USA, státy EU*
	Ostrinil ™	Natural Plant Protection	*USA*
	Mycotrol ™	Mycotech	*USA*
	Mycotrol-O	Mycotech	*USA*
	Botanigard 22WP ™	Mycotech	*USA*
	Conidia	AgrEvo	*Německo*
Beauveria brongniartii	Betel	NPP Caliope	*Francie*
	Schweizer-Beauveria	Eric Sweizer	*Švýcarsko*
	Engerlingspilz	Andermatt	*Švýcarsko*
	Melocont	Kwizda	*Rakousko*
Metarhizium anisopliae	Bio-Blast ™	EcoScience	*USA*
	Bio1020 ™	Bayer	*Německo*
Metarhizium flavoviridae	Green Muscle	CABI	*Velká Británie*
Paecilomyces fumosoroseus	PFR 97 ™ 20%WDG	Certis	*USA, státy EU*
	PreFeRal	Biobest NV	*Japonsko a další*
Paecilomyces lilacinus	Paecil	TI Corp.	*Austrálie*
	Bioact	TI Corp.	*Austrálie*
Verticillium lecanii	VertalecÔ	Koppert B.V.	*USA, státy EU*
	Mycotal ™	Koppert B.V.	*USA, státy EU*

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Entomopatogenní houby používané v pokusech

Většina hodnocených kmenů entomopatogenních hub v disertační práci byla získána v průběhu monitoringu entomopatogenních hub v jihočeském regionu nebo na dvou lokalitách (Troubsko a Pěnčín) na území Moravy.

Ostatní kmeny byly získány z mykologické sbírky kmenů katedry rostlinné výroby ZF JU v Českých Budějovicích (Tabulka 4.1), které byly většinou izolovány při velkoplošném monitoringu kmenů v regionu Jižní Čechy v roce 1998 – 2002 (Horňák 2004) nebo získány z přípravku PreFeRal WDG (BIOBEST) jako monosporový izolát a popř. pasážovaný přes hostitele – molici skleníkovou (*Trialeurodes vaporariorum*) nebo svilušku chmelovou (*Tetranychus urticae*).

Tabulka 4.1: Kmeny entomopatogenních hub použité v jednotlivých studiích

Druh	Kmen	Původ	Způsob izolace	5.2.1	5.2.2.1	5.2.2.2	5.3	5.4.4	5.5.4	5.5.5	5.5.7
Beauveria bassiana	M062	Pístina – J. Hradec (ČR)	GBM	x	x	x	x		x	x	x
	M067	Pístina – J. Hradec (ČR)	GBM	x		x	x				
	M081	J. Hradec – J. Hradec (ČR)	GBM	x							
	M099	Srubec – Č. Budějovice (ČR)	GBM	x							
	M101	Ledenice – Č. Budějovice (ČR)	GBM	x		x	x				
	M104	Jílovice – Č. Budějovice (ČR)	GBM	x							
	M108	Jílovice – Č. Budějovice (ČR)	GBM	x							
	M125	Cehnice – Strakonice (ČR)	GBM			x	x				
	M132	Chvalšiny – Č. Krumlov (ČR)	GBM			x	x				
	M151	Chvalšiny – Č. Krumlov (ČR)	GBM			x	x				
	M152	Kloub – Strakonice (ČR)	GBM	x		x	x				
	M159	Kloub – Strakonice (ČR)	GBM			x	x				
	M160	Chvalšiny – Č. Krumlov (ČR)	GBM			x	x				
	M169	Chvalšiny – Č. Krumlov (ČR)	GBM			x	x				
	M172	Cehnice – Strakonice (ČR)	GBM			x	x				
	M173	Cehnice – Strakonice (ČR)	GBM			x	x				
	M175	Kloub – Strakonice (ČR)	GBM	x							
	M185	Katovice – Strakonice (ČR)	GBM	x							
	M345	Pístina – J. Hradec (ČR)	SM a.i. dodine			x	x				
	BBA 01	Apopca – Florida (USA)	neznámý				x		x	x	x
	BBA 02	Apopca – Florida (USA)	neznámý				x			x	x
Peacilomyces fumosoroseus	M064	Pístina – J. Hradec (ČR)	GBM	x							
	M069	Pístina – J. Hradec (ČR)	GBM	x							
	M074	Pístina – J. Hradec (ČR)	GBM	x							
	M093	Pístina – J. Hradec (ČR)	GBM	x							
	M094	Pístina – J. Hradec (ČR)	GBM	x							
	M096	Orlov – Tábor (ČR)	GBM	x							
	M098	Stráž n.N. – J. Hradec (ČR)	GBM	x							
	M100	Pístina – J. Hradec (ČR)	GBM	x							
	PFR 97 2B	PreFeRal – monosporový izolát	–					x			
	PFR 97 - H10	PreFeRal – 50. pasáž (molice)	–					x			
	PFR 97 - H20	PreFeRal – 50. pasáž (sviluška)	–					x			
Metarhizium anisopliae	M076	Rodvínov – J. Hradec (ČR)	GBM	x							
	M080	J. Hradec – J. Hradec (ČR)	GBM	x							
	M102	Ledenice – Č. Budějovice (ČR)	GBM	x							
Lecanicillium lecanii	I9	Kvilda – Prachatice (ČR)	neznámý					x			

4.2. Metody použité při detekci a izolaci entomopatogenních hub z půdy

Přítomnost entomopatogenních hub v odebraných půdních vzorcích byla detekována pomocí dvou izolačních metod – modifikované Zimmermannovy (Zimmerman 1986) „*Galleria* bait method" (GBM) využívající přirozené návnady larev zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) (Grafický list 2) a metodu založenou na selektivním účinku živného média obohaceného o fungicidní složkou DODINE (SM a.i. dodine) (Beilharz et al. 1982) (Grafický list 3). Jako živné médium byla použita agarizovaná bramborovo-dextrózová (potato dextrose agar, PDA) půda. Purifikované a jednoznačně identifikované kmeny entomopatogenních hub byly poté enkapsulovány v podobě Na-alginátových pelet umožňující jejich dlouhodobé uchovávání a re-akitvaci pro potřeby následných (bio)testů (Eyal et al. 1994) (Grafický list 3).

4.2.1. Odběr a skladování půdních vzorků

- Z hodnocené lokality (Grafický list 1) byl odebrán reprezentativní půdní vzorek o objemu 1 – 1,5 kg, který se skládal z 5 – 8 dílčích vzorků (dle velikosti zkoumané lokality odběru).
- Dílčí půdní vzorky byly odebrány (po pomyslné úhlopříčce) do mikrotenového nebo polyetylénového sáčků pomocí vzorkovače (zahradní lopatka) do hloubky 10 – 15 cm po odstranění případného vegetačního pokryvu.
- Bezprostředně po odběru byl vzorek řádně označen – lokalitou odběru, druhem plodiny a datem odběru. V případě opakovaného odběru byla lokalita odběru zaměřena pomocí družicového navigačního přístroje – GPS (Global Positioning System).
- Před každým novým odběrem půdního vzorku (z nové lokality odběru) byl vzorkovač očištěn od zbytků půdy a poté povrchově semi-sterilizován např. technickým alkoholem.
- Vzorek byl z lokality odběru transportován v tmavé a tepelně izolované polystyrenové krabici (např. taška na potraviny) opatřené chladící vložkou.
- Za semi-sterilních podmínek byl vzorek homogenizován a pro potřeby pozdějších analýz byl uchován vzorek o objemu 400 ml v plastových potravinářských krabičkách.
- Půdní vzorek byl skladován po max. dobu 20 dní v temnu a chladu (lednice, 6 – 8 °C).

4.2.2. Izolace entomopatogenních hub z půdy pomocí „*Galleria* bait method" (metoda živých pastí) (Horňák 2004)

Tato metoda využívá larev zavíječe voskového (*G. mellonella*) jako „živé návnady" k detekci a následné izolaci entomopatogenních hub z půdy, za předpokladu dodržení optimálních vlhkostních a teplotních podmínek pro růst a vývoj patogena na hostiteli (Grafický list 2).

- Z homogenizovaného půdního vzorku bylo odměrkou nádobou (před každým novým odběrem semi-sterilizována technickým lihem) odměřeno 40 ml půdy, která byla přesypána do plastové Petriho misky o průměru 90 mm a to vždy ve dvou opakováních tzn. analýza každého vzorku ve dvou Petriho miskách.
- Do Petriho misky bylo umístěno 10 ks larev (3. – 4. larválním instaru) zavíječe voskového (*G. mellonella*) a v případě nutnosti byly optimalizovány vlhkostní poměry půdy v Petriho misce, především jednorázovým ovlhčením půdy sterilní destilovanou vodou.
- Petriho misky (s půdou a larvami) byly uzavřeny v plastovém sáčku a inkubovány v termostatu při teplotě 25 ± 1 °C a fotoperiodě 0/24 hod. Pro dosažení zvýšeného

pohybu larev v půdě byly Petriho misky pravidelně otočeny o 180° v 24 – 48 hodinovém intervalu.

- Larvy v Petriho misce byly kontrolovány 7., 10. a 14. den. Všechny infikované larvy nebo larvy s příznaky infekce (splývavé melanizační skvrny) byly přemístěny do „vlhké komůrky" tvořené Petriho miskou (průměr 60 mm) s ovlhčeným filtračním papírem.
- Infikované larvy byly ponechány ve „vlhké komůrce" při pokojové teplotě do doby plné sporulace entomopatogenní houby na hostiteli (*G. mellonella*).

4.2.2.1. Kontinuální časově synchronizovaný chov zavíječe voskového (*G. mellonella*)

Z důvodu velkého množství larev pro potřeby „*Galleria* bait metod" bylo nezbytné zabezpečit kontinuální časově synchronizovaný chov zavíječe voskového (*G. mellonella*) na „Haydakovo živném substrátu" za předem definovaných podmínek (Horňák, ústní sdělení).

Příprava substrátu „Haydakovo živné půdy" (Horňák 2004) Jednotlivé komponenty (22 hmot. % kukuřičného šrotu, 11 hmot. % pšeničného šrotu, 11 hmot. % hladné mouky, 11 hmot. % sušeného mléka či sušené syrovátky, 5,5 hmot. % sušeného droždí, 17,5 hmot. % včelího vosku, 11 hmot. % medu a 11 hmot. % glycerinu) byly homogenizovány ve vhodné nádobě a poté byly tepelně sterilizovány v horkovzdušném sterilizátoru při teplotě 60 °C po dobu 3 hodin. Po vychladnutí byl substrát v uzavřené nádobě skladován v temnu a chladu (lednice, 6 – 8 °C).

4.2.3. Izolace entomopatogenních hub z půdy pomocí selektivního agarizovaného média s fungicidní složkou dodine (Horňák 2004)

Principem této metody je selektivní působení fungicidní složky dodine k entomopatogenním houbám při současné inhibici (ať již úplné či pouze částečné) ostatních půdních hub v důsledku přeměny jejich buněčné stěny a inhibičního působení na tvorbu a klíčení jejich konidií (Grafický list 3).

- Z homogenizovaného půdního vzorku bylo standardní odměrnou nádobou (vždy semi-sterilizováno pomocí technického líhu) odměřeno 20 ml půdy, která byla převedena do Erlenmeyerovy baňky a doplněna sterilní destilovanou vodou s 0,05 % roztokem Tween 80 do objemu 100 ml.
- Obsah Erlenmayerovy baňky byl homogenizován na reciproké třepačce (250 rpm, amplituda 3) po dobu 10 – 15 minut
- Půdní výluh byl naředěn v poměru 1:10 (tzn. 1ml půdního výluhu do 9 ml 0,05 % roztoku Tween 80) a důkladně protřepán pomocí „Vortexu".
- Naředěný půdní výluh o objemu 0,5 ml byl rovnoměrně pomocí 3 – 4 skleněných kuliček rozprostřen na povrch SM a.i. dodine (Tabulka 4.2).
- Pro každý půdní výluh byly použity dvě opakování tzn. analýza každého vzorku na dvou Petriho miskách se selektivní agarizovanou půdou.
- Pokusné jednotky byly inkubovány v termostatu při teplotě 25 ± 1 °C a fotoperiodě 0/24 hod.
- Počet nově narostlých kultur (Colony Forming Unit, CFU) byl stanoven při každé kontrole (7., 10. a 14. den) s následnou izolací entomopatogenních hub za sterilních podmínek.

Tabulka 4.2: Složení selektivního média na bázi dodine (o koncentraci 50 μg dodine/ 1 ml slektivního média) (Horňák 2004)

Název	Množství
Dodin (dodine)	0,025 g
Cykloheximid (cycloheximide, actidione)	0,125 g
Chloramfenikol (chloramphenicol)	0,250 g
Agarizovaná bramborovo-dextrózová půda (potato dextrose agar) (DIFCO)	19,500 g
Destilovaná voda	500 ml

4.2.4. Purifikace a identifikace entomopatogenních hub

Purifikace entomopatogenní houby z povrchu infikované larvy (*G. mellonella*) nebo selektivního média na bázi dodine byla provedena pomocí vyžíhané kultivační kličky přes agarizovanou živnou půdu (PDA), většinou ve dvou krocích („pasážích"). Čistá kultura entomopatogenní houby byla získána po 7 – 10 denní kultivaci v termostatu při teplotě 25 ± 1 °C a fotoperioda 0/24 hod (Grafický list 3).

Pomocí preparační jehly bylo přeneseno malé množství biomasy (mycelium s rozmnožovacími orgány) do kapky laktofenolu na podložním sklíčku, který byl přibarven anilinovou, popř. methylenovou modří. Po přiklopení krycího sklíčka byl preparát krátce nahřán nad otevřeným plamenem a poté bylo krycí sklíčko opatrně přitlačeno preparační jehlou, tím došlo k vytěsnění vzduchových bublin (Fassatiová 1979). K determinaci entomopatogenních hub byl použit světelný mikroskop a odborná literatura (např. Domsch et al. 1980; Humber 1997; Samson 1974).

4.2.5. Enkapsulace entomopatogenních hub do Na-alginátových pelet

Principem enkapsulace biomasy hub do formy pelet byla reakce vodného roztoku alginátu sodného s kationty některých kovů (např. Ca^{++}). Výsledkem reakce bylo formování gelu, resp. gelového prostředí.

V běžné kultivačním systému využívaném pro produkci biomasy vláknitých hub (povrchová nebo submerzní kultivace na umělé živné půdě) byla vyprodukována potřebná biomasa houby, která byla ve specifickém poměru smíchána s 2 % roztokem alginátu sodného. Do směsi alginátu sodného a houby byly přidány nutriční aditiva usnadňující růst houby v případě jejich pozdější re-aktivace. Homogenizovaná komplexní směs (Na-alginát – houba – nutritivní aditivum) byla nakapána do roztoku chloridu vápenatého (0,25 M $CaCl_2$). V momentu kontaktu reagenční směsi s roztokem chloridu vápenatého došlo ke gelatinizaci povrchu a vytvoření primárních pelet tzv. „gelových kuliček". Primární pelety byly po dobu cca 1 – 2 hodin ponechány v roztoku $CaCl_2$ vytvrdit. Suché pelety jako finální produkt byl získán po vysušení primárních pelet aktivním proudem vzduchu při nižších teplotách.

Všechny druhy/kmeny entomopatogenních hub, které byly získány při monitoringu v jednotlivých studiích byly pro pozdější potřeby uloženy v mykologické sbírce katedry rostlinné výroby ZF JU ve formě suchých alginátových pelet umožňující dlouhodobé uchovávání druhů/kmenů hub za nízkých teplot (-20 až -24 °C). Alginátové pelety byly produkovány v systému, který se shoduje s výše uvedeným obecným postupem. Základní regenerační směs byla tvořena suspenzí konidií resp. blastospor s 2 % sodnou solí kyseliny albínové (SIGMA) a jemně mletými pšeničnými otrubami (Eyal et al. 1994).

4.3. Polyfaktoriální hodnocení entomopatogenních hub

Za účelem zjištění některých morfologických, produkčních nebo biologických charakteristik u náhodně vybraných kmenů entomopatogenních hub zařazených do testování byly navrženy „in vitro" a „in vivo" (bio)testy usnadňující výběr vhodného kmene entomopatogenní houby pro jeho případné využití v integrované ochraně rostlin. Všechny získané charakteristiky byly poté doplněny do databázového informačního systému (Grafický list 4).

4.3.1. Re-aktivace entomopatogenních hub z pelet a příprava konidiové suspenze

Kmen entomopatogenní houby byl aktivován přemístěním 4 – 6 ks alginátových pelet na povrch Petriho misky (60 mm) s 2 % vodním agarem a po 5 – 7 denní kultivaci v termostatu při teplotě 25 ± 1 °C a fotoperioda 0/24 hod. bylo možné pomocí vyžíhané laboratorní kličky přenést sporulující biomasu z povrchu pelety na agarizované živné médium (PDA).

Konidiová suspenze byla získána přelitím plně sporulující kultury entomopatogenní houby kultivované na agarizované živné půdě (PDA) při teplotě 25 ± 1 °C a fotoperiodě 0/24 hod po dobu 10 – 14 dní sterilním roztokem 0,05 % Tween 80 (Goettel, Inglis 1997). Konidiová suspenze (bez zbytků mycelia) byla po důkladném protřepání (Vortex) adjustovaná na standardní titr 1.10^7 konidií/ 1ml suspenze pomocí počítací komůrky – hemocytometru (Neubauerova vylepšená komůrka) (Grafický list 5).

4.3.2. In vitro testy

4.3.2.1. Standardní test klíčivosti – GI (Germination Index)

Cílem testu bylo stanovit, jak procentuální podíl vitálních resp. klíčících konidií – procento klíčivosti, tak i rychlost vývoje konidií až do závěrečné fáze (konidiogeneze) – stanoven index GI.

Konidiová suspenze (adjustovaná na titr $1{,}0.10^7$ konidií/ 1ml suspenze) byla pomocí vyžíhané laboratorní kličky nanesena ve formě kapek (20 kapek/ sklíčko) na povrch tenké agarové vrstvy (2 % vodní agar) na podložním sklíčku. Po zaschnutí nanesených kapek bylo podložní sklíčko uzavřeno do vlhké komůrky, která byla tvořena Petriho miskou (90 mm) s ovlhčeným filtračním papírem. Takto připravené vzorky byly uzavřeny do plastikových sáčků a inkubovány v předem vytemperovaném termostatu na teplotu 25 ± 1 °C a fotoperiodě 0/24 hod.. Vzorky byly hodnoceny vždy po 24 hodinových intervalech pomocí světelného mikroskopu až do fáze plné sporulace (index 3,0). Při vyhodnocování bylo vždy hodnoceno minimálně 100 konidií, kdy každé konidii byl přiřazen příslušný index GI (v rozsahu 0 – 3 v intervalu 0,5), charakterizující vývojový stav konidie (Tabulka 4.3 a Grafický list 6). Z takto vyhodnocených vzorků byl vypočítán index klíčivosti včetně směrodatné odchylky a procenta klíčivosti testovaného kmene (druhu), přičemž za klíčivé konidie se považují ty, které byly ohodnoceny indexem GI (0,50 a více) (Landa et al. 1994).

Tabulka 4.3: Hodnotící stupnice standardního laboratorního testu klíčivosti

Index	Charakteristika
0	- na konidii nejsou patrné žádné morfologické změny - konidie mají ve vzorku uniformní tvar
0,5	- konidie je zřetelně protáhlejší - na konidii je jednostranný klíček, v poměru přibližně 1: 0,5
1,0	- velikost klíčku je v poměru 1:1 k velikosti matečné konidie
1,5	- klíček je 2 – 3 x delší než matečná konidie, nebo - na matečné konidii jsou zřejmé 2 kratší klíčky
2,0	- klíček je více než 3 x tak dlouhý jako matečná konidie, nebo - vytváří se sekundární větvení, popřípadě - jsou vytvořeny dva dlouhé klíčky
2,5 [1)]	- počátek sporulace - na hyfách jsou patrné konidiofory bez konidií nebo s omezeným počtem konidií (specifické pro hodnocený druh houby např. na hyfách houby *P. fumosoroseus* jsou přítomny konifiofory s maximálně čtyřmi konidiemi (0 – 4 konidií na konidioforu)
3,0 [1)]	- plná sporulacena - na hyfách jsou zjištěny konidiofory s 5ti a více konidiemi (např. *P. fumosoroseus* vytváří dlouhé řetízky, u *B. bassiana* jsou konidie seskupeny do hroznu)

[1)] Index GI (2,5 – 3,0) bylo možné použít pouze u druhů entomopatogenních hub, které mohou realizovat celý vývojový cyklus na umělé živné půdě (např. *Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae, Paecilomyces fumosoroseus, Lecanicillium lecanii*)

4.3.2.2. Stanovení radiálního růstu

Záměrem (bio)testu bylo charakterizovat morfologii kmene z hlediska tvaru a plochy středové kultury za jednotku času.

Konidiová suspenze (adjustovaná na titr $1{,}0.10^7$ konidií/ 1ml suspenze) byla pomocí vyžíhané laboratorní kličky nanesena ve formě kapky na střed Petriho misky. Po zaschnutí kapky byla Petriho miska uzavřena v plastikovém sáčku a přemístěna do předem vytemperovaného termostatu na teplotu 25 ± 1 °C a fotoperiodě 0/24 hod.. Hodnocení a měření průměru středové kultury bylo provedeno po 14 dnech (bio)testu. Radiální průměr byl měřen pomocí školního pravítka minimálně u 5ti kultur od každé varianty. U každé kultury byly zjištěny čtyři rozměry s cílem co nejlépe demonstrovat radiální růst kultury. Z naměřených dat bylo poté možné vypočítá průměr a plochu středové kultury vyjádřenou v mm^2 (Landa et al. 2001).

4.3.2.3. Výtěžnost konidií na umělém médiu a/nebo přirozeném živném substrátu

Cílem tohoto testu bylo stanovit množství vyprodukovaných konidií při povrchové kultivaci entomopatogenních houby na umělém živném médiu (PDA) a/ nebo přirozeném živném substrátu (ječné kroupy).

Výtěžnost konidií na umělém médiu byla stanovena v návaznosti na (bio)test radiálního růstu (po 14 dnech kultivace). Hodnoceno bylo současně minimálně 5 středových kultur. Středové kultury byly pomocí skalpelu vyříznuty a houba i se zbytky agaru byla homogenizována v 200 ml vody pomocí kuchyňského mixeru. Výtěžnost konidií byla stanovena po naředění v poměru 1:10 (tzn. 1ml suspenze do 9 ml 0,05 % roztoku Tween 80) pomocí počítací komůrky – hematocymetru (Neubauerova vylepšená komůrka). Výsledná hodnota byla přepočítána na výtěžnost konidií z jedné kultury houby a z jednotky plochy (100 mm^2) (Landa at al.1994).

V případě stanovení produkce konidií na přirozeném substrátu bylo naváženo 50 g ječných krup do 250 ml Erlenmeyerovy baňky (pro každý kmen dvě opakování). Sterilní (navlhčené) kroupy byly inokulovány suspenzí konidií (adjustovanou na titr $1{,}0.10^7$ konidií/ 1ml suspenze). Po 14 denní kultivaci v klima-boxu, při teplotě 25 ± 1 °C a fotoperiodě 16/8 hod., byly konidie důkladně smyty z povrchu krup adekvátním množstvím vody. Po důkladné homogenizaci byla pomocí počítací komůrky – hematocymetru (Neubauerova vylepšená komůrka) stanovena produkce konidií, která byla vyjádřena na gram přirozeného živného substrátu (ječných krup).

4.3.2.4. Submersní kultivace a produkce blastospor

Cílem tohoto testu bylo zjistit, zda hodnocené kmeny jsou schopny produkovat blastopsory pomocí submersní kultivace a zároveň stanovit jejich produkčnost tedy množství vyprodukovaných blastospor.

Schopnost kmenů produkovat blastospory byla stanovena v 50 ml tekuté bramborovo-dextrózové půdě (potato dextrose broth, PDB) (DIFCO), která byla ve 250 ml Erlenmayerově baňce (pro každý kmen dvě opakování) sterilována v horkovzdušném sterilizátoru. Umělá živná půda byla poté inokulována 1 ml připravené konidiové suspenze (o koncentraci $1{,}0.10^7$ konidií/ 1ml suspenze). Takto připravené Erlenmayerovy baňky byly umístěny na reciprokou třepačku (250 rpm, amplituda 3) a kultivovány po dobu 5 dnů při teplotě 22 ± 2 °C. Pomocí počítací komůrky – hematocymetru (Neubauerova vylepšená komůrka) byla stanovena výtěžnost kmene, která byla přepočítána na produkci blastospor z 1 ml submerzní kultury (Landa at al.1994).

4.3.3. In vivo testy

4.3.3.1. Standardní laboratorní biotest na larvách molice skleníkové (*Trialeurodes vaporariorum*) – FDGI (Fungus Development and Growth Index)

Principem tohoto biotestu byla expozice časných larev (čtvrtého instaru) molice skleníkové (*T. vaporariorum*) testovanému kmenu entomopatogenní houby (patogena) v podmínkách sterilní vlhké komůrky s cílem stanovit průběh vývoje patogena pomocí indexové stupnice charakterizující klíčové fáze vývoje (Landa et al. 1994).

Larvy (puparia) molice skleníkové byly pro potřeby pokusu získány z povrchu listů, které byly zbaveny nečistot (např. medovice) krátkým smočením listů ve vlažné vodě s přídavkem detergentu (přípravek Jar). Po oschnutí listů byla puparia molice skleníkové opatrně přenesena do předem připravené kapky suspenze konidií (o standardním titru $1{,}0.10^7$ konidií/ 1ml suspenze) testovaného kmene na sterilním podložním sklíčku. Na jedno sklíčko bylo naneseno vždy 30 kapek testované suspenze (3 řady po 10 kapkách, podélně po celém sklíčku). Pupária (*T. vaporariorum*) byla umístěna po jednom do 25 kapek a zbývajících 5

kapek sloužilo jako kontrola. Po zaschnutí kapek byla sklíčka s larvami umístěna do vlhké komůrky tvořené Petriho miskou (90 mm) s vlhký filtračním papírem. Takto připravené pokusné jednotky byly po uzavření do plastikového sáčku umístěny do předem vytemperovaného termostatu (teplota 25 °C a fotoperioda 0/24 hod.). Vývoj patogena (kmene) byl hodnocen ve 24 hod. intervalech do závěrečné fáze (konidiogeneze), kdy každé larvě molice skleníkové byl přiřazen příslušný index (v rozmezí 0 – 3, v intervalu 0,5) (Tabulka 4.4 a Grafický list 7), který přesně specifikoval vývojovou fázi patogena na hostiteli.

Tabulka 4.4: Hodnotící stupnice standardního laboratorního biotestu FDGI

Status	Index	Charakteristika
Dormantní konidie	0	- na konidiích nejsou zřejmé žádné morfologické změny - konidie ve vzorku mají uniformní tvar
Aktivace konidií – patogen není přímo asociován s hostitelem	0,5	- na konidiích v interakční zóně kapky jsou zřetelné změny (velikos, tvar..) - v hodnocené populaci jsou přítomny naklíčené konidie, klíček je drobný, jednostranný a velikostí nepřesahuje velikost matečné konidie
	1,0	- velikost klíčku na konidiích v interakční kapce dosahuje v poměru k matečné konidii přibližně 1:1
Tvorba mycelia – parazitická fáze vývojového cyklu	1,5	- v okolí nebo na povrchu nymfy jsou přítomna hyfová vlákna, která jsou 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

4.3.3.2. Standardní laboratorní biotest na larvách zavíječe voskového (*Galleria mellonella*)

Principem tohoto biotestu bylo vystavení larev (3. – 4. instaru) zavíječe voskového (*G. mellonella*) testovanému kmenu entomopatogenní houby (patogenu) v podmínkách sterilní vlhké komůrky s cílem stanovit optimální délky trvání (bio)testu pro následné jednorázové vyhodnocení rychlosti vývoje u vybrané sady kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na larvách zavíječe voskového (*G. mellonella*).

Vstupní (bio)test

Pro vstupní test byly náhodně vybrány dva kmeny entomopatogenní houby *B. bassiana.*

Do kádinky s adekvátním množství konidiové suspenze (o titru $1{,}0.10^7$ konidií/ 1ml suspenze) bylo naráz ponořeno 20 ks larev zavíječe voskového (+1 „rezervní" larva). Po 20 vteřinách máčení byly larvy odděleny od suspenze pomocí skleněného trychtýře a po krátkém oschnutí byly umístěny vždy po třech kusech do předem připravené „vlhké komůrky", která byla tvořena Petriho miskou (průměr 60 mm) s adekvátně ovlhčeným filtračním papírem. Takto připravené pokusné jednotky byly uzavřeny do plastikového sáčku a umístěny do předem vytemperovaného termostatu (teplota 25°C, fotoperioda 0/24 hod.). Larvy zavíječe voskového byly hodnoceny pod binolupou pomocí indexové stupnice (v rozsahu 1 – 5;

interval 1) podle symptomů vývoje infekce a vitality larev (Tabulka 4.5). Larvy byly hodnoceny v pravidelných intervalech (každých 24 hodin) po dobu sedmi dnů. Infikované larvy s indexem 3 a výše byly považovány za „usmrcené" Larvy v kontrolní variantě byly ponořeny do sterilní destilované vody s 0,05 % Tween 80 (bez konidií patogena) a hodnoceny stejným způsobem. Na základě výsledků ze vstupního (bio)testu byla stanovena optimální doba pro hodnocení LT_{50} v následném hodnocení vybrané sady kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana*.

Jednorázové vyhodnocení (po 96 hodinách)

Stejným způsobem (viz. výše) byl založen a vyhodnocen pokus na vybrané sadě kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* s tím rozdílem, že kmeny byly hodnoceny pouze jednorázově po době, která byla stanovena jako optimální ve vstupním (bio)testu. (Bio)test na sadě kmenů byla založen v jeden den.

Tabulka 4.5: Hodnotící stupnice standardního laboratorního biotestu na larvách zavíječe voskového (*G. mellonella*)

Index vývoje	Vitalita larvy	Symptomy infekce na povrchu larvy
1	živá	- bez symptomů infekce
2		- melanizační skvrny (roztroušeně po těle, většinou méně než tři)
3	nehýbe se [2)]	- melanizační skvrny (větší počet často splývající)
4	(mrtvá)	- růst mycelia (nejčastěji v předělu článků těla nebo na panožkách)
5	mrtvá	- plně porostlá sporulujícím myceliem („rohlíček")

[2)] Larva se nepohybuje, ale je zřejmý pohyb hřbetní cévy nebo reakce larvy na podráždění např. štětečkem

4.3.4. Statistické hodnocení

Pro statistické vyhodnocení byl použit program STATISTIKA for Windows, ver. 6 (StatSoft, Inc., 2001). Základem pro vyhodnocení byla jednofaktorová analýza rozptylu („*Anylysis of variance*", ANOVA). Průkaznost diferencí mezi průměrnými hodnotami různých úrovní byla testována prostřednictvím „*Post-hoc comparison*" (Tukey HSD test).

4.4. Stanovení genetické variability kmenů entomopatogenních hub pomocí RAPD analýzy

Nezbytným předpokladem stanovení genetické variability kmenů entomopatogenních hub je izolace DNA (deoxyribonukleová kyselina). Metoda RAPD (polymorfismus náhodně amplifikované DNA) je jednou z metod založených na PCR (polymerázová řetězová reakce). Využívá toho, že do amplifikace vstupuje pouze jeden primer o délce několika nukleotidů. Princip metody je v tom, že se několikrát v celém úseku studované DNA stane, že primery nasednou na protiběžných řetězcích DNA v amplifikovatelné vzdálenosti od sebe. V tuto chvíli je umožněna amplifikace části DNA mezi nimi.

4.4.1. Extrakce DNA

Genomická DNA byla extrahována z 10 – 14 dnů staré povrchové kultury entomopatogenní houby pomocí komerčně používaného kitu Spin Plant Mini Kit (INVISOB). Principem této metody je purifikace DNA pomocí specialních mikrokolon, kde na první

koloně dochází k zachycení hrubých nečistot, na druhé koloně dochází k zachycení DNA a jejímu následnému vymytí elučním roztokem. Pro DNA extrakci bylo použito přibližně 60 mg biomasy houby. Izolované vzorky DNA byly uchovávány při teplotě – 20 °C.

4.4.2. RAPD analýza

Protokol RAPD analýzy (Endrychová 2004) byl modifikován z metodiky práce Williams et al. (1990). PCR reakce byla prováděna v objemu 25 µl.

Schéma pipetování:

- 1 µl templátové DNA
- 2,5 µl reakční pufru
- 2 µl dNTPs
- 2 µl primeru
- 0,2 µl DNA polymerázy (TaKaRa)
- dH_2O voda do objemu 25 µl

Amplifikace DNA probíhala v termocykleru s následujícími parametry: 93°C (5min) pro počáteční separaci DNA řetězců a 45 termálních cyklů: 92°C (1 min), 35 °C (2 min) a 72°C (3min). Termální cyklus byl zakončen elongační teplotou 72°C (10 min).

RAPD produkty byly analyzovány elektroforézou na 1,5 % agarózových gelech (v TBE pufru) a detekovány barvením ethidium bromidem. Doba trvání elektroforézy byla 2,5 hodiny při napětí 80 V. Gely byly fotografovány pod UV světlem pomocí digitálního fotoaparátu a zpracovány digitální obrazovou analýzou.

4.4.3. Digitální obrazová analýza gelů a hodnocení dat

Pro vyhodnocování dat byl použit především speciální software – *BioProfil 1D++* určený pro analýzu a objektivní porovnávání jednorozměrných elektroforetických spekter.

Korekce obrázků gelů byly prováděny za použití speciálního grafického software *Adobe Photoshop 7.0 CE.*

4.4.4. Clusterová analýza

Názorným výstupem analýzy spekter je možnost seskupení („sgrupování") podobných spekter na základě výpočtu *podobnostní matice* – koeficientů podobnosti každého vzorku se všemi ostatními z vybrané databáze. Výsledky matice pak byly podrobeny clusterové analýze (*UPGMA – Unweighted Pair Group Method Using Averages*) a výsledek byl poté zobrazen jako *dendrogram.*

4.4.5. Statistické zpracování dat

Pro účely komplexního hodnocení RAPD spekter bylo využito statistického zpracování dat. Metoda digitální analýzy pak představovala prostředek pro primární zpracování elektroforeogamů a zaznamenání pozice pruhů na gelu. Na základě takto zjištěných a korelovaných pruhů na gelu bylo možné sestavit matice přítomnosti/ nepřítomnosti pruhu v dané zóně a provést statistické hodnocení (výpočty genetických vzdáleností či podobností a sestavení dendrogramu).

4.5. Předaplikační studie

4.5.1. Hodnocení kompatibility kmenů entomopatogenních hub s organominerálním hnojivem Beta-liq

Principem tohoto hodnocení bylo porovnat výsledky „in vitro" (bio)testů vybraných kmenů entomopatogenních hub v kombinaci s přípravkem Beta-liq s kontrolní variantou (kapitola 4.3), s cílem využít organominrálního hnojiva Beta-liq jako „nosiče" selektovaných kmenů entomopatogenních hub při jejich introdukci do půdy.

Ve všech testech byla použita konidiová suspenze, která byla adjustována na titr 1.10^7 konidií/ 1 ml suspenze v kombinaci s organominerálním hnojivem BETA-LIQ® (REDAM, Smržice s.r.o.) o koncentraci 10 % a 50 % (vstupní test) a následné koncentrační řadě – 50 %, 70 % a 90 % přípravku Beta-liq.

Specifikace organominerálního hnojiva Beta-liq:

Organominerální kapalné hnojivo BETA-LIQ® (chráněné v ČR patentem č. 278603) bylo vyvinuto za účelem řešení problémů v nedostatku organických látek a těžce rozložitelných posklizňových zbytků na pozemku. Hnojivo pochází ze zpracovaných výpalků řepné melasy a neobsahuje toxické ani škodlivé sloučeniny. Má specifickou hnědočernou barvu, typickou vůni, hustotu 1,25 – 1,45 g/ 1ml, sušinu 45 – 70 %. Obsah živin (BETA-LIQ® 30.1.60): sušina (50 – 60 %), organické sloučeniny (26 %), organ. N. (2 – 3 %), NH^{4+} (0,5 %), K_2O (5 – 6 %), P_2O_5 (0,06 %), Ca^{2+} (2,2 %), Mg^{2+} (0,2 %) a obsah stopových prvků (v ppm): Fe – 150, Zn – 50, Mn – 40, Cu – 25.

4.5.2. Hodnocení životaschopnosti kmenů entomopatogenních hub po krátkodobém zamražení

Principem tohoto testu bylo zhodnotit životaschopnost konidií entomopatogenních hub před a po zamražení pomocí standardního testu klíčivosti.

Připravená konidiová suspenze (o titr 1.10^8 konidií/ 1 ml suspenze) byla přemístěna do mrazáku (- 20 °C), kde byla ponechána po dobu 14 dní. Po této době byla zmražená suspenze vyjmuta a ponechána při pokojové teplotě do doby jejího úplného rozmražení. Výsledky standardního testu klíčivosti kontrolní a rozmražené varianty byly poté porovnány.

4.5.3. Produkce biomasy infekčních propagulí entomopatogenních hub a jejich úprava

Biomasa hub byla vyprodukována standardními produkčními postupy (4.3.2.3 – 4) v různě velkých objemech (viz. šarže 1 – 5) a po adjustaci na titr 1.10^6 spor/ 1 ml byla biomasa kmene koncentrována odstředěním (3 500 ot./ s) po dobu 5 minut za pokojové teploty. Po oddělení čirého natantu byl koncentrát konidií/ blastospor (pasta) naředěn na titr 1.10^6 spor/ 1 ml a porovnáním s původním objemem byla stanovena výtěžnost koncentrátu. Pro uchování biomasy byl koncentrát standardním způsobem zamražen (- 20 °C).

4.6. Lokalita odběru půdních vzorků a způsob aplikace entomopatogenních hub na pokusné lokalitě

Lokalita Smržice (okres Prostějov)

- Z každé z pěti parcelek (18 x 100 m) byl odebrán směsný půdní vzorek
- Entomopatogenní houby nebyly aplikovány.

Lokalita Troubsko (okres Brno-venkov)

- Pokusné stanoviště se nachází na pozemku Výzkumného ústavu pícninářského s.r.o. (VÚP). Z každé z 24 pokusných parcelek (2,5 x 3,5 m) vzájemně oddělené 0,5 m širokým pruhem byl (na konci srpna) odebrán jeden směsný půdní vzorek
- Hodnocení vlivu aplikovaného kmene entomopatogenní houby v kombinaci s přípravkem Beta-liq (na testovací plodinu, na rozklad slámy, produkci CO_2, obsah oxidovatelného uhlíku a na strukturní stav půdy) stanovili pracovníci VÚP s.r.o. v laboratorním modelovém inkubačním a následném vegetačním pokusu.

Lokalita Pěnčín (okres Prostějov)

- Pokus byl realizován na pozemku zemědělského podniku UNIAGRIS Pěnčín s.r.o. viz. Obrázek 4.1
- Z každé z pěti parcelek byl před aplikací (I. pol. srpna) entomopatogenních hub v kombinaci s přípravkem BETA-LIQ (tank mix) odebrán jeden směsný půdní vzorek z každé poloviny parcelky. Stejným způsobem byly odebrány směsné půdní vzorky 1 měsíc a 2,5 měsíce po záměrné re-introdukci entomopatogenní houby (*M. anisopliae* a *B. bassiana*) a introdukci jednoho kmene mykoparazitické houby *Coniothyrium minitans* (komerční přípravek Contans®).
- Aplikace byla realizována pomocí velkokapacitního postřikovače (TERRA – GATOR 1603 T, FIRMY AG-CHEM) na povrch půdy se strništěm a se zbytky slámy ozimé pšenice (*Triticum aestivum*). Velikost každé parcelky byla určena záběrem aplikátoru (18 m) viz. Schéma 4.1. Ihned po aplikaci byl povrch půdy zpracován radličkovým kultivátorem a na pozemek byla následně vyseta ozimá řepka (*Brasica napus*).
- Na celém pozemku byla aplikována dávka organominerálního hnojiva (2 t/ ha). V kombinaci s přípravkem Beta-liq byla aplikována entomopatogenní houba *M. anisopliae* (Man P4) v dávce 4.10^7 konidií/ 1ha a *B. bassiana* (Bba P4) v dávce $2{,}2.10^7$ konidií/ 1ha.

Obrázek 4.1: Místo založení pokusu na pozemku společnosti UNIAGRIS, Pěnčín je na obrázku označeno křížkem

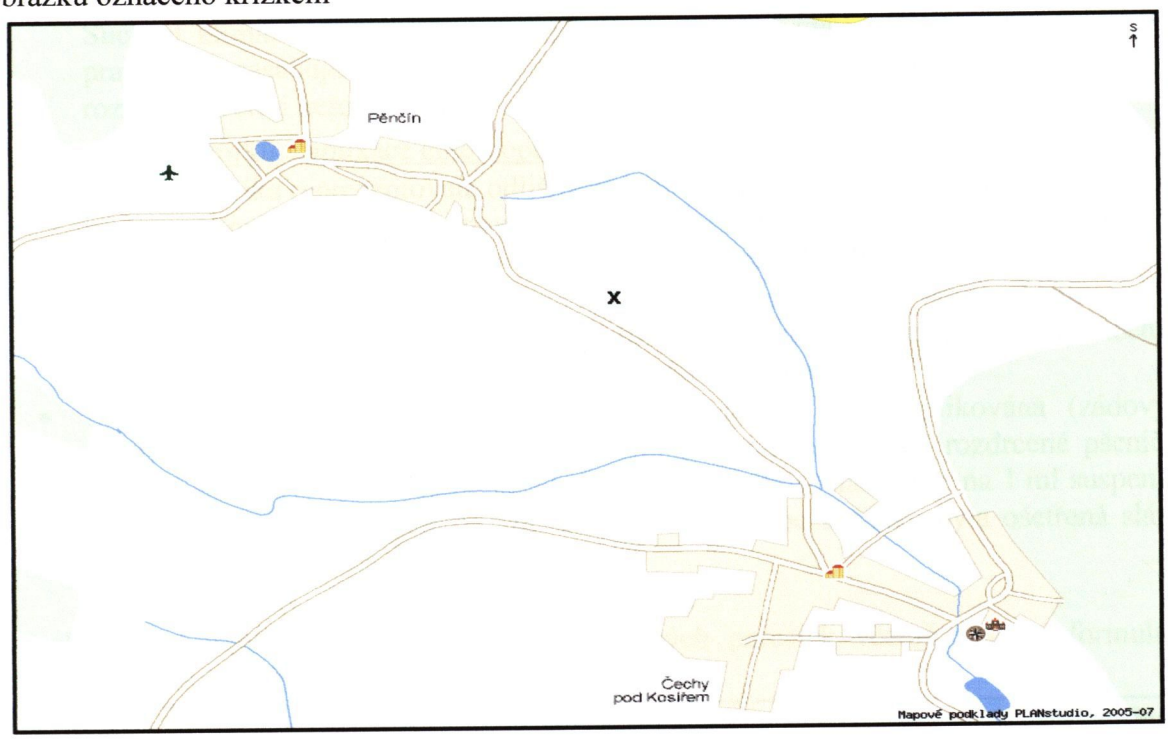
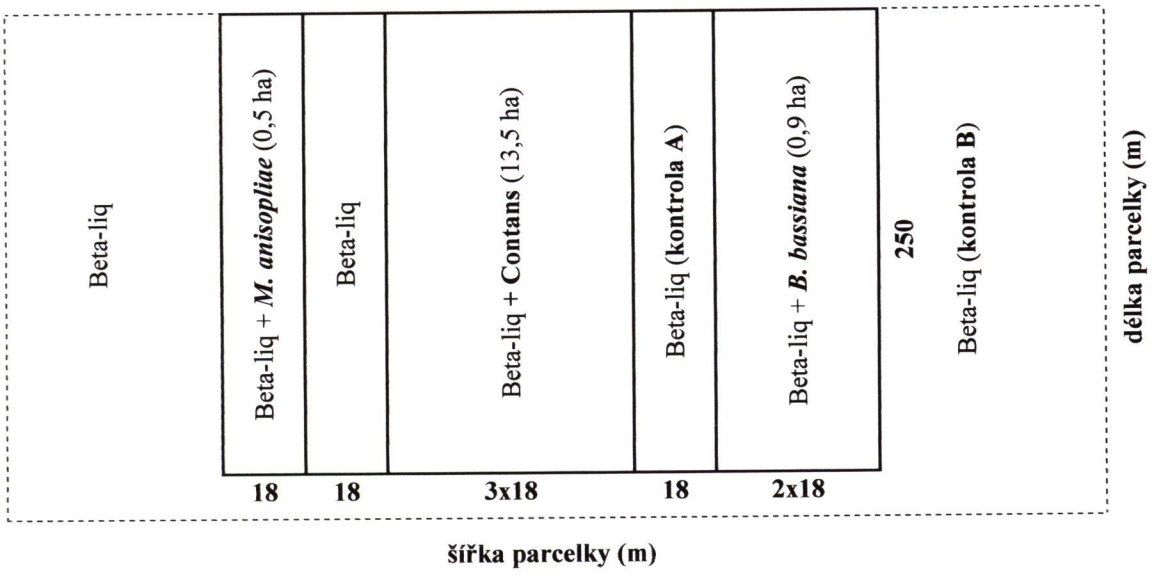


Schéma 4.1: Schématické znázornění jednotlivých parcelek na lokalitě Pěnčín, kde byly aplikovány vybrané kmeny vláknitých hub



Lokalita Žabčice (okres Brno-venkov)

Charakteristika lokality (Školní zemědělský podnik MZLU v Žabčicích u Brna):

- Půdy v katastru pracoviště jsou neutrální až slabě kyselé s nedostatkem humusu. Půdy jsou různého složení, a to od půd písčitých, kterých je převaha, až po půdy jílovité.
- Na území pracoviště Žabčice se nejčastěji vyskytují genetické půdní typy černozemě, mírně podzolované drnové půdy a nivní půdy glejové.
- Pozemky jsou rovinatého charakteru s průměrnou nadmořskou výškou 185 m.

- Statek leží v jihomoravské suché oblasti s typickým vnitrozemským klimatem s průměrnými ročními srážkami 450 – 550 mm a průměrnou roční teplotou 9,3 °C. Suchost klimatu zvyšují větry, které způsobují velký výpar půdní vláhy. Do oblasti pracoviště zasahuje též dešťový stín. Vodní srážky ve vegetačním období jsou rozloženy velmi nerovnoměrně.

Odběr půdních vzorků a aplikace entomopatogenní houby:

- Každá parcelka reprezentovala odlišný způsob zpracování půdy (Tabulka 4.6) a osevní postup. V průběhu monitoringu entomopatogenních hub bylo vždy odebráno po jednom směsném vzorku z každé z 8 pokusných parcelek (10 x 2 m).
- Před záměrnou aplikací entomopatogenní houby byl uskutečněn vstupní monitoring (v pol. srpna) a po aplikaci kmene byl realizován první monitoring (po 7 týdnech) a druhý monitoring (po 8 měsících) v dubnu následujícího roku.
- Entomopatogenní houba *B. bassiana* (kmen M062) byla aplikována (zádovým postřikovačem) spolu s přípravkem Beta-liq (2 t/ ha) na povrch rozdrcené pšeničné slámy v množství 5 litrů suspenze (o titru 2.10^7 konidií/ blastospor na 1 ml suspenze) tj. 5.10^9 konidií/ blastospor na $1m^2$ a bezprostředně po aplikaci byla ošetřená sláma rotavátorem zapravena do půdy.

Tabulka 4.6: Přehled a charakteristika jednotlivých parcelek včetně použité formulace entomopatogenní houby *B. bassiana* (kmen M062)

Vzorek číslo	Parcela	Charakteristika	Formulace houby
1.	Ao3-I	Beta-liq bez fungicidu - oz. pšenice - klasická argotech.	Blastospory
2.	Ao3-II	Beta-liq bez fungicidu - oz. pšenice - minimal. argotech.	Blastospory
3.	Ao3-I	Beta-liq bez fungicidu - oz. pšenice - klasická argotech.	Konidie
4.	Ao3-II	Beta-liq bez fungicidu - oz. pšenice - minimal. argotech.	Konidie
5.	Ao4-I	Beta-liq bez fungicidu - oz. pšenice - klasická argotech.	Blastospory
6.	Ao4-II	Beta-liq bez fungicidu - oz. pšenice - minimal. argotech.	Blastospory
7.	Ao4-I	Beta-liq bez fungicidu - oz. pšenice - klasická argotech.	Konidie
8.	Ao4-II	Beta-liq bez fungicidu - oz. pšenice - minimal. argotech.	Konidie

4.7. Základní přístrojové vybavení použité v pokusech

Tabulka 4.7: Základní přístrojové vybavení použité v pokusech

Název zařízení	Typ
binolupa	STEMI SV 11
digitální fotoaparát	Canon EOS 300D (objektiv EF-S 18-55 mm f/3,5-5-6)
flowbox	BIOHAZARD EN 12469 CLEAN AIR
horkovzdušný sterilizátor	STERICELL 22
světelný mikroskop	NIKON LABOPHOT - 2
termocykler	PTC – 100 (MJ RESEARCH)
termostat	BIOLOGICAL TERMOSTAT BT 120
třepačka	HEIDOLPH UNIMAX 2010

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

Výsledky v experimentální části byly seřazeny v návaznosti na jednotlivé etapy předcházející introdukci vhodného kmene entomopatogenní houby do půdy v programu integrované produkce rostlin. Každá kapitola byla dále členěna podle geografického původu zkoumané lokality:

- Monitoring a izolace entomopatogenních hub z půdy pomocí izolačních technik (kapitola 5.1);
- Polyfaktoriální hodnocení a výběr kmene pomocí „in vitro" a „in vivo" (bio)testů (kapitola 5.2 a 5.3);
- Předaplikační studie zaměřená na kompatibilitu kmene s nosičem Beta-liq a úpravu vyprodukované biomasy (kapitola 5.4)
- Modelová studie - hodnotící persistenci záměrně introdukovaného kmene entomopatogenní houby do půdy (kapitola 5.5)

5.1. Monitoring přirozeného výskytu vláknitých entomopatogenních hub (Deuteromycotina resp. Mitosporické houby, Hyphomycetes, Moniliales) v půdě

První etapa předcházející využití „autochtonních" kmenů entomopatogenních hub v programech integrované ochrany rostlin je monitoring diverzity a četnosti výskytu těchto přirozeně se vyskytujících regulačních zdrojů hmyzích škůdců v půdě na úrovni druhu a kmene (Grafický list 1). Z tohoto důvodu byla většina izolovaných kmenů entomopatogenních hub imobilizována ve formě alginátových pelet a uložena v mykologické sbírce Katedry rostlinné výroby ZF JU v Českých Budějovicích

5.1.1. Plošný monitoring přirozeného výskytu vláknitých entomopatogenních hub v půdě na území jihočeského regionu

Cílem následující studie bylo navázat na dříve realizovaný velkoplošný monitoring entomopatogenních hub na území jihočeského regionu (Landa et al. 2002), doplnit chybějící místa v síti lokalit odběru a při monitoringu entomopatogenních hub v půdě se zaměřit na lokality s porostem obilovin.

Na území jihočeského regionu (rozloha regionu cca 10 tis km^2) bylo celkem odebráno 113 půdních vzorků ze 65 lokalit (Tabulka 5.1). Půdní vzorky byly odebrány z orné půdy v porostech pšenice ozimé (40,7 % ze 113 půdních vzorků), ječmene ozimého (17,7 %), ječmene jarního (12,4 %), žita (13,0 %) a ovsa (11,5 %). Půdní vzorky představující směsi obilovin nebo obilovinu jako podsev byly zastoupeny pouze v 4,4 %.

Přítomnost entomopatogenních hub byla detekována ve 108 půdních vzorcích (95,6 %) v celkovém počtu 197 izolovaných kmenů náležejících do třídy Hyphomycetes, které reprezentovaly 5 druhů v rámci 3 rodů Mitosporických hub. Nejfrekventovanějším druhem entomopatogenní houby byl druh *Paecilomyces lilacinus* se 104 izolovanými kmeny (v 92,1 % všech odebraných půdních vzorků respektive 52,8 % ze všech kmenů, které byly izolovány) a druh *Metarhizium anisopliae* (67 kmenů, 67,8 %, resp. 34,0 %). Druh *Beauveria bassiana* byl izolován v počtu 16 kmenů (15,6 %, resp. 8,1 %). Nejméně četným druhem

v analyzovaných půdních vzorcích byl *Paecilomyces carneus* (6 kmenů, 5,6 %, resp. 3,1 %) a *Paecilomyces fumosoroseus* (4 kmeny, 3,8 %, resp. 2,0 %) (Tabulka 5.2 – 5.8).

Použití selektivního média s fungicidní složkou dodine (SM a.i. dodine) (Tabulka 5.9 – 5.14) bylo vhodným doplňkem k metodě využívající živé návnady (GBM). Z celkového počtu kmenů entomopatogenních hub, které byly uloženy do mykologické sbírky bylo 20 % kmenů izolováno pouze pomocí SM a.i. dodine (Tabulka 5.1). SM a.i. dodine umožňovalo izolovat druhy entomopatogenních hub jako např. *P. lilacinus* nebo *P. carneus*, které nebyly detekovány pomocí „živé návnady". V případě druhu *B. bassiana* byla zaznamenána vyšší citlivost u metody využívající živých larev (*G. mellonella*) oproti SM a.i. dodine. Obě metody se ukázaly být obdobně vnímavé k druhu *M. anisopliae*, jak je zřejmé z porovnání obou metod v tabulce (Tabulka 5.2 – 5.8). Četnost výskytu entomopatogenních hub ve směsných půdních vzorcích bylo možné vyjádřit počtem kolonií tvořících se na SM a.i. dodine po sedmi popř. deseti dnech tzv. CFU (Colony Forming Units) (Tabulka 5.9 – 5.14). Pomocí SM a.i. dodine byla zaznamenána nejvyšší četnost výskytu u druhu *P. lilacinus*, kdy byl zaznamenán průměrný počet 25,5 CFU/ Petriho misku (to představuje $2{,}6.10^3$ CFU/ 1ml půdního vzorku) oproti např. 4,1 CFU/ Petriho misku (tj. $4{,}1.10^2$ CFU/ 1ml) u druhu *M. anisopliae* nebo 1,4 CFU/ Petriho misku (tj. $1{,}4.10^2$ CFU/ 1ml půdního vzorku) u druhu *B. bassiana*. V některých půdních vzorcích byla na Petriho misce zaznamenána hodnota CFU mnohonásobně převyšující běžný počet CFU/ Petriho misku, např. ve vzorku s porostem pšenice ozimé na lokalitě Kamenný Újezd (České Budějovice) byl zaznamenán u druhu *B. bassiana* počet 246 CFU z jedné Petriho misky (tj. $2{,}5.10^4$ CFU/ 1ml půdního vzorku). To by mohlo být vysvětleno např. sekundární sporulací izolované houby, ale vzhledem k tomu, že počet CFU/ Petriho misku byl počítán 7. popř. 10. den kontroly, zdá se být pravděpodobnějším vysvětlením odběr půdního vzorku v místě přirozené sporulace tohoto druhu na přirozeném hostiteli (kadáveru).

Z výsledků plošného monitoringu entomopatogenních hub v porostech obilovin nevyplývá žádná závislost mezi počtem nebo druhem detekovaných entomopatogenních hub a pěstovanou obilovinou. Jednoznačně nelze ani stanovit hranici citlivosti u GBM vyjádřenou počtem CFU/ Petriho misku. Lze pouze konstatovat, že obě metody se navzájem doplňují a každá z obou technik je významná při hledání nových, potenciálně využitelných kmenů entomopatogenních hub v programu integrované ochrany rostlin. Jednoznačným přínosem monitoringu bylo obohacení mykologické sbírky Katedry rostlinné výroby ZF JU v Českých Budějovicích o nové kmeny z dosud neprozkoumaných lokalit v jihočeském regionu a potvrzení velké druhové diverzity entomopatogenních hub na zkoumaném území.

Tabulka 5.1: Výskyt entomopatogenních hub v jednotlivých okresech jihočeského regionu v půdě a způsob izolace [3)]

Okres	Lokalita	Počet odebraných vzorků	Způsob izolace	Druh odizolované houby	Označení ve sbírce
ČESKÉ BUDĚJOVICE	Hůrky	4	GBM	*M. anisopliae*	M416, M417
	Boršov nad Vltavou	1	GBM	*B. bassiana*	M448
	Bzí	3	GBM	*M. anisopliae*	M423
			SM a.i. dodine	*M. anisopliae*	M422
	Dobčice	1	GBM	*B. bassiana*	M493
	Dol. Bukovsko	2	–	–	–
	Dubné	1	*GBM*	*B. bassiana*	M491
			SM a.i. dodine	*P. fumosoroseus*	M490
	Hluboká nad Vltavou	2	*GBM*	*M. anisopliae*	M446
			GBM	*B. bassiana*	M445
			SM a.i. dodine	*B. bassiana*	M447
	Jarošovice	2	*GBM*	*M. anisopliae*	M424
			GBM	*B. bassiana*	M425
	Kamenný Újezd	1	*GBM*	*B. bassiana*	M449
	Kolný	1	SM a.i. dodine	*M. anisopliae*	M468
	Ločenice	1	–	–	–
	Mazelov	2	SM a.i. dodine	*M. anisopliae*	M420
	Munice	2	–	–	–
	Mydlovary	1	*GBM*	*M. anisopliae*	M444
	Něchov	3	*GBM*	*M. anisopliae*	M460, M463
			SM a.i. dodine	*M. anisopliae*	M461
			GBM	*B. bassiana*	M462
	Nuzice	1	*GBM*	*M. anisopliae*	M426
	Olešník	1	SM a.i. dodine	*M. anisopliae*	M489
			GBM	*B. bassiana*	M488
	Otěvek	2	*GBM*	*M. anisopliae*	M464, M465
	Radonice	2	*GBM*	*M. anisopliae*	M421
	Slověnice	2	SM a.i. dodine	*M. anisopliae*	M418
	Strážkovice	2	*GBM*	*M. anisopliae*	M466
	Střížov	1	SM a.i. dodine	*M. anisopliae*	M467
	Temelín	1	SM a.i. dodine	*M. anisopliae*	M487
	Vidov	1	–	–	–
	Záboří	1	SM a.i. dodine	*M. anisopliae*	M492
JINDŘICHŮV HRADEC	Březina	2	SM a.i. dodine	*M. anisopliae*	M473
	Červená Lhota	1	SM a.i. dodine	*M. anisopliae*	M472
			GBM	*B. bassiana*	M471
	Smržov	2	–	–	–
	Záblatí	2	*GBM*	*M. anisopliae*	M419
PRACHATICE	Boubská	1	*GBM*	*M. anisopliae*	M499
	Dol. Nekvasovice	1	*GBM*	*P. fumosoroseus*	M497
	Husinec	2	SM a.i. dodine	*M. anisopliae*	M496
	Lázniště	2	SM a.i. dodine	*B. bassiana*	M501
			GBM	*M. anisopliae*	M502
	Lčovice	1	*GBM*	*M. anisopliae*	M498
	Lhenice	1	*GBM*	*B. bassiana*	M494
	Nová Hospoda	2	*GBM*	*M. anisopliae*	M442
			SM a.i. dodine	*M. anisopliae*	M443
	Tisovka	1	–	–	–
	Vícemily	2	*GBM*	*M. anisopliae*	M500
	Záblatí	1	*GBM*	*M. anisopliae*	M503
	Zdenice	2	*GBM*	*M. anisopliae*	M495

Pokračování tabulky 5.1

Okres	Lokalita	Počet odebraných vzorků	Způsob izolace	Druh odizolované houby	Označení ve sbírce
TÁBOR	Bradáčov	1	SM a.i. dodine	*M. anisopliae*	M477
	Hamr	2	*GBM*	*M. anisopliae*	M469, M470
	Hlasivo	3	SM a.i. dodine	*M. anisopliae*	M479
			GBM	*P. fumosoroseus*	M504
			GBM	*M. anisopliae*	M480
	Hlavatce	1	*GBM*	*M. anisopliae*	M483
	Hlinice	1	SM a.i. dodine	*M. anisopliae*	M481
	Choustník	2	SM a.i. dodine	*M. anisopliae*	M475
			SM a.i. dodine	*M. anisopliae*	M474
	Kamenný Dvůr	2	*GBM*	*M. anisopliae*	M428
			GBM	*M. anisopliae*	M427
	Košice	2	SM a.i. dodine	*M. anisopliae*	M482
	Nuzbely	2	SM a.i. dodine	*M. anisopliae*	M476
	Rodná	1	*GBM*	*P. fumosoroseus*	M478
	Stádlec	2	*GBM*	*M. anisopliae*	M433
			GBM	*B. bassiana*	M432
			GBM	*M. anisopliae*	M434
	Třebelice	3	*GBM*	*M. anisopliae*	M431
			GBM	*M. anisopliae*	M429
			GBM	*M. anisopliae*	M430
	Zálší	2	*GBM*	*M. anisopliae*	M486
			GBM	*B. bassiana*	M484, M485
PÍSEK	Milenovice	1	–	–	–
	Nový Dvůr	2	*GBM*	*M. anisopliae*	M439
			GBM	*M. anisopliae*	M440
	Oslov	2	*GBM*	*M. anisopliae*	M437
			GBM	*M. anisopliae*	M438
	Sepekov	2	*GBM*	*M. anisopliae*	M435
	Velká	2	*GBM*	*M. anisopliae*	M436
	Žďár	2	*GBM*	*M. anisopliae*	M441
ČESKÝ KRUMLOV	Bohdalovice	1	–	–	–
	Domoradice	2	–	–	–
	Hněvanov	1	*GBM*	*M. anisopliae*	M453
	Hor. Třebonín	2	*GBM*	*M. anisopliae*	M450
	Chabičovice	2	*GBM*	*M. anisopliae*	M455
			SM a.i. dodine	*M. anisopliae*	M456
	Markvartice	2	*GBM*	*M. anisopliae*	M459
			GBM	*B. bassiana*	M458
			GBM	*M. anisopliae*	M457
	Přídolí	1	–	–	–
	Rožmitál na Šumavě	1	*GBM*	*M. anisopliae*	M454
	Suš	1	*GBM*	*M. anisopliae*	M452
	Větřní	1	–	–	–

[3] Pokud byl stejný druh entomopatogenní houby detekován pomocí obou izolačních technik byl přednostně uložen kmen izolovaný pomocí *Galleria* bait method (GBM) ve sbírce Kmenů katedry rostlinné výroby ZF JU v Českých Budějovicích pod označením uvedeným v tabulce 5.1.

Tabulka 5.2: Výskyt entomopatogenních hub v půdě sbíraných z polí s ozimím ječmenem

Druh houby	Počet půdních vzorků	Půdní vzorky s houbou		*Galleria* bait method		SM a.i. dodine	
		Počet	%	Počet	%	Počet	%
P. lilacinus	20	19	95,0	0	0,0	19	95,0
M. anisopliae	20	15	75,0	10	50,0	10	50,0
B. bassiana	20	2	10,0	2	10,0	0	0,0
P. carneus	20	2	10,0	0	0,0	2	10,0
P. fumosoroseus	20	0	0,0	0	0,0	0	0,0

Tabulka 5.3: Výskyt entomopatogenních hub v půdě sbíraných z polí s ječmenem jarním

Druh houby	Počet půdních vzorků	Půdní vzorky s houbou		*Galleria* bait method		SM a.i. dodine	
		Počet	%	Počet	%	Počet	%
P. lilacinus	14	11	78,57	0	0,00	11	78,57
M. anisopliae	14	9	64,29	5	35,71	8	57,14
B. bassiana	14	2	14,29	2	14,29	0	0,00
P. carneus	14	1	7,14	0	0,00	1	7,14
P. fumosoroseus	14	1	7,14	1	7,14	0	0,00

Tabulka 5.4: Výskyt entomopatogenních hub v půdě sbíraných z polí s pšenicí ozimou

Druh houby	Počet půdních vzorků	Půdní vzorky s houbou		*Galleria* bait method		SM a.i. dodine	
		Počet	%	Počet	%	Počet	%
P. lilacinus	46	43	93,48	0	0,00	43	93,48
M. anisopliae	46	21	45,65	11	23,91	17	36,96
B. bassiana	46	6	13,04	6	13,04	2	4,35
P. carneus	46	1	2,17	0	0,00	1	2,17
P. fumosoroseus	46	1	2,17	0	0,00	1	2,17

Tabulka 5.5: Výskyt entomopatogenních hub v půdě sbíraných z polí s žitem

Druh houby	Počet půdních vzorků	Půdní vzorky s houbou		*Galleria* bait method		SM a.i. dodine	
		Počet	%	Počet	%	Počet	%
P. lilacinus	15	14	93,33	0	0,00	14	93,33
M. anisopliae	15	9	60,00	9	60,00	7	46,67
B. bassiana	15	2	13,33	1	6,67	1	6,67
P. carneus	15	1	6,67	0	0,00	1	6,67
P. fumosoroseus	15	2	13,33	2	13,33	0	0,00

Tabulka 5.6: Výskyt entomopatogenních hub v půdě sbíraných z polí s ovsem

Druh houby	Počet půdních vzorků	Půdní vzorky s houbou		*Galleria* bait method		SM a.i. dodine	
		Počet	%	Počet	%	Počet	%
P. lilacinus	13	12	92,31	0	0,00	12	92,31
M. anisopliae	13	8	61,54	7	53,85	5	38,46
B. bassiana	13	3	23,08	2	15,38	2	15,38
P. carneus	13	1	7,69	0	0,00	1	7,69
P. fumosoroseus	13	0	0,00	0	0,00	0	0,00

Tabulka 5.7: Výskyt entomopatogenních hub v půdě sbíraných z polí s ostatními plodinami [3)]

Druh houby	Počet půdních vzorků	Půdní vzorky s houbou		*Galleria* bait method		SM a.i. dodine	
		Počet	%	Počet	%	Počet	%
P. lilacinus	5	5	100,00	0	0,00	5	100,00
M. anisopliae	5	5	100,00	4	80,00	3	60,00
B. bassiana	5	1	20,00	1	20,00	0	0,00
P. carneus	5	0	0,00	0	0,00	0	0,00
P. fumosoroseus	5	0	0,00	0	0,00	0	0,00

[3)] např. oves s podsevem jetele, ječmen s podsevem jetele, oves s pšenicí ozimou atd.

Tabulka 5.8: Frekvence výskytu entomopatogenních hub v půdě sbíraných z polí s různou obilovinou.

Plodina	Půdní vzorky s entomoptogenní houbou (%)				
	P. lilacinus	***M. anisopliae***	***B. bassiana***	***P. carneus***	***P. fumosoroseus***
ječmen oz.	95,00	75,00	10,00	10,00	0
ječmen j.	78,57	64,29	14,19	7,14	7,14
pšenice oz.	93,48	45,65	13,04	2,17	2,17
žito	93,33	60,00	13,33	6,67	13,33
oves	92,31	61,54	23,08	7,69	0
ostatní plodiny	100	100	20,00	0	0
průměr (%)	92,12	67,75	15,62	5,61	3,78
±STDV	± 6,5486	±16,7908	± 4,4725	± 3,4243	± 4,9669

Tabulka 5.9: Četnost výskytu entomopatogenních hub (počet CFU) detekovaná pomocí SM a.i. dodine na jednotlivých lokalitách s porostem obiloviny v okrese České Budějovice

Okres	Lokalita odběru	Počet odebraných vzorků	Počet kultur (CFU) entomopatogenních hub detekovaných pomocí PDA s dodine ve vzorku s porostem obiloviny																													
			ječmen ozimý					**ječmen jarní**					**pšenice ozimá**					**žito**					**oves**					**ostatní**				
			Pli	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*
ČESKÉ BUDĚJOVICE	Hůrky	**4**			–					–			67	0	0	0	0			–			3	0	0	0	0			–		
													147	1	0	0	0						26	0	0	0	0					
	Boršov nad Vltavou	**1**			–			48	0	0	0	0			–					–					–					–		
	Bzí	**3**	9	0	0	0	0			–			1	3	0	0	0	18	3	0	0	0			–					–		
	Dobčice	**1**			–					–					–					–			81	0	35	0	0			–		
	Dol. Bukovsko	**2**			–					–			12	0	0	0	0			–					–					–		
													8	0	0	0	0								–							
	Dubné	**1**			–					–			10	0	4	0	3			–					–					–		
	Hluboká nad Vltavou	**2**	13	0	0	0	0			–					–					–			36	0	1	0	0			–		
	Jarošovice	**2**			–					–					–			4	2	0	0	0			–					–		
																		7	0	0	0	0											
	Kamenný Újezd	**1**			–					–			0	0	246	0	0			–					–					–		
	Kolný	**1**			–					–			29	1	0	0	0			–					–					–		
	Ločenice	**1**			–			54	0	0	0	0	–							–					–					–		
	Mazelov	**2**	3	1	0	0	0			–			6	0	0	0	0			–					–					–		
	Munice	**2**			–					–			14	0	0	0	0			–					–					–		
													0	0	0	0	0																
	Mydlovary	**1**	2	3	0	0	0			–										–					–					–		
	Něchov	**3**	18	0	0	0	0	61	1	0	0	0	26	0	0	0	0			–					–			62	1	0	0	0
	Nuzice	**1**			–					–										–			56	0	0	0	0			–		
	Olešník	**1**			–					–			47	2	0	0	0			–					–					–		
	Otěvek	**2**			–					–			8	0	0	0	0			–			4	2	0	0	0			–		
	Radonice	**2**			–					–			32	0	0	0	0	9	0	0	0	0			–					–		
	Slověnice	**2**	8	0	0	0	0			–			47	1	0	0	0			–					–					–		
	Strážkovice	**2**			–					–			3	0	0	0	0			–					–					–		
													2	0	0	0	0																
	Střížov	**1**	22	1	0	0	0			–					–					–					–					–		
	Temelín	**1**	5	1	0	0	0			–					–					–					–					–		
	Vidov	**1**			–					–					–			3	0	0	0	0			–					–		
	Záboří	**1**			–					–			26	1	0	1	0			–					–					–		

Tabulka 5.10: Četnost výskytu entomopatogenních hub (počet CFU) detekovaná pomocí SM a.i. dodine na jednotlivých lokalitách s porostem obiloviny v okrese Prachatice

Okres	Lokalita odběru	Počet odebraných vzorků	Počet kultur (CFU) entomopatogenních hub detekovaných pomocí PDA s dodine ve vzorku s porostem obiloviny																												
			ječmen ozimý					**ječmen jarní**					**pšenice ozimá**					**žito**					**oves**					**ostatní**				
			Pli	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*
PRACHATICE	Boubská	**1**			–			13	2	0	0	0			–					–					–					–		
	Dol. Nekvasovice	**1**			–					–					–			2	0	0	0	0			–					–		
	Husinec	**2**			–			3	1	0	0	0			–					–			34	0	0	0	0			–		
	Láziště	**2**			–					–					–			3	0	3	0	0			–					–		
																		0	33	0	0	0										
	Lčovice	**1**			–			1	0	0	0	0			–					–					–					–		
	Lhenice	**1**			–								36	0	0	0	0			–					–					–		
	Nová Hospoda	**2**			–					–			2	0	0	0	0			–					–					–		
													9	1	0	0	0															
	Tisovka	**1**			–			0	0	0	0	0			–					–					–					–		
	Vícemily	**2**			–			0	0	0	0	0			–					–			0	104	0	0	0			–		
	Záblatí	**1**			–			16	26	0	0	0			–					–					–					–		
	Zdenice	**2**			–			0	0	0	0	0	6	5	0	0	0			–					–					–		

Tabulka 5.11: Četnost výskytu entomopatogenních hub (počet CFU) detekovaná pomocí SM a.i. dodine na jednotlivých lokalitách s porostem obiloviny v okrese Tábor

Okres	Lokalita odběru	Počet odebraných vzorků	Počet kultur (CFU) entomopatogenních hub detekovaných pomocí PDA s dodine ve vzorku s porostem obiloviny																												
			ječmen ozimý					**ječmen jarní**					**pšenice ozimá**					**žito**					**oves**					**ostatní**				
			Pli	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*
TÁBOR	Bradáčov	**1**			–			57	1	0	0	0			–					–					–					–		
	Hamr	**2**	2	17	0	7	0			–					–					–					–			9	3	0	0	0
	Hlasivo	**3**			–			7	6	0	0	0			–			12	0	0	0	0			–			41	0	0	0	0
	Hlavatce	**1**			–					–					–					–			106	0	0	0	0			–		
	Hlinice	**1**			–										–					–			23	2	0	1	0			–		
	Choustník	**2**			–			17	1	0	0	0	1	2	0	0	0			–					–					–		
	Kamenný Dvůr	**2**			–					–								19	0	0	0	0	19	6	0	0	0			–		
	Košice	**2**	2	1	0	1	0			–			9	0	0	0	0								–					–		
	Nuzbely	**2**	1	2	0	0	0			–			11	0	0	0	0													–		
	Rodná	**1**			–					–								9	0	0	6	0								–		
	Stádlec	**2**			–					–			64	1	0	0	0			–					–					–		
													46	3	0	0	0															
	Třebelice	**3**	35	0	0	0	0			–			45	1	0	0	0	103	2	0	0	0			–					–		
	Zálší	**2**	38	1	0	0	0			–					–					–			10	0	0	0	0			–		

Tabulka 5.12: Četnost výskytu entomopatogenních hub (počet CFU) detekovaná pomocí SM a.i. dodine na jednotlivých lokalitách s porostem obiloviny v okrese Jindřichův Hradec

Okres	Lokalita odběru	Počet odebraných vzorků	Počet kultur (CFU) entomopatogenních hub detekovaných pomocí PDA s dodine ve vzorku s porostem obiloviny																													
			ječmen ozimý					**ječmen jarní**					**pšenice ozimá**					**žito**					**oves**					**ostatní**				
			Pli	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*
J. HRADEC	Březina	**2**	8	0	0	0	0		–				97	1	0	0	0		–					–					–			
	Červená Lhota	**1**			–				–				4	3	0	0	0		–					–					–			
	Smržov	**2**			–				–				2	0	0	0	0		–					–					–			
													32	0	0	0	0															
	Záblatí	**2**			–				–				1	0	0	0	0		–					–				52	0	0	0	0

Tabulka 5.13: Četnost výskytu entomopatogenních hub (počet CFU) detekovaná pomocí SM a.i. dodine na jednotlivých lokalitách s porostem obiloviny v okrese Písek

Okres	Lokalita odběru	Počet odebraných vzorků	Počet kultur (CFU) entomopatogenních hub detekovaných pomocí PDA s dodine ve vzorku s porostem obiloviny																													
			ječmen ozimý					**ječmen jarní**					**pšenice ozimá**					**žito**					**oves**					**ostatní**				
			Pli	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*
PÍSEK	Milenovice	**1**			–				–				26	0	0	0	0			–					–					–			
	Nový Dvůr	**2**	11	33	0	0	0		–				48	0	0	0	0			–					–					–			
	Oslov	**2**			–				–				46	1	0	0	0	32	5	0	0	0			–					–			
	Sepekov	**2**	135	0	0	0	0		–				34	0	0	0	0			–					–					–			
	Velká	**2**			–				–				30	0	0	0	0			–			31	5	0	0	0			–			
	Žďár	**2**			–				–				30	0	0	0	0	45	1	0	0	0			–					–			

Tabulka 5.14: Četnost výskytu entomopatogenních hub (počet CFU) detekovaná pomocí SM a.i. dodine na jednotlivých lokalitách s porostem obiloviny v okrese Český Krumlov

Okres	Lokalita odběru	Počet odebraných vzorků	Počet kultur (CFU) entomopatogenních hub detekovaných pomocí PDA s dodine ve vzorku s porostem obiloviny																													
			ječmen ozimý					**ječmen jarní**					**pšenice ozimá**					**žito**					**oves**					**ostatní**				
			Pli	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*	*Pli*	*Man*	*Bba*	*Pca*	*Pfr*
ČESKÝ KRUMLOV	Bohdalovice	**1**	11	0	0	0	0								–					–					–					–			
	Domoradice	**2**	43	0	0	0	0	0	0	0	0	0								–					–					–			
	Hněvanov	**1**			–					–			65	1	0	0	0			–					–					–			
	Hor. Třebonín	**2**			–					–			13	0	0	0	0	14	5	0	0	0			–					–			
	Chabičovice	**2**	13	5	0	0	0			–			2	3	0	0	0			–					–					–			
	Markvartice	**2**			–			124	1	0	0	0	4	0	0	0	0			–					–					–			
	Přídolí	**1**			–					–			3	0	0	0	0			–					–					–			
	Rožmitál na Šumavě	**1**			–					–					–					–					–			3	23	0	0	0
	Suš	**1**	0	0	0	0	0			–					–					–					–					–			
	Větřní	**1**			–					–					bakterióza					–					–					–			

5.1.2. Monitoring přirozeného výskytu entomopatogenních hub v půdě na pokusné lokalitě Smržice a VÚP Troubsko

Ve studii zaměřené na *„Vývoj a využití biopreparátů a organominerálních hnojiv podporujících rozklad organických látek a zvyšujících supresivitu půdy“* byl na lokalitě Smržice a následně na pokusném pozemku Výzkumného ústavu pícninářského s.r.o., Troubsko realizován monitoring výskytu entomopatogenních hub v půdě, který měl za cíl stanovit druhovou diverzitu entomopatogenních hub na zkoumaných lokalitách. Izolované kmeny byly uloženy v mykologické sbírce pro potřeby následného hodnocení (kapitola 5.2.3 a 5.4.1).

Na lokalitě Smržice bylo odebráno 5 směsných půdních vzorků, které byly analyzovány pomocí GBM a následně i SM a.i. dodine. V případě použití larev zavíječe voskového (*G. mellonella*) byla přítomnost entomopatogenních hub zjištěna pouze v jednom z pěti vzorků, kde byl izolován druh *P. fumosoroseus* (1B). Pomocí SM a.i. dodine byla ve všech vzorcích zjištěna přítomnost druhu *P. lilacinus* a na parcelce č. 5 byl navíc detekován druh *B. bassiana* (kmen 5B) (Tabulka 5.15).

Frekvence výskytu entomopatogenních hub na lokalitě Smržice neumožňovala uskutečnit porovnání a výběr jednoho z několika kmenů pro potřeby této studie.

Z tohoto důvodu bylo odebráno 24 půdních vzorků na pokusném pozemku VÚP Troubsko. Většina půdních vzorků analyzovaných pomocí GBM byla pozitivní na přítomnost entomopatogenních hub a to především druhu *M. anisopliae* (15 kmenů, tj. 62,5 % z celkem izolovaných kmenů entomopatogenních hub) a druhu *B. bassiana* (9 kmenů, tj. 37,5 %) (Tabulka 5.16). Přesto, že se zdála být přítomnost entomopatogenních hub na podrobně analyzované lokalitě všudypřítomná, v šesti půdních vzorcích (1b, 2b, 2c, 3a, 3d, 6b) nebyla izolována žádná entomopatogenní houba. Vzhledem k dostatečnému množství izolovaných kmenů entomopatogenních hub na lokalitě Troubsko pomocí GBM nebylo použito SM a.i. dodine.

Monitoring entomopatogenních hub v půdě pomocí metody GBM na lokalitě Troubsko prokázal vysokou četnost dvou nejfrekventovanějších druhů entomopatogenních hub na rozdíl od lokality Smržice (Tabulka 5.15). Entomopatogenní houba *P. lilacinus* nebyla na lokalitě Troubsko zaznamenána z důvodu nevirulentnosti tohoto druhu vůči larvám zavíječe voskového (*G. mellonella*). Množství infikovaných larev v GBM při testování vzorků z jednotlivých parcelek ze stejné lokality odběru může naznačovat také něco o heterogenní přítomnosti infekčních propagulí entomopatogenních hub v půdě.

Tabulka 5.15: Entomopatogenní houby izolované z půdních vzorků pomocí „*Galleria* bait method“ a selektivního média a.i. dodine odebraných na lokalitě Smržice

Označení vzorku (parcelky)	**Den kontroly a počet infikovaných larev**			**Druh odizolované houby podle detekční metody**	
	7. den	**10. den**	**14. den**	***Galleria* bait method**	**SM a.i. dodine**
1	0	0	1	*P. fumosoroseus* (1B)	*P. lilacinus*
2	0	0	0	-	*P. lilacinus*
3	0	0	0	-	*P. lilacinus*
4	0	0	0	-	*P. lilacinus*
5	0	0	0	-	*B. bassiana* (5B) *P. lilacinus*

Tabulka 5.16: Entomopatogenní houby izolované z půdních vzorků pomocí „*Galleria* bait method" odebraných na lokalitě VÚP Troubsko

Označení vzorku (parcelky)	Den kontroly a počet infikovaných larev			Druh izolované houby pomocí *Galleria* bait method	
	7. den	10. den	14. den		
1a	0	0	2	*B. bassiana*	(1A – I/1)
1b	0	0	0	–	
1c	0	1	0	*B. bassiana*	(M 404)
1d	0	0	2	*M. anisopliae*	(1D – II/1,2)
2a	1	2	5	*M. anisopliae*	(M 402)
2b	0	0	0	–	
2c	0	0	0	–	
2d	9	15	4	*B. bassiana*	(M403)
3a		0	0	–	
3b	0	0	5	*M. anisopliae*	(M405)
3c	1	2	2	*M. anisopliae*	(M401)
3d	0	0	0	–	
4a	2	1	1	*M. anisopliae*	(M394)
4b	0	1	5	*M. anisopliae*	(M406)
4c	0	0	2	*B. bassiana*	(M408)
	1	1	1	*M. anisopliae*	(M400)
4d	5	7	5	*B. bassiana*	(M399)
	0	1	0	*M. anisopliae*	(M406)
5a	0	2	0	*B. bassiana*	(M409)
	0	0	1	*M. anisopliae*	(5A – I/2)
5b	7	4	4	*B. bassiana*	(M395; M410)
	1	2	0	*M. anisopliae*	(M398)
5c	2	0	2	*B. bassiana*	(M396)
	0	2	0	*M. anisopliae*	(M397)
5d	1	0	0	*M. anisopliae*	(M411)
6a	0	0	1	*M. anisopliae*	(M412)
6b	0	0	0	–	
6c	0	0	3	*M. anisopliae*	(M413)
6d	0	0	1	*M. anisopliae*	(M414)

5.1.3. Monitoring přirozeného rozšíření Mitosporických entomopatogenních hub na orné půdě zemědělského podniku UNIAGRIS Pěnčín s.r.o. před a po záměrné velkoplošné aplikaci vláknitých hub

Cílem monitoringu bylo stanovit druhovou diverzitu a frekvenci výskytu vláknitých entomopatogenních hub na poli zemědělského podniku v Pěnčíně před (vstupní monitoring) a po (první a druhý monitoring) velkoplošné aplikaci vybraných kmenů entomopatogenních hub *B. bassiana* a *M. anisopliae* a mykoparazitické houby *Coniothyrium minitans* (komerční přípravek Contans®) v přímé kombinaci s organominerálním hnojivem Beta-liq.

Vstupní monitoring

Přítomnost entomopatogenních hub na lokalitě Pěnčín byla prokázána pouze pomocí SM a.i. dodine – celkový počet CFU z pěti opakování (Tabulka 5.17). Z tabulky byla zřejmá velmi nízká frekvence přirozeného výskytu entomopatogenních hub na zkoumané lokalitě. Nejčastěji byl izolován druh *P. lilacinus*, který byl 10. den kontroly detekován na všech parcelkách v průměrném množství 5 CFU/ 5 Petriho misek. Ve všech půdních vzorcích byla

izolována entomopatogenní houba *Lecanicillium* spp. (v průměru 3,8 CFU/ 5 Petriho misek), která je spíše představitelem fyloplánu. Předpokládá se kontaminace vzorků půdy tímto druhem ze strniště. Entomopatogenní houba *M. anisopliae* byla izolována pouze v jednom případě (parcelka č. 1) a druh *B. bassiana* na dvou parcelkách č. 3 a 4.

Tabulka 5.17: Výskyt entomopatogenních hub v půdě před aplikací vláknitých hub na lokalitě Pěnčín stanovený pomocí selektivního média s fungicidní složkou dodine

Číslo parcelky	Rozdělení parcelky na polovinu	Den kontroly a celkový počet CFU entomopatogenních hub z pěti opakování							
		10. den				14. den			
		Pli	*Bba*	*Man*	*L.spp*	*Pli*	*Bba*	*Man*	*L.spp*
1	P_0 – Man 1	5	0	2	2	25	0	0	0
	P_0 – Man 2	9	0	0	0	22	0	0	1
2	P_0 – Cmi 1	6	0	0	1	2	0	0	0
	P_0 – Cmi 2	13	0	0	9	2	0	0	0
3	P_0 – Kont-A 1	6	1	0	6	2	0	0	0
	P_0 – Kont-A 2	2	0	0	9	0	0	0	0
4	P_0 – Bba 1	1	0	0	1	2	0	0	0
	P_0 – Bba 2	3	3	0	3	1	0	0	0
5	P_0 – Kont-B 1 P_0 – Kont-B 2	1	0	0	4	9	0	0	5

První monitoring entomopatogenních hub měsíc po aplikaci

Přítomnost entomopatogenních hub byla na pozemku zaznamenána ve velmi nízké frekvenci a to pouze pomocí SM a.i. dodine (Tabulka 5.18). Na žádné z pokusných parcelek nebyl zaznamenán druh aplikované entomopatogenní houby. Četnost výskytu druhu *B. bassiana* byla oproti vstupnímu monitoringu vyšší na rozdíl od druhu *M. anisopliae*, který nebyl zaznamenán na žádné z pěti parcelek.

Monitoring entomopatogenních hub neprokázal přítomnost introdukovaných kmenů vláknitých hub na pozemku v Pěnčíně měsíc po jejich aplikaci.

Tabulka 5.18: Výskyt entomopatogenních hub v půdě stanovený pomocí selektivního média s fungicidní složkou dodine měsíc po aplikaci vláknitých hub na lokalitě Pěnčín

Číslo parcelky	Rozdělení parcelky na polovinu	Den kontroly a celkový počet CFU entomopatogenních hub z pěti opakování			
		10. – 14. den kontroly			
		Pli	*Bba*	*Man*	*L.spp*
1	P_1 – Man 1	3	1	0	2
	P_1 – Man 2	0	1	0	3
2	P_1 – Cmi 1	5	2	0	0
	P_1 – Cmi 2	4	2	0	0
3	P_1 – Kont-A 1 P_1 – Kont-A 2	0	1	0	2
4	P_1 – Bba 1	0	0	0	0
	P_1 – Bba 2	20	0	0	3
5	P_1 – Kont-B 1 P_1 – Kont-B 2	4	5	0	0

Druhý monitoring entomopatogenních hub dva a půl měsíce od aplikace

Druhý monitoring entomopatogenních hub (pouze pomocí SM a.i. dodine) nepřinesl žádná nová zjištění (Tabulka 5.19). Přítomnost aplikovaného druhu na parcelce byla zaznamenána pouze u entomopatogenní houby *B. bassiana* (parcelka č. 4) po 14 dnech testu. Druh *M. anisopliae* byl zjištěn pouze na kontrolní parcelce č. 5. V porovnání se vstupním monitoringem byla četnost výskytu houby *P. lilacinus* a *Lecanicillium* spp. nižší.

Tabulka 5.19: Výskyt entomopatogenních hub v půdě stanovený pomocí selektivního média s fungicidní složkou dodine dva a půl měsíce po aplikací vláknitých hub na lokalitě Pěnčín

Číslo parcelky	Rozdělení parcelky na polovinu	Den kontroly a celkový počet CFU entomopatogenních hub z pěti opakování									
		10. den					14. den				
		Pli	*Pca*	*Bba*	*Man*	*L.spp*	*Pli*	*Pca*	*Bba*	*Man*	*L.spp*
1	P_2 – Man 1	0	0	0	0	0	0	3	0	0	1
	P_2 – Man 2	0	0	0	0	1	1	1	0	0	3
2	P_2 – Cmi 1	0	0	0	0	1	0	3	1	0	0
	P_2 – Cmi 2	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
3	P_2 – Kont-A1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	P_2 – Kont-A2	0	0	0	0	2	1	1	0	0	0
4	P_2 – Bba 1	0	0	0	0	0	4	4	1	0	0
	P_2 – Bba 2	2	0	0	0	0	0	0	2	0	3
5	P_2 – Kont-B1	0	0	0	0	6	4	12	3	2	5
	P_2 – Kont-B1										

Vstupním monitoringem na pozemku zemědělského podniku v Pěnčíně i následnými monitoringy po záměrné introdukci vláknitých hub do půdy byla prokázána přítomnost nejfrekventovanějších druhů entomopatogenních hub a také méně častého druhu *P. carneus*. Vyšší přítomnost vláknité houby *Lecanicillium* spp. v půdních vzorcích byla zřejmě způsobená při odběru půdy s posklizňovými zbytky. Ovšem žádný z následných monitoringů po záměrné aplikaci vláknitých hub dostatečně neprokázal přítomnost aplikovaných kmenů. Možným důvodem mohl být nevhodný způsob aplikace, kdy byl použit velkokapacitní aplikátor s vysokým tlakem postřiku. To také naznačovala kontrola klíčivosti kmenů, kdy rozmražená konidiové suspenze vykazovala normální hodnoty klíčivosti na rozdíl od aplikované směsi hub a přípravku Beta-liq, která vykazovala minimální až nulovou klíčivost.

5.2. Polyfaktoriální charakteristika izolovaných kmenů entomopatogenních hub z půdy

Polyfaktoriální hodnocení kmenů entomopatogenních hub pomocí „in vivo" a „in vitro" (bio)testů umožňuje výběr vhodného kmene pro jeho následné využití v programech integrované ochrany rostlin (Grafický list 4). Z tohoto důvodu byly vybrané sady kmenů entomopatogenních hub charakterizovány pomocí standardních (bio)testů jako např. rychlost klíčení konidií a jejich vitalita, schopnost produkovat konidie nebo blastospory, růst na umělých nebo přirozených živných substrátech a hodnocení virulence kmenů na modelovém hostiteli např. molici skleníkové (*Trialeurodes vaporarium*) nebo zavíječi voskovém (*Galleria mellonella*). Doplňující charakteristikou bylo hodnocení variability kmenů pomocí jednoduché genetické metody (kapitola 5.3).

5.2.1. Hodnocení kmenů entomopatogenních hub izolovaných z půdy v jihočeském regionu pomocí „in vitro" testů

Souhrnné výsledky radiálního růstu, produkce konidií a blastospor hodnocených kmenů jsou rozděleny v dvou tabulkách podle původu kmenů (Tabulka 5.20 a 5.21). Klíčivost a index vývoje kmenů je v následné tabulce (Tabulka 5.22).

Nejintenzivnější radiální růst mezi hodnocenými druhy entomopatogenních hub byl zjištěn u kmenů *P. fumosoroseus*. Rozpětí hodnot radiálního růstu se u tohoto druhu pohybovalo v rozmezí od 36,6 do 50,6 mm, při průměrné velikosti středové kultury 44,7 mm. Naproti tomu nárůst středových kultur u houby *B. bassiana* a *M. anisopliae* byl v průměru o 10 mm nižší. Entomopatogenní houba *B. bassiana* vykazovala také velkou variabilitu radiálního růstu i v rámci svého druhu, v rozpětí od 22,3 mm (kmen M185) do 37,4 mm (kmen M104). Nejmenší radiální růst byl zjištěn u druhu *M. anisopliae* s průměrnou velikostí 27,2 mm.

Nejvyšší produkce konidií na umělé živné půdě (PDA) byla zjištěna u kmene M067 (*B. bassiana*) v množství $6{,}60.10^8$ spor/ kulturu a kmene M093 (*P. fumosoroseus*) v množství $5{,}00.10^8$ spor/ kulturu. Po přepočtení produkce konidií na jednotku plochy (100 mm^2) byl nejproduktivnější kmen M067 (*B. bassiana*) a kmen M076 (*M. anisopliae*). Tomu odpovídá i průměrná produkce konidií u druhu *M. anisopliae* v množství $4{,}10.10^7$ konidií/ 100 mm^2 (produkce kmenů v rozpětí od $2{,}60.10^7$ do $7{,}10.10^7$ konidií/ 100 mm^2) a u druhu *B. bassiana* s průměrnou produkcí $3{,}90.10^7$ konidií/ 100 mm^2 (v rozmezí $9{,}00.10^6$ – $1{,}1.10^8$ konidií/ 100 mm^2), oproti druhu *P. fumosoroseus* s průměrnou výtěžností $7{,}30.10^6$ konidií/ 100 mm^2 (v rozmezí $3{,}20.10^6$ – $1{,}60.10^7$ konidií/ 100 mm^2) tj. v průměru o $3{,}27.10^7$ konidií/ 100 mm^2 méně než u kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* nebo *M. anisopliae*.

Všechny hodnocené kmeny entomopatogenních hub vykazovaly vysoké produkce konidií při povrchové kultivaci na přirozeném substrátu (ječné kroupy). Nejproduktivnějším byl kmen M104 (*B. bassiana*) – s produkcí $2{,}20.10^9$ konidií/ 1g krup; kmen M074 (*P. fumosoroseus*) – $1{,}60.10^9$ konidií/ 1g krup a kmen M076 (*M. anisopliae*) – $1{,}10.10^9$ konidií/ 1g krup. Průměrné hodnoty jednotlivých druhů entomopatogenních hub dosahovaly hodnot $8{,}96.10^8$ konidií/ 1g krup (*B. bassiana*); $6{,}86.10^8$ konidií/ 1g krup (*P. fumosoroseus*); $4{,}10.10^8$ konidií/ 1g krup (*M. anisopliae*).

Pomocí submerzní kultivace byla dosažena nejvyšší produkce blastospor ($1{,}19.10^9$ blastospor/ 1ml) u kmene M101 (*B. bassiana*). V průměru vykázaly kmeny houby *B. bassiana* dobrou produkci ($2{,}91.10^8$ blastospor /1ml) stejně jako kmeny entomopatogenní houby *P. fumosoroseus*, které vykazovaly poměrně vyrovnanou produkci (v průměru $1{,}37.10^8$

blastospor/1ml). Minimální produkce blastospor v submerzní kultuře byla zaznamenána u druhu *M. anisopliae*, kde kmeny vytvářely převážně myceliální biomasu „kuličky".

Klíčivost konidií (Tabulka 5.22) kmenů *P. fumosoroseus* (průměr 99,5 %) a kmenů *B. bassiana* (průměr 95,4 %) byla velmi dobrá. Naopak, velmi nízká klíčivost konidií po 24 hodinách testu byla zjištěna u všech kmenů *M. anisopliae* (v průměru 69,7 %). Nejrychlejší vývoj vykazovaly kmeny entomopatogenní houby *B. bassiana* (Graf 1), které mimo třech kmenů (M101, M152 a M175) dokončily vývoj po 48 hodinách testu. Naproti tomu vývoj kmenů u druhu *P. fumosoroseus* (Graf 2) a *M. anisopliae* (Graf 3) byl pomalejší o 24 hodin. Nejpomalejší vývoj byl pozorován u kmene M076 (*M. anisopliae*) a kmene M100 (*P. fumosoroseus*), které dokončil svůj vývoj až po 96 hodinách.

Všech 21 testovaných kmenů prokázalo schopnost realizovat kompletní vývojový cyklus při povrchové kultivaci na agarizovaném živném médiu (PDA) a na přirozeném substrátu (ječné kroupy). Významné rozdíly byly zaznamenány především u kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae*, které měly velmi nízkou klíčivost (v průměru 70 %) a minimální schopnost produkovat blastospory v submerzní kultuře. Entomopatogenní houba *B. bassiana* vykazovala nejlepší produkční vlastnosti včetně krátkého vývojového cyklu. Mezi nejvýznamnější kmeny (*B. bassiana*) lze zařadit kmen M067, M062 a M104. Entomopatogenní houba *P. fumosoroseus* dosahovala největšího radiálního růstu ovšem s větším podílem myceliální hmoty. Mezi kmeny (*P. fumosoroseus*) s nejlepšími vlastnostmi patří kmen M074 a M094. Kmen M076 (*M. anisopliae*) dosahoval velmi dobrých výsledků při produkci na PDA nebo kroupách, ovšem bez schopnosti produkce blastospor.

Tabulka 5.20: Základní růstové a produkční charakteristiky kmenů entomopatogenních hub izolovaných z půdy na lokalitách v okolí Jindřichova Hradce

			Středová kultura			Substrát	Submerze
Kmen	**Druh**	**Lokalita**	**Radiální průměr ± SMDCH (mm)**	**Spory/ 1 kultura**	**Spory/ 100 mm²**	**Spory/1g**	**Blastospory /1 ml**
M064	*Pfr*	Pístina	50,6 ± 0,50	$1{,}50.10^8$	$7{,}30.10^6$	$9{,}60.10^8$	$1{,}43.10^8$
M069	*Pfr*	Pístina	48,2 ± 0,53	$1{,}10.10^8$	$5{,}80.10^6$	$4{,}70.10^8$	$1{,}46.10^8$
M074	*Pfr*	Pístina	46,5 ± 1,30	$2{,}10.10^8$	$1{,}20.10^7$	$1{,}60.10^9$	$1{,}36.10^8$
M093	*Pfr*	Pístina	44,7 ± 0,80	$5{,}00.10^8$	$3{,}20.10^6$	$8{,}50.10^8$	$9{,}13.10^7$
M094	*Pfr*	Pístina	45,3 ± 0,47	$2{,}50.10^8$	$1{,}60.10^7$	$9{,}40.10^8$	$2{,}15.10^8$
M100	*Pfr*	Pístina	36,6 ± 0,73	$9{,}30.10^7$	$8{,}80.10^6$	$1{,}00.10^9$	$4{,}38.10^7$
M098	*Pfr*	Stráž n.N.	44,1 ± 0,31	$6{,}80.10^7$	$4{,}40.10^6$	$8{,}50.10^8$	$2{,}25.10^8$
M062	*Bba*	Pístina	36,7 ± 0,80	$4{,}10.10^8$	$3{,}90.10^7$	$7{,}60.10^8$	$1{,}55.10^8$
M067	*Bba*	Pístina	28,3 ± 1,28	$6{,}60.10^8$	$1{,}10.10^8$	$6{,}70.10^8$	$2{,}46.10^8$
M081	*Bba*	J. Hradec	37,0 ± 1,27	$9{,}60.10^6$	$9{,}00.10^6$	$6{,}50.10^8$	$1{,}33.10^8$
M080	*Man*	J. Hradec	30,7 ± 0,70	$1{,}90.10^8$	$2{,}60.10^7$	$5{,}20.10^8$	$1{,}88.10^6$
M076	*Man*	Rodvínov	22,0 ± 0,00	$2{,}70.10^8$	$7{,}10.10^7$	$1{,}10.10^9$	$5{,}13.10^5$

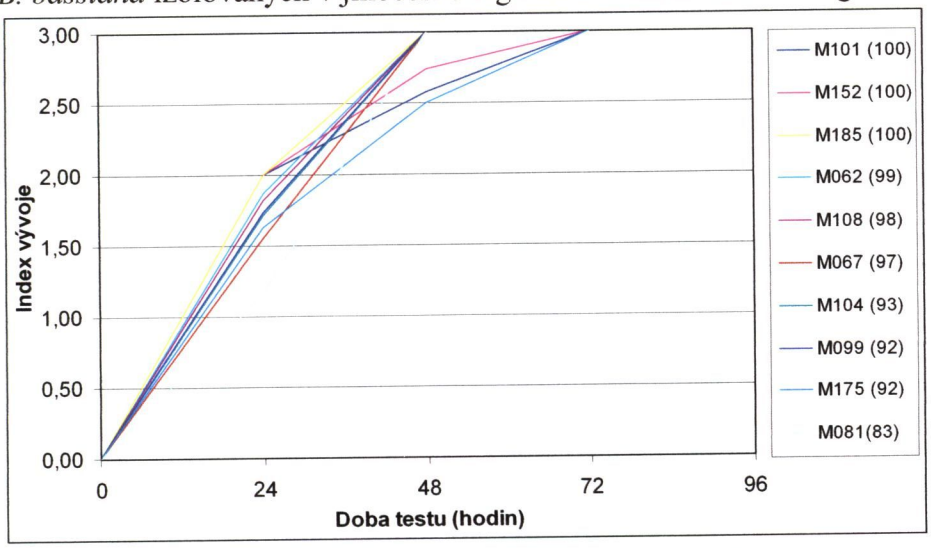
Tabulka 5.21: Základní růstové a produkční charakteristiky kmenů entomopatogenních hub izolovaných z půdy na různých lokalitách z jihočeského regionu

Kmen	Druh	Lokalita	Středová kultura			Substrát	Submerze
			Radiální průměr ± SMDCH (mm)	Spory/ 1 kultura	Spory/ 100 mm^2	Spory/1g	Blastospory / 1 ml
M096	*Pfr*	Orlov	41,6 ± 0,90	$3{,}60.10^7$	$2{,}60.10^6$	$2{,}60.10^8$	$1{,}03.10^8$
M104	*Bba*	Jílovice	37,3 ± 2,32	$3{,}30.10^8$	$3{,}00.10^7$	$2{,}20.10^9$	$1{,}90.10^8$
M108	*Bba*	Jílovice	28,1 ± 0,53	$3{,}10.10^8$	$5{,}00.10^7$	$1{,}10.10^9$	$2{,}19.10^8$
M101	*Bba*	Ledenice	35,9 ± 0,31	$2{,}60.10^8$	$2{,}60.10^7$	$4{,}10.10^8$	$1{,}18.10^9$
M175	*Bba*	Kloub	28,1 ± 0,57	$1{,}90.10^8$	$3{,}00.10^7$	$8{,}40.10^8$	$1{,}0610^8$
M152	*Bba*	Kloub	33,0 ± 2,86	$2{,}70.10^8$	$3{,}10.10^7$	$7{,}70.10^8$	$2{,}05.10^8$
M185	*Bba*	Katovice	22,3 ± 0,47	$1{,}70.10^8$	$4{,}40.10^7$	$6{,}20.10^8$	$1{,}24.10^8$
M099	*Bba*	Srubec	33,8 ± 0,82	$2{,}10.10^8$	$2{,}30.10^7$	$9{,}40.10^8$	$3{,}53.10^8$
M102	*Man*	Ledenice	28,9 ± 0,62	$1{,}70.10^8$	$2{,}60.10^7$	$5{,}90.10^8$	$4{,}75.10^6$

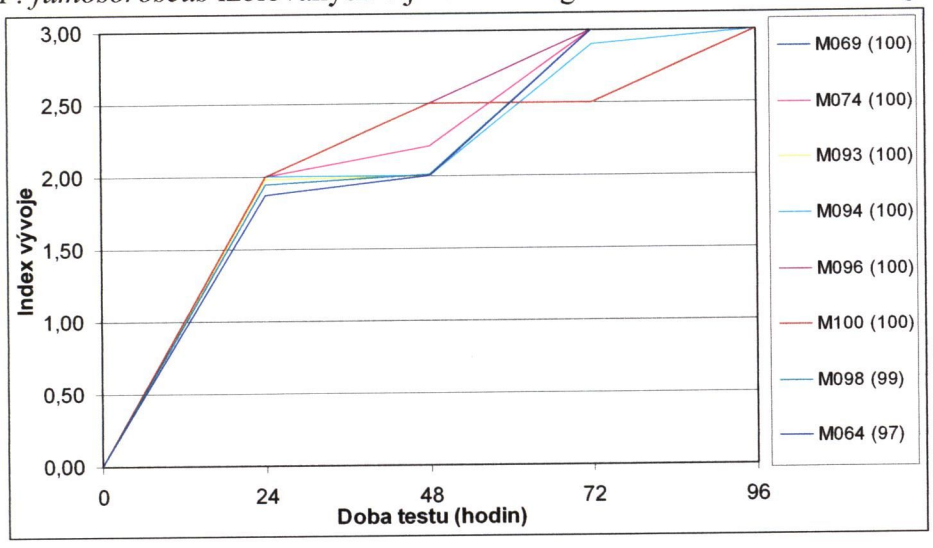
Tabulka 5.22: Hodnocení klíčivosti a vývoje kmenů entomopatogenních hub izolovaných z půdy na různých lokalitách regionu Jižní Čechy.

Druh	Kmen	Klíčivost (%)	Průměrný index vývoje (± SMODCH)			
			24 hod	48 hod	72 hod	96 hod
Beauveria bassiana	M062	99	1,87 ± 0,3913	3,00 ± 0,0000	–	–
	M067	97	1,56 ± 0,6160	3,00 ± 0,0000	–	–
	M081	83	1,17 ± 0,7881	3,00 ± 0,0000	–	–
	M099	92	1,74 ± 0,5850	3,00 ± 0,0000	–	–
	M101	100	2,00 ± 0,0000	2,58 ± 0,1785	3,00 ± 0,0000	–
	M104	93	1,72 ± 0,6255	3,00 ± 0,0000	–	–
	M108	98	1,82 ± 0,4771	3,00 ± 0,0000	–	–
	M152	100	2,00 ± 0,0000	2,74 ± 0,2498	3,00 ± 0,0000	–
	M175	92	1,63 ± 0,6220	2,50 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000	–
	M185	100	2,00 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000	–	–
Paecilomyces fumosoroseus	M064	97	1,87 ± 0,4234	2,00 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000	–
	M069	100	2,00 ± 0,0497	2,00 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000	–
	M074	100	2,00 ± 0,0000	2,20 ± 0,2449	3,00 ± 0,0000	–
	M093	100	1,98 ± 0,1400	2,00 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000	–
	M094	100	2,00 ± 0,0000	2,00 ± 0,0000	2,90 ± 0,2000	3,00 ± 0,0000
	M096	100	2,00 ± 0,0000	2,50 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000	–
	M098	99	1,94 ± 0,2853	2,01 ± 0,0700	3,00 ± 0,0000	–
	M100	100	2,00 ± 0,0497	2,50 ± 0,0000	2,50 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000
Metarhizium anisopliae	M076	70	1,34 ± 0,9139	1,58 ± 0,8146	2,54 ± 0,1276	3,00 ± 0,0000
	M080	61	1,19 ± 0,9690	1,83 ± 1,0639	3,00 ± 0,0000	–
	M102	78	1,53 ± 0,8271	1,70 ± 0,7141	3,00 ± 0,0000	–

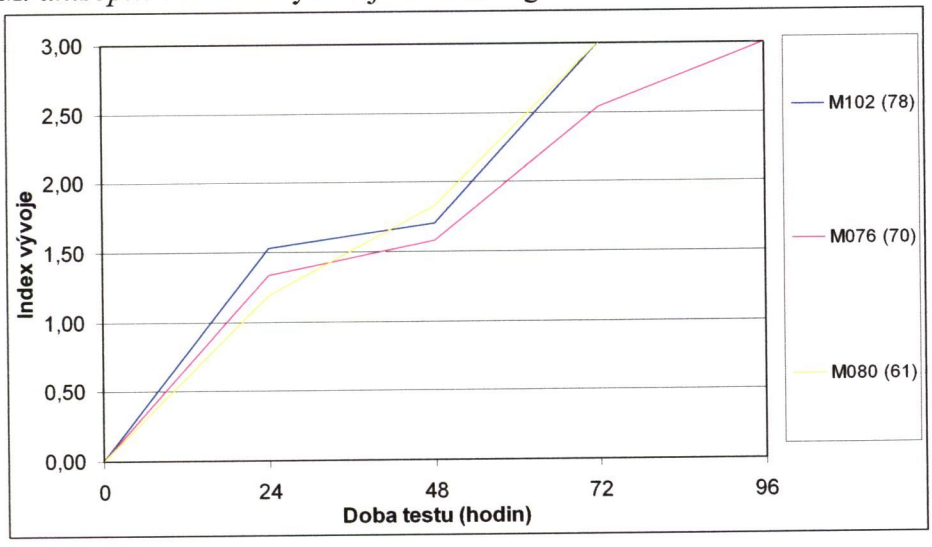
Graf 5.1: Průměrný index vývoje – GI (**G**ermination **I**ndex) kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* izolovaných v jihočeské regionu a % klíčivosti viz. legenda



Graf 5.2: Průměrný index vývoje – GI (**G**ermination **I**ndex) kmenů entomopatogenní houby *P. fumosoroseus* izolovaných v jihočeské regionu a % klíčivosti viz. legenda



Graf 5.3: Průměrný index vývoje – GI (**G**ermination **I**ndex) kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* izolovaných v jihočeské regionu a % klíčivosti viz. legenda



5.2.2. Standardní laboratorní biotest na larvách zavíječe voskového (*Galleria mellonella*)

5.2.2.1. Stanovení optimální délky (bio)testu pro jednorázové vyhodnocení rychlosti vývoje entomopatogenní houby *B. bassiana* na larvách zavíječe voskového (*G. mellonella*)

Záměrem vstupního (bio)testu bylo určit optimální dobu pro jednorázové vyhodnocení vývoje kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na larvách zavíječe voskového (*G. mellonella*).

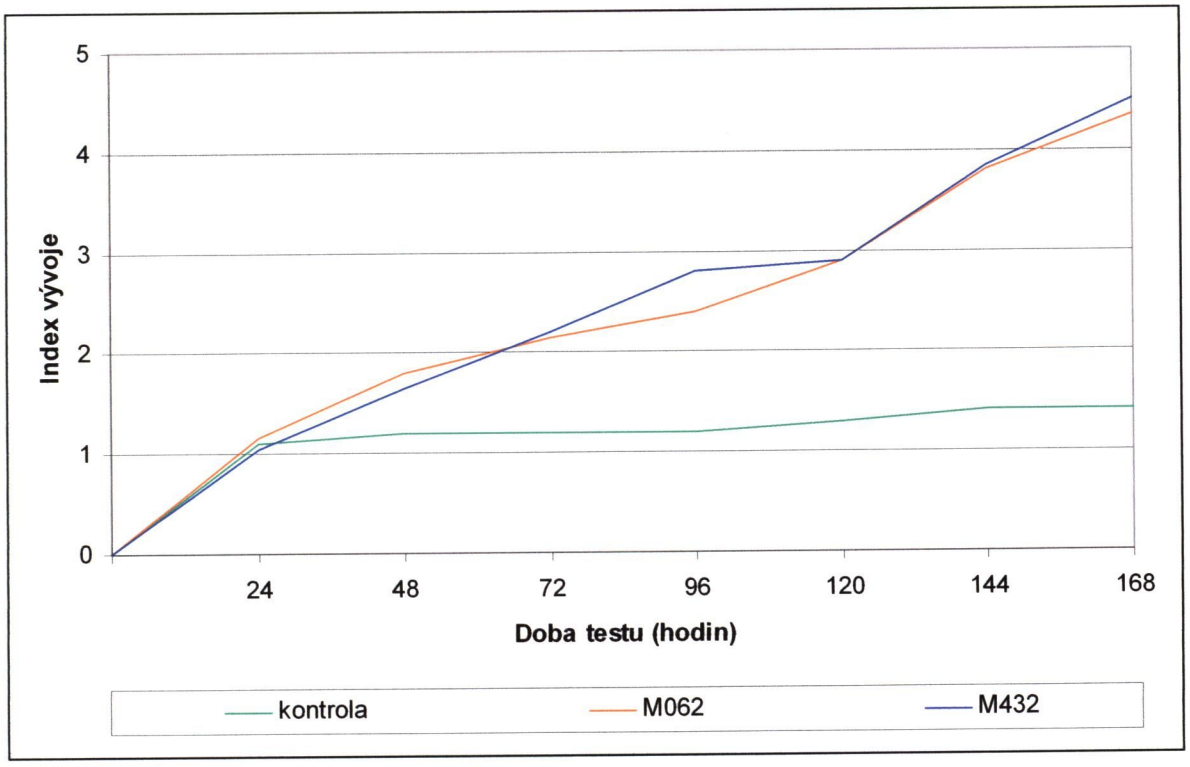
Oba testované kmeny entomopatogenní houby *B. bassiana* vykazovaly podobnou rychlost vývoje v průběhu celého testu (Tabulka 5.23). V porovnání s kontrolní variantou byly zaznamenány první rozdíly po 48 hodinách testu (Graf 5.4), kdy u většiny ošetřených larev byly patrné jednotlivé až splývavé melanizační skvrny (index 2). Nástup vývoje infekce u larev ošetřených kmenem M062 byl první dva dny testu nepatrně rychlejší než vývoj kmene M432. Významnější rozdíl ve vývoji kmenů (*B. bassiana*) byl zaznamenán po 96 hodinách testu, kde mortalita larev (*G. mellonella*) dosáhla hodnoty 40 % (index 3) u kmene M062 a 60 % (index 3 a více) u kmene M432 (Graf 5.5) . Pátý den testu (120 hodin) byla mortalita larev v rozmezí 65 – 70 % u obou kmenů. Stoprocentní mortalita byla dosažena pouze u kmene M432 po 144 hodinách testu, kde přes 80 % larev bylo plně porostlých sporulujícím myceliem. Během (bio)testu nedošlo k plnému rozvinutí infekce u dvou larev ošetřených kmenem M062. Důvodem mohlo být nedostatečné ošetření larev konidiovou suspenzí a tím došlo k zpomalení vývoje houby na hostiteli. Larvy v kontrole nevykazovaly symptomy infekce po celou dobu testu a po 168 hodinách testu více než polovina larev nedosáhla ani indexu 2 (průměrný index 1,40). Případné melanizační skvrny byly zřejmě následkem detergentu (Tween 80) přítomného ve vodě.

Oba kmeny entomopatogenní houby *B. bassiana* vykazovaly plynulý a rychlý vývoj infekce oproti larvám v kontrole. Hodnota LT_{50} byla zaznamenána u infikovaných larev po 96 hodinách testu, kdy 40 – 60 % larev dosáhlo indexu 3 a více (usmrcené). Na základě výsledků ze vstupního (bio)testu byla jako optimální doba pro hodnocení vývoje kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* stanoveno – 96 hodin.

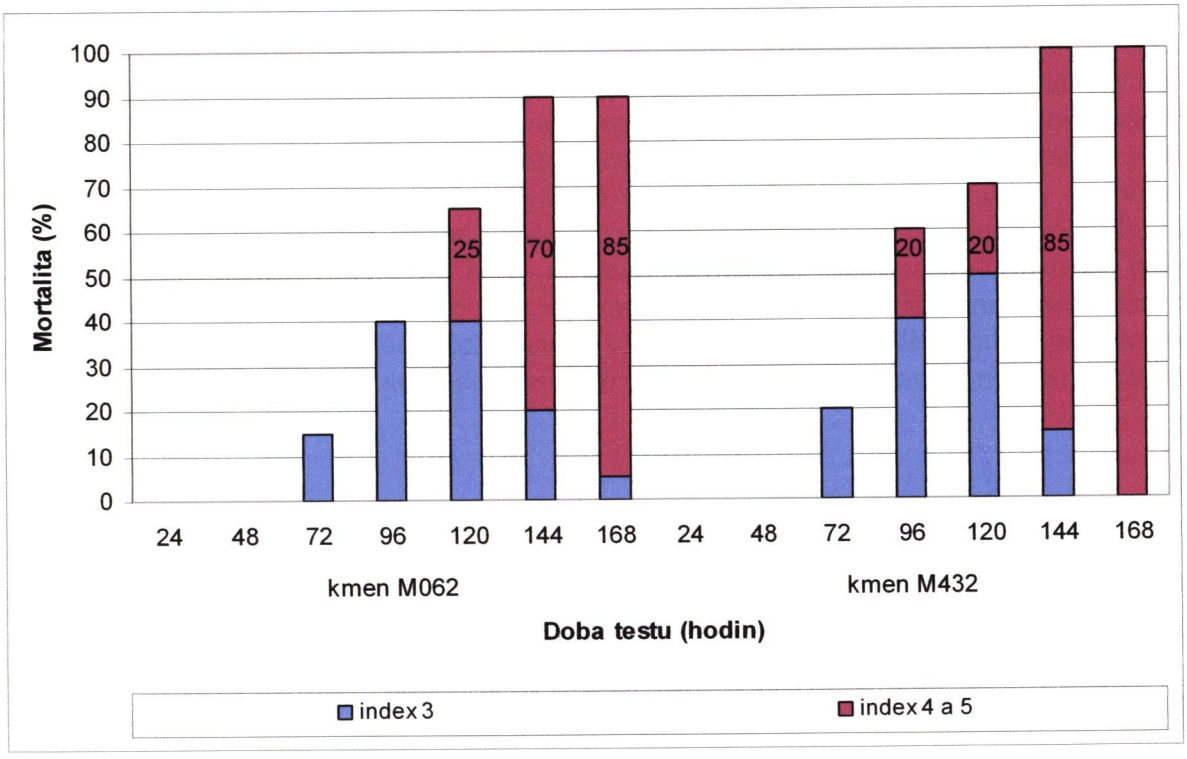
Tabulka 5.23: Hodnocení vývoje kmene M 062 a M 432 entomopatogenní houby *B. bassiana* a mortality (%) larev zavíječe voskového (*G. mellonella*) po 24 hodinových intervalech.

Doba testu (hodin)	Kontrola			*Beauveria bassiana* kmen M062			kmen M432		
	Index vývoje (průměr)	SMODCH	Mortalita (%)	Index vývoje (průměr)	SMODCH	Mortalita (%)	Index vývoje (průměr)	SMODCH	Mortalita (%)
24	1,10	± 0,3000	0	1,15	± 0,3571	0	1,05	± 0,2179	0
48	1,20	± 0,4000	0	1,80	± 0,4000	0	1,65	± 0,4770	0
72	1,20	± 0,4000	0	2,15	± 0,3571	15	2,20	± 0,4000	20
96	1,20	± 0,4000	0	2,40	± 0,4899	40	2,80	± 0,7483	60
120	1,30	± 0,4583	0	2,90	± 0,7681	65	2,90	± 0,7000	70
144	1,40	± 0,4899	0	3,80	± 0,8718	90	3,85	± 0,3571	100
168	1,40	± 0,4899	0	4,35	± 0,9631	90	4,50	± 0,5000	100

Graf 5.4: Průměrný index vývoje kmene M 062 a M 432 entomopatogenní houby *B. bassiana* na larvách zavíječe voskového (*G. mellonella*). Jako kontrola byly neošetřené larvy.



Graf 5.5: Mortalita (%) larev zavíječe voskového (*G. mellonella*) ošetřených entomopatogenní houbou *B. bassiana* (kmene M 062 a kmen M 432) – index 3 a více hodnocen jako „usmrcená" larva



5.2.2.2. Hodnocení vývoje kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na larvách zavíječe voskového (*G. mellonella*) po 96 hodinách (bio)testu

Záměrem (bio)testu bylo porovnat rychlost vývoje u hodnocené sady 22 kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* (reprezentující 13 lokalit šesti okresů jihočeského regionu) a stanovit % mortality larev zavíječe voskového (*G. mellnella*) po 96 hodinách (bio)testu.

Testované kmeny entomopatogenní houby *B. bassiana* byly v tabulce (Tabulka 5.24) a grafu (Graf 5.3) seřazeny sestupně podle průměrného indexu vývoje a mortality larev. Hodnocená sada kmenů vykázala vysokou variabilitu, jak mezi kmeny původem ze stejné lokality tak v rámci celé skupiny (z celého jihočeského regionu). Mortalita larev po 96 hodinách testu dosahovala u hodnocených kmenů rozpětí 90 – 25 % s indexem vývoje od 3,05 do 2,25.

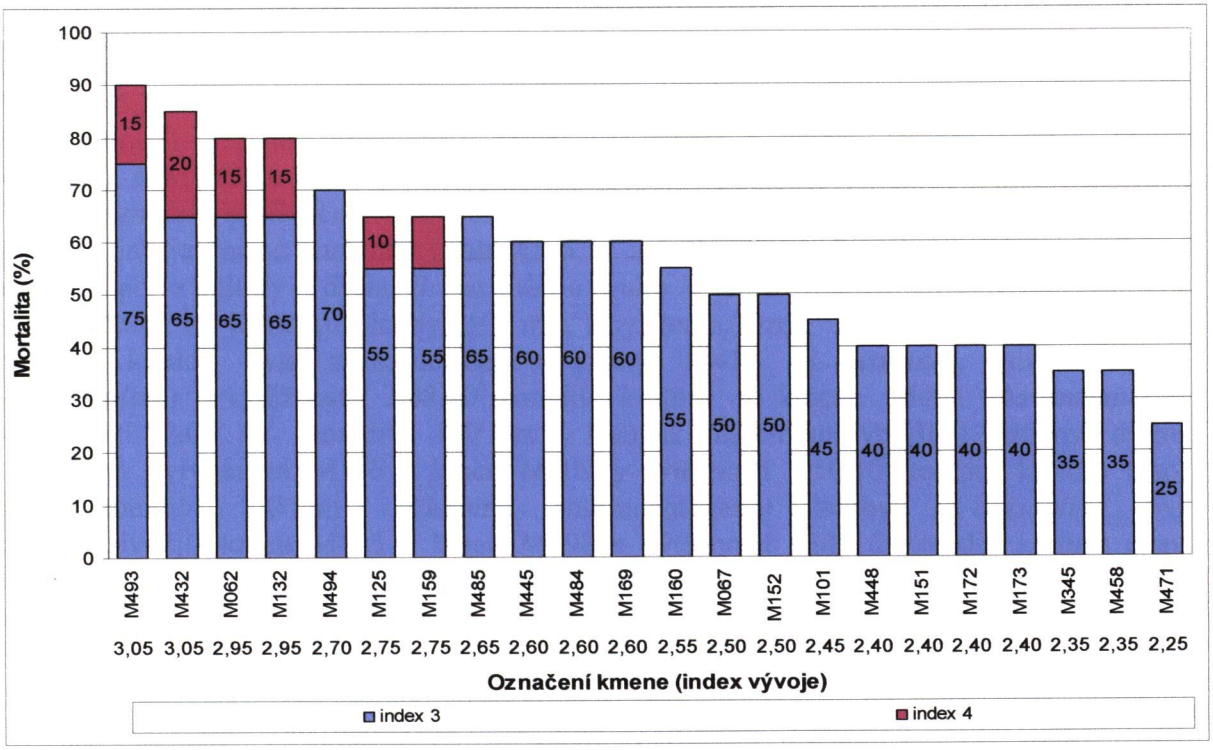
Nejrychlejší vývoj byl zaznamenán u kmene M493 (okres Prachatice), M432 (Tábor), M062 (Jindřichův Hradec) a M132 (Český Krumlov) s minimálně 80 % mortalitou larev. U těchto kmenů bylo z celkového počtu „usmrcených" larev 15 – 20 % již porostlých sporulujícím myceliem (index 4). Dalších deset kmenů dosáhlo hodnoty mortality larev v rozmezí 70 – 50 %. Zbývající kmeny (8 kmenů) vykazovaly nižší mortalitu larev s indexem vývoje (2,45 – 2,25). Mezi kmeny původem ze stejné lokality výskytu jako např. Chvalšiny (4 kmeny), Pístina (3 kmeny), Cehnice (2 kmeny), Kloub (2 kmeny), Zálší (2 kmeny) nebyly zaznamenány podobné hodnoty vývoje v porovnání s kmeny z různých lokalit výskytu v rámci jihočeského regionu. Významně se lišily např. kmeny ze stejné lokality výskytu (Pístina), kdy kmen M062 dosahoval nejvyšší hodnoty vývoje (2,95) oproti kmenu M067 (2,50) a kmenu M345 (2,35). Naopak kmeny z lokality Chvalšiny (Č. Krumlov) nebo Cehnice (Strakonice) vykazovaly obdobné nebo shodné výsledky průměrného indexu vývoje např.: kmeny z okolí Chvalšin – M169 (2,60) a M160 (2,55) a kmeny z lokality Cehnice – M172 a M173 (2,40).

Závěrem lze říci, že více jak polovina testovaných kmenů byla schopna do 96 hodin (bio)testu dosáhnout minimálně 50 % mortality larev (*G. mellonella*) (s indexem vývoje ≥ 2,50). Dále nebyla jednoznačně potvrzena spojitost mezi původem a rychlostí vývoje testovaných kmenů, což může naznačovat jedinečnost každého kmene i v rámci jedné lokality. Na základě tohoto zjištění byla zkoumaná sada kmenů podrobena hodnocení genetické variability pomocí metody RAPD (viz. kapitola 5.3). Porovnáním výsledků se vstupní studií (kapitola 5.2.2.1) bylo zjištěno, že kmeny hodnocené v úvodní studii vykazovaly nižší hodnoty indexu vývoje. To může naznačovat nestandardnost prováděných pokusů nebo nepřesnost při hodnocení indexu vývoje. V tomto případě je nutné podotknout, že se jedná o práci s živým materiálem a i několik nezávislých opakování nemusí znamenat shodné výsledky.

Tabulka 5.24: Hodnocení vývoje a mortality (%) kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* původem z jihočeském regionu na larvách zavíječe voskového (*G. mellonella*) po 96 hodinách testu.

Název kmene	Lokalita výskytu	Okres	Index vývoje (průměr)	SMODCH	Mortalita (%)	Úroveň virulence
M493	Dopčice	Prachatice	3,05	0,4975	**90**	Vysoká
M432	Stádlec	Tábor	3,05	0,5895	**85**	Vysoká
M062	Pístina	J. Hradec	2,95	0,5895	**80**	Vysoká
M132	Chvalšiny	Č. Krumlov	2,95	0,5895	**80**	Vysoká
M494	Lhenice	Prachatice	2,70	0,4583	70	Vysoká
M125	Cehnice	Strakonice	2,75	0,6225	65	Vysoká
M159	Kloub	Strakonice	2,75	0,6225	65	Vysoká
M485	Zálší	Tábor	2,65	0,4770	65	Vysoká
M445	Hluboká	Č. Budějovice	2,60	0,4899	60	Střední
M484	Zálší	Tábor	2,60	0,4899	60	Střední
M169	Chvalšiny	Č. Krumlov	2,60	0,4899	60	Střední
M160	Chvalšiny	Č. Krumlov	2,55	0,4975	55	Střední
M067	Pístina	J. Hradec	2,50	0,5000	50	Střední
M152	Kloub	Strakonice	2,50	0,5000	50	Střední
M101	Ledenice	Č. Budějovice	2,45	0,4975	45	Nízká
M448	Boršov	Č. Budějovice	2,40	0,4899	40	Nízká
M151	Chvalšiny	Č. Krumlov	2,40	0,4899	40	Nízká
M172	Cehnice	Strakonice	2,40	0,4899	40	Nízká
M173	Cehnice	Strakonice	2,40	0,4899	40	Nízká
M345	Pístina	J. Hradec	2,35	0,4770	35	Nízká
M458	Markvartice	Č. Krumlov	2,35	0,4770	35	Nízká
M471	Č. Lhota	Tábor	2,25	0,4330	25	Nízká

Graf 5.6: Porovnání kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* podle % mortality larev zavíječe voskového (*G. mellonella*) po 96 hodinách testu



5.2.3. Polyfaktoriální hodnocení kmenů entomopatogenních hub izolovaných na pokusné lokalitě VÚP Troubsko

Cílem polyfaktoriálního hodnocení kmenů izolovaných na lokalitě Výzkumného ústavu pícninářského s.r.o. Troubsko (kapitola 5.1.2) bylo vybrat vhodné kmeny entomopatogenní houby *B. bassiana* a *M. anisopliae* pro jejich následné využití ve studii zaměřené na „*Vývoj a využití biopreparátů a organominerálních hnojiv podporujících rozklad organických látek a zvyšujících supresivitu půdy*" jejíž součástí byly nádobové a polní pokusy prováděné pracovníky VÚP Troubsko.

V případě porovnání výsledků klíčivosti a vývoje konidií obou druhů entomopatogenních hub navzájem byla zřejmá u většiny kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* velmi nízká klíčivost po 24 hodinách testu v rozpětí 0 – 44 % a delší vývoj konidií těchto kmenů o 24 – 48 hodin oproti kmenům *B. bassiana*, jak vyplývá z tabulky (Tabulka 5.25 a 5.26). Hodnocení vitality konidií vykazovalo také značně rozdílné výsledky i v rámci kmenů téhož druhu. U entomopatogenní houby *B. bassiana* byla ze všech kmenů zařazených do testování zaznamenána průměrná klíčivost v hodnotě 79 % oproti 18 % u druhu *M. anisopliae*. Klíčivost nad 90 % byla zaznamenána pouze u kmenů druhu *B. bassiana* (kmen M408, M410, 1A-I-1 a M403) a nejnižší klíčivost vykázal kmen M409 (*B. bassiana*) s 54 % klíčivostí. Této nejnižší hodnoty nedosáhl ani kmen M394 (*M. anisopliae*) s nejvyšší klíčivostí (44 %) z hodnocené sady kmenů druhu *M. anisopliae*, kde více jak polovina kmenů (*M. anisopliae*) nedosáhlá ani 20 % klíčivosti. Během 48 – 72 hodin byly schopny všechny kmeny druhu *B. bassiana* dokončit svůj vývoj plnou sporulací a u druhu *M. anisopliae* to bylo až po 96 hodinách testu, jak je zřejmé z grafu (Graf 5.7 a 5.8). Nejintenzivnější vývoj po 24 hodinách testu byl sledován u kmene M408 (*B. bassiana*) s průměrným indexem GI 1,90, ale u kmenů M403 a M399 stejného druhu byl zaznamenán jak rychlý počátečný vývoj, tak i plná sporulace po 48 hodinách. Mezi kmeny druhu *M. anisopliae* byl zaznamenán nejrychlejší počáteční růst konidií u kmenů M394 a M400 s průměrným indexem GI 0,88 – 0,72. Mimo kmene M413, M405 a 414 byly všechny kmeny (*M. anisopliae*) po 96 hodinách (bio)testu schopny zakončit svůj vývoj plnou sporulací.

Hodnocené kmeny obou druhů se příliš neodlišovaly ve velikosti středové kultury, která v průměru byla 30,9 mm u druhu *B. bassiana* a 32,2 mm u druhu *M. anisopliae* (Tabulka 5.27 a 5.28). Nejintenzivnější středový růst kultur byl zaznamenán u kmenů (*M. anisopliae*) – M402 (37,4 mm), M401 (35,9 mm) a kmenů (*B. bassiana*) – M408 (35,1 mm), M410 (35,0 mm).

Průměrné produkční charakteristiky kmenů obou druhů vykazovaly podobné výsledky, jak je patrné z tabulky (Tabulka 5.27 a 5.28). Například rozdíl mezi průměrnou produkcí spor z kultury u druhu *B. bassiana* a druhu *M. anisopliae* činil $1{,}19 \times 10^8$ konidií a po přepočítání na jednotku plochy (100 mm^2) byl tento rozdíl $2{,}21 \times 10^7$ konidií. Nejnižší produkce konidií byla zaznamenána u kmene M410 (*B. bassiana*), kmene 1-D-II (*M. anisopliae*) s výtěžností $2{,}08.10^8$ konidií/ kulturu a kmene M402 (*M. anisopliae*) s výtěžností $2{,}05 .10^7$ konidií/ 100 mm^2. Naopak nejproduktivnějšími kmeny druhu *B. bassiana* byly kmen M396 a kmen M409 s výtěžností $9{,}50.10^8$ konidií/ kulturu resp. $1{,}66.10^8$ konidií/ 100 mm^2. Z kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* byl nejproduktivnější kmen M405 a kmen M398 s výtěžností $8{,}08.10^8$ konidií/ kulturu resp. $1{,}03.10^8$ konidií/ 100 mm^2. Množství vyprodukovaných konidií na přirozeném živném substrátu bylo u obou druhů obdobné v rozpětí $7{,}00 \times 10^6 – 4{,}63 \times 10^8$ konidií/ 1 g krup u druhu *B. bassiana* a $3{,}45 \times 10^7 – 4{,}96 \times 10^8$ konidií/ 1 g krup u druhu *M. anisopliae*.

Všechny testované kmeny byly schopny dokončit vývoj na modelovém hostiteli. Kmeny entomopatogenní houby *M. anisopliae* vykazovaly v průběhu celého (bio)testu na

molici skleníkové (*Trialeurodes vaporariorum*) intenzivnější vývoj než kmeny *B. bassiana*, jak bylo možné pozorovat v grafu (Graf 5.9 a 5.10). Všechny kmeny v testu byly schopné dokončit vývoj na pupariu molice skleníkové do 96 hodin s výjimkou kmene 1A-I-1, který vykazoval nejpomalejší vývoj. Velké rozdíly v rychlosti vývoje byly zaznamenány po 24 hodinách (index FDGI 0,50 – 1,40) a po 48 hodinách (index FDGI 0,66 – 1,98) testu především mezi kmeny houby *B. bassiana*. Rozpětí indexu vývoje po 24 hodinách u kmenů (*M. anisopliae*) bylo menší (index FDGI 1,52 – 0,98). Kmeny s nejintenzivnějším vývojem byly u druhu *B. bassiana* – kmen M408, M403, M410 a M404, u druhu *M. anisopliae* – M406, M394 a M402.

Z polyfaktoriálního hodnocení kmenů bylo zřejmé, že všechny testované kmeny vykazovaly dobré produkční a vývojové vlastnosti na modelovém hostiteli (*T. vaporariorum*). Rozdíly byly zřejmé především v pomalejším vývoji konidií (index GI) u kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae*. Na základě hodnocených charakteristik byly vybrány dva kmeny původem z lokality Troubsko – kmen M408 (*B. bassiana*) a kmen M394 (*M. anisopliae*), které vykazovaly optimální růstové, produkční a vývojové charakteristiky.

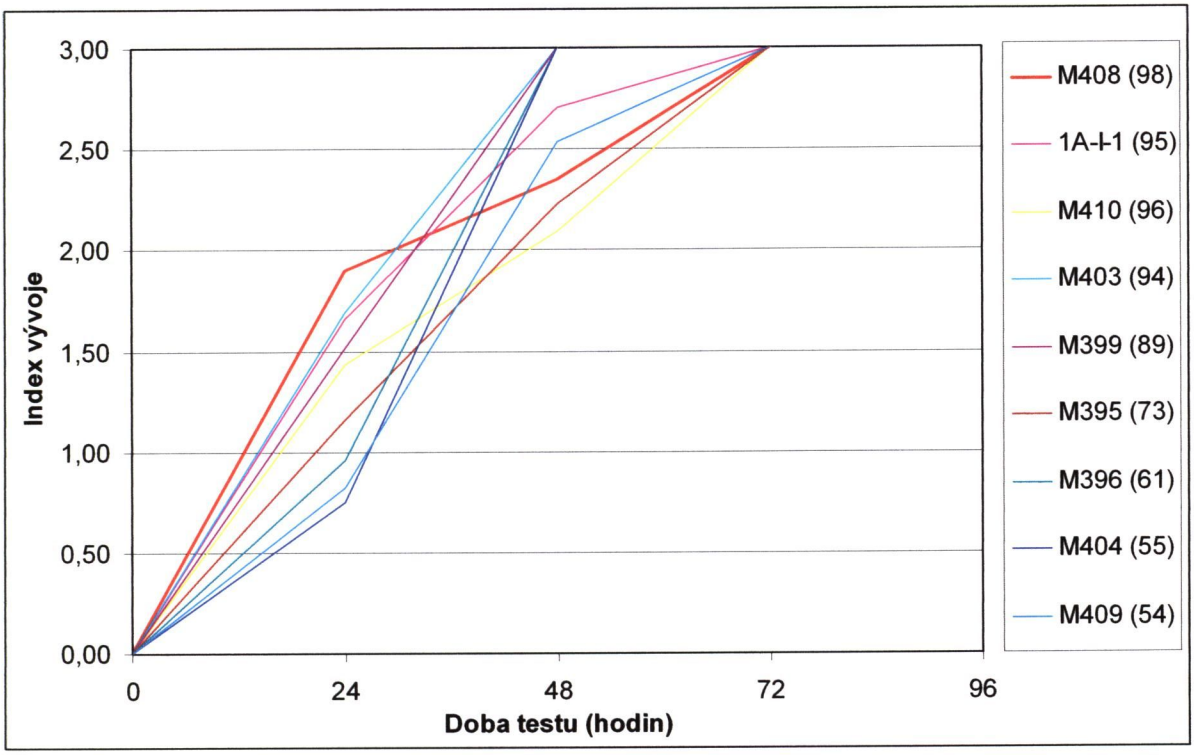
Tabulka 5.25: Hodnocení klíčivosti a vývoje kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* izolovaných na lokalitě VÚP Troubsko.

Kmen	Klíčivost (%)	Průměrný index vývoje (± SMODCH) 24 hod	48 hod	72 hod	96 hod
1A-I-1	95	1,66 ± 1,6600	2,70 ± 0,2449	3,00 ± 0,0000	–
M395	73	1,16 ± 0,8738	2,23 ± 0,3635	3,00 ± 0,0000	–
M396	61	0,96 ± 0,8823	3,00 ± 0,0000	–	–
M399	89	1,51 ± 0,6837	3,00 ± 0,0000	–	–
M403	94	1,69 ± 0,5421	3,00 ± 0,0000	–	–
M404	55	0,75 ± 0,8016	3,00 ± 0,0000	–	–
M408	98	1,90 ± 0,3413	2,35 ± 0,2958	3,00 ± 0,0000	–
M409	54	0,82 ± 0,8442	2,53 ± 0,1187	3,00 ± 0,0000	–
M410	96	1,43 ± 0,5432	2,09 ± 0,187	3,00 ± 0,0000	–

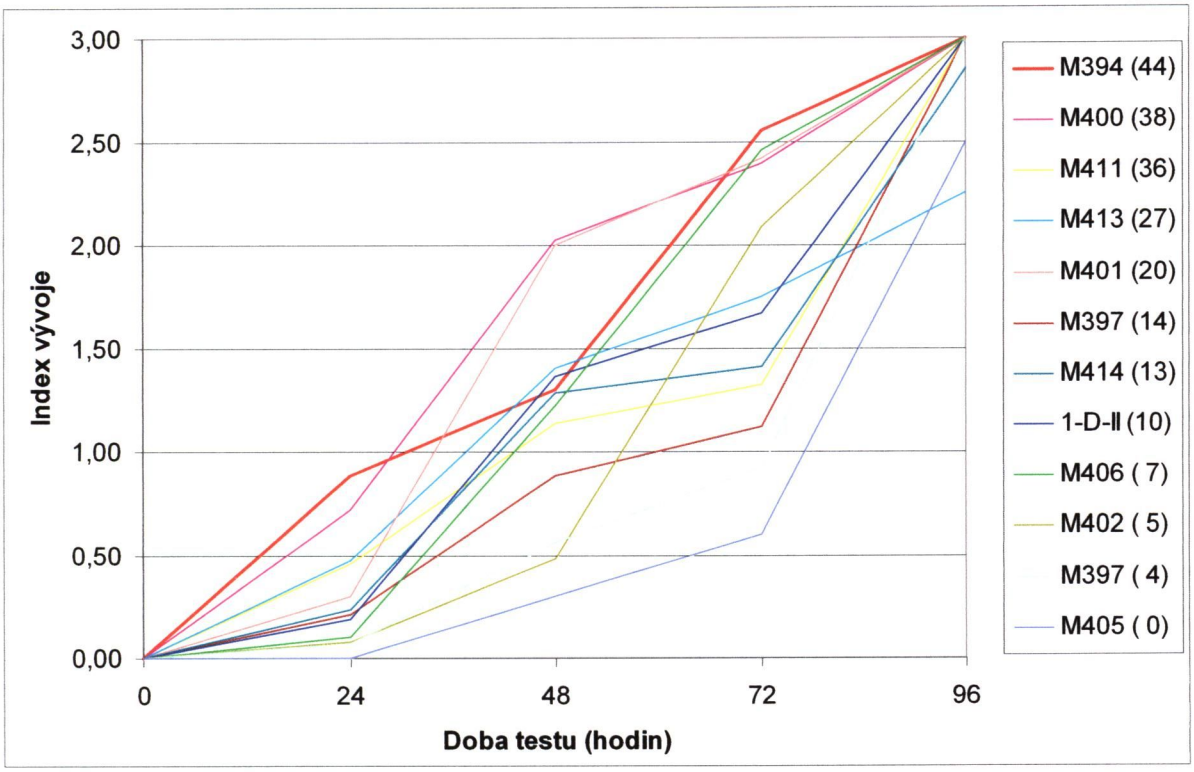
Tabulka 5.26: Hodnocení klíčivosti a vývoje kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* izolovaných na lokalitě VÚP Troubsko.

Kmen	Klíčivost (%)	Průměrný index vývoje (± SMODCH) 24 hod	48 hod	72 hod	96 hod
1-D-II	10	0,19 ± 0,5461	1,36 ± 0,9330	1,67 ± 0,9649	3,00 ± 0,0000
M394	44	0,88 ± 0,9884	1,30 ± 0,9539	2,55 ± 0,1500	3,00 ± 0,0000
M397	14	0,21 ± 0,5347	0,80 ± 0,9798	1,12 ± 0,9743	3,00 ± 0,0000
M398	4	0,07 ± 0,3466	0,56 ± 0,8980	0,92 ± 1,1174	3,00 ± 0,0000
M400	38	0,72 ± 0,9282	2,02 ± 0,0853	2,39 ± 0,4629	3,00 ± 0,0000
M401	20	0,30 ± 0,6481	2,00 ± 0,0000	2,42 ± 0,4285	3,00 ± 0,0000
M402	5	0,08 ± 0,3419	0,48 ± 0,8467	2,09 ± 0,2278	3,00 ± 0,0000
M405	0	0,00 ± 0,0000	0,30 ± 0,7141	0,60 ± 0,9165	2,50 ± 0,2783
M406	7	0,10 ± 0,3808	1,22 ± 0,9755	2,46 ± 0,1356	3,00 ± 0,0000
M411	36	0,67 ± 0,9116	1,31 ± 0,9428	1,32 ± 0,9686	3,00 ± 0,0000
M413	27	0,47 ± 0,8118	1,40 ± 0,7280	1,75 ± 0,6614	2,25 ± 0,3354
M414	13	0,24 ± 0,6264	1,28 ± 0,9257	1,41 ± 1,0623	2,85 ± 0,2291

Graf 5.7: Průměrný index vývoje – GI (**G**ermination **I**ndex) kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* izolovaných na lokalitě VÚP Troubsko a procento klíčivosti po 24 hodinách



Graf 5.8: Průměrný index vývoje – GI (**G**ermination **I**ndex) kmenů entomopatogenní houby (*M. anisopliae*) izolovaných na lokalitě VÚP Troubsko a procento klíčivosti po 24 hodinách



Tabulka 5.27: Biotest na molici skleníkové (*T. vaporariorum*) a základní růstové a produkční charakteristiky kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* izolované na lokalitě VÚP Troubsko.

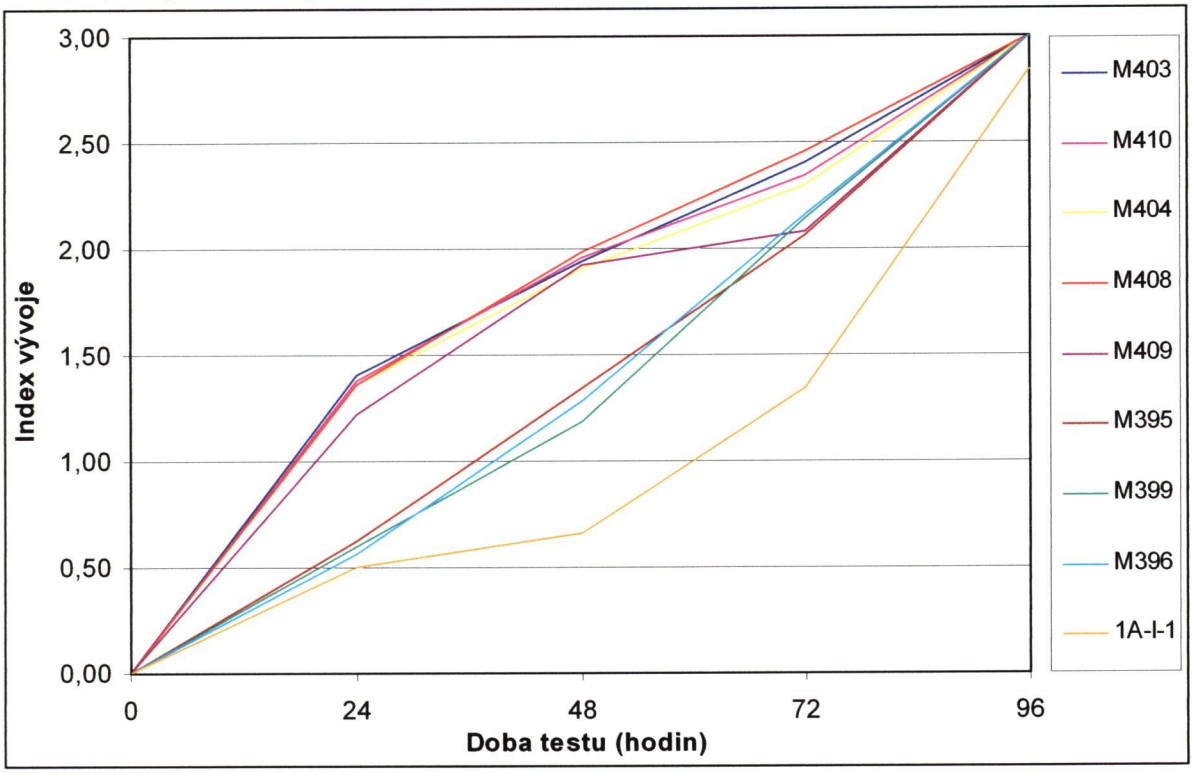
Kmen	Středová kultura		Substrát	Biotest			
	Radiální průměr ± SMDCH (mm)	Spory/ 1 kultura	Spory/ 100 mm^2	Spory/1g	24h	48h	72h	96h
1A-I-1	31,5 ± 1,3844	$4{,}90.10^8$	$6{,}29.10^7$	$3{,}51.10^8$	0,50 ± 0,0000	0,66 ± 0,2332	1,34 ± 0,2728	2,84 ± 0,3666
M395	32,3 ± 1,0598	$4{,}67.10^8$	$5{,}71.10^7$	$1{,}94.10^8$	0,62 ± 0,2135	1,34 ± 0,3072	2,06 ± 0,1625	3,00 ± 0,0000
M396	28,2 ± 0,6442	$6{,}50.10^8$	$1{,}04.10^8$	$2{,}30.10^8$	0,56 ± 0,1625	1,28 ± 0,2482	2,16 ± 0,2728	3,00 ± 0,0000
M399	30,5 ± 0,5000	$6{,}00.10^8$	$8{,}22.10^7$	$4{,}63.10^8$	0,60 ± 0,2000	1,18 ± 0,2400	2,14 ± 0,2245	3,00 ± 0,0000
M403	30,6 ± 3,2678	$3{,}14.10^8$	$4{,}28.10^7$	$7{,}00.10^6$	1,40 ± 0,2000	1,94 ± 0,1625	2,40 ± 0,2000	3,00 ± 0,0000
M404	27,6 ± 1,2372	$3{,}08.10^8$	$5{,}17.10^7$	$1{,}62.10^8$	1,36 ± 0,2245	1,90 ± 0,2000	2,30 ± 0,2449	3,00 ± 0,0000
M408	35,1 ± 0,9974	$5{,}67.10^8$	$5{,}87.10^7$	$2{,}53.10^8$	1,36 ± 0,2245	1,98 ± 0,0980	2,46 ± 0,1356	3,00 ± 0,0000
M409	27,0 ± 1,7045	$9{,}50.10^8$	$1{,}66.10^8$	$1{,}80.10^8$	1,22 ± 0,2482	1,92 ± 0,1833	2,08 ± 0,1833	3,00 ± 0,0000
M410	35,0 ± 0,5855	$2{,}93.10^8$	$3{,}05.10^7$	$1{,}52.10^8$	1,38 ± 0,2135	1,96 ± 0,1356	2,34 ± 0,2332	3,00 ± 0,0000

Tabulka 5.28: Biotest na molici skleníkové (*Trialeurodes vaporariorum*) a základní růstové a produkční charakteristiky kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* izolované na lokalitě VÚP Troubsko.

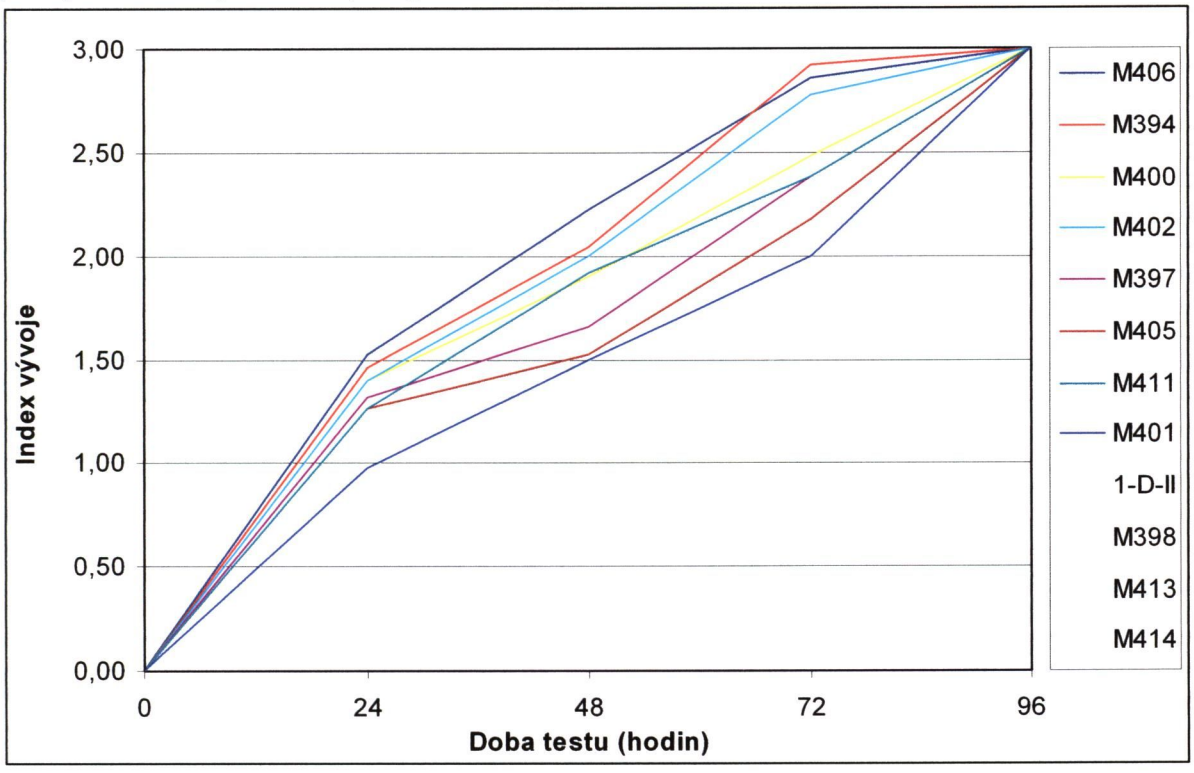
Kmen	Středová kultura		Substrát	Biotest			
	Radiální průměr ± SMDCH (mm)	Spory/ 1 kultura	Spory/ 100 mm^2	Spory/1g	24h	48h	72h	96h
1-D-II	33,4 ± 0,9492	$2{,}08.10^8$	$2{,}38.10^7$	$5{,}40.10^7$	x [4)]	x	x	x
M394	32,3 ± 0,8886	$2{,}29.10^8$	$2{,}80.10^7$	$3{,}38.10^8$	1,46 ± 0,1356	2,04 ± 0,2417	2,92 ± 0,1833	3,00 ± 0,0000
M397	32,0 ± 0,0000	$3{,}33.10^8$	$4{,}15.10^7$	$3{,}98.10^8$	1,32 ± 0,2400	1,66 ± 0,2332	2,38 ± 0,2135	3,00 ± 0,0000
M398	31,7 ± 0,6236	$8{,}08.10^8$	$1{,}03.10^8$	$2{,}75.10^8$	x	x	x	x
M400	30,9 ± 0,927	$3{,}43.10^8$	$4{,}58.10^7$	$4{,}60.10^8$	1,40 ± 0,2000	1,90 ± 0,2000	2,48 ± 0,0980	3,00 ± 0,0000
M401	35,9 ± 0,7648	$4{,}70.10^8$	$4{,}64.10^7$	$4{,}96.10^8$	0,98 ± 0,0980	1,50 ± 0,0000	2,00 ± 0,1414	3,00 ± 0,0000
M402	37,4 ± 1,6351	$2{,}25.10^8$	$2{,}05.10^7$	$1{,}49.10^8$	1,40 ± 0,2000	2,00 ± 0,2449	2,78 ± 0,2482	3,00 ± 0,0000
M405	29,8 ± 0,4983	$7{,}00.10^8$	$1{,}00.10^8$	$1{,}30.10^8$	1,26 ± 0,2498	1,52 ± 0,2993	2,18 ± 0,2786	3,00 ± 0,0000
M406	33,8 ± 1,7598	$2{,}65.10^8$	$2{,}96.10^7$	$2{,}81.10^8$	1,52 ± 0,0980	2,22 ± 0,2482	2,86 ± 0,2245	3,00 ± 0,0000
M411	32,1 ± 0,4390	$4{,}80.10^8$	$5{,}92.10^7$	$3{,}15.10^8$	1,26 ± 0,2498	1,92 ± 0,1833	2,38 ± 0,2135	3,00 ± 0,0000
M413	26,3 ± 1,1358	$3{,}75.10^8$	$6{,}91.10^7$	$3{,}45.10^7$	x	x	x	x
M414	30,6 ± 1,4948	$3{,}17.10^8$	$4{,}30.10^7$	$2{,}21.10^8$	x	x	x	x

[4)] Výsledky nebylo možné získat vlivem kontaminace

Graf 5.9: Průměrný index vývoje kmenů *B. bassiana* na molici skleníkové (*T. vaporariorum*) – FDGI (**F**ungus **D**evelopment and **G**rowth **I**ndex)



Graf 5.10: Průměrný index vývoje kmenů *M. anisopliae* na molici skleníkové (*T. vaporariorum*) – FDGI (**F**ungus **D**evelopment and **G**rowth **I**ndex) [4)]



5.3. Využití RAPD analýzy pro hodnocení genetické variability na vybrané sadě kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* izolované z jihočeského regionu

Cílem této studie bylo stanovit genetickou variabilitu mezi 21 autochtonními kmeny entomopatogenní houby *B. bassiana* (reprezentující 13 lokalit, šesti okresů jihočeského regionu) použitím genetické analýzy RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA – Polymerase Chain Reaction).

Na základě vstupního screeningu 20 primerů (OPERON TECHNOLOGY, CA) bylo vybráno 11 primerů poskytujících dostatečný a detekovatelný polymorfismus (Tabulka 5.30).

Tabulka 5.29: Sada kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* izolované z jihočeského regionu a dva referenční americké kmeny (*B. bassiana*) hodnocené pomocí RAPD analýzy

Oblast JČ regionu (použitá zkratka)	Lokalita	Označení kmene	Pořadové číslo
České Budějovice (CB)	Hluboká	M 445	2.
	Boršov	M 448	3.
	Ledenice	M 101	4.
Jindřichův Hradec (JH)	Pístina	M 067	5.
	Pístina	M 062	6.
	Pístina	M 345	7.
Tábor (TA)	Stádlec	M 432	8.
	Zálší	M 485	9.
	Zálší	M 484	10.
	Červená Lhota	M 471	11.
Český Krumlov (CK)	Chvalšiny	M 132	12.
	Chvalšiny	M 151	13.
	Chvalšiny	M 160	14.
	Chvalšiny	M 169	15.
	Markvartice	M 458	16.
Strakonice (ST)	Cehnice	M 125	17.
	Cehnice	M 172	18.
	Cehnice	M 173	19.
	Kloub	M 152	20.
	Kloub	M 159	21.
Prachatice (PI)	Lhenice	M 494	22.
USA, Florida (USA)	(referenční kmen)	BBA 01	23.
	(referenční kmen)	BBA 02	24.

Tabulka 5.30: Použité primery (OPERON TECHNOLOGY, CA) v RAPD analýze kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* izolovaných v jihočeském regionu

Primer	Sekvence 5′ - 3′	Primer	Sekvence 5′ - 3′
OPF - 01	ACGGATCCTG	OPF - 03	CCTGATCACC
OPF - 04	GGTGATCAGG	OPF - 05	CCGAATTCCC
OPF - 06	GGGAATTCGG	OPF - 15	CCAGTACTCC
OPB - 04	GGACTGGAGT	OPB - 07	GGTGACGCAG
OPB - 15	GGAGGGTGTT	OPK - 03	CCAGCTTAGG
OPK - 08	GAACACTGGG		

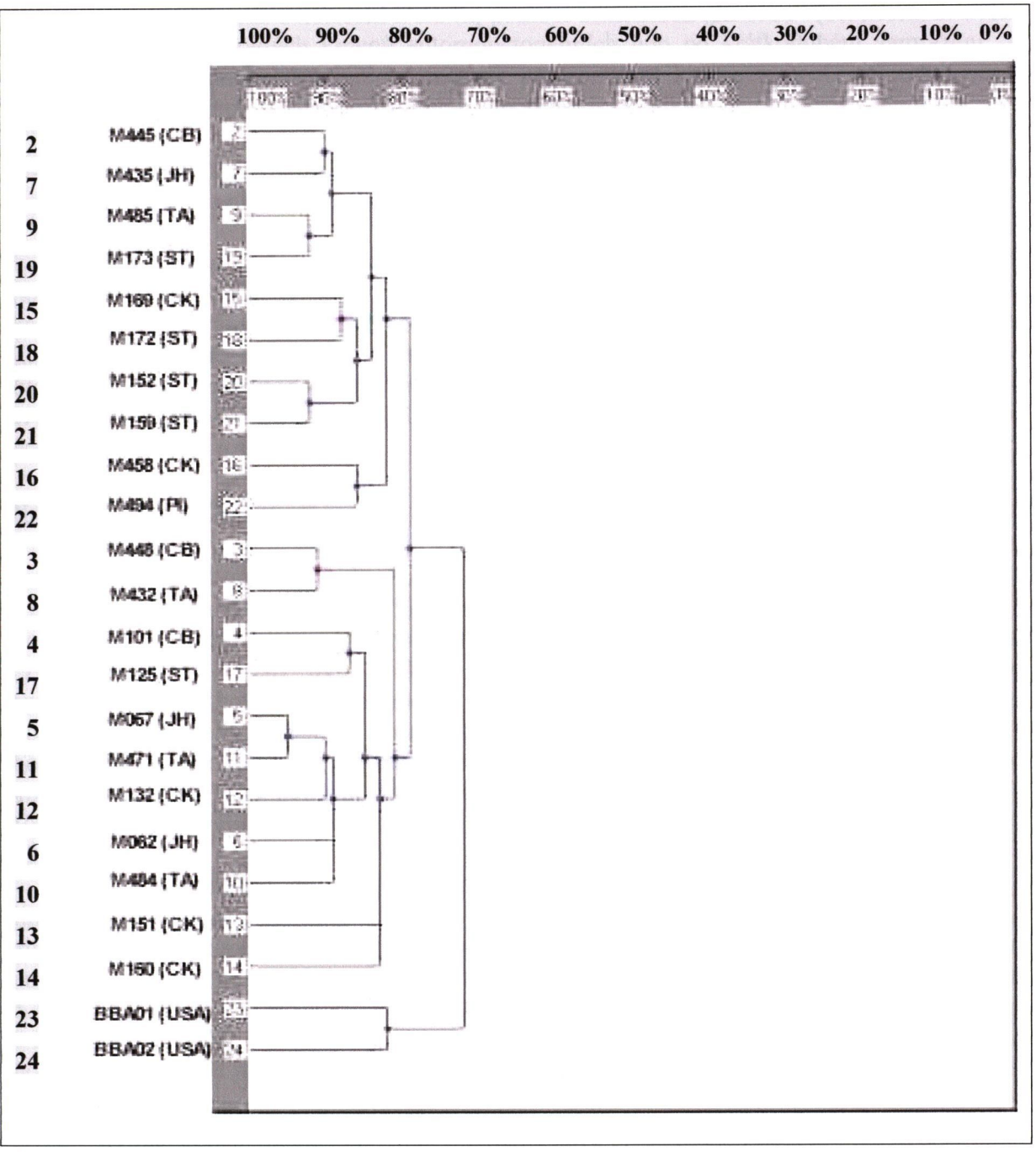
Analyzovaná sada kmenů původem z jihočeského regionu byla klastrovou analýzou (Obrázek 5.1 a 5.2) seskupena do několika bloků, které byly dále rozčleněny do menších skupin podle míry jejich vzájemné podobnosti (Obrázek 5.1). Jeden velký blok v sobě zahrnuje kmeny M 445 (pořadové č. 2), M345 (7), M485 (9), M173 (19), M169 (15), M172 (18), M152 (20), M159 (21), M458 (16) a M494 (22), které jsou si navzájem podobné v rozpětí od 93 % do 87 % a byly shlukovány po dvojicích kmenů (pořadové č.: 9 a 19; 20 a 21; 2 a 7; 15 a 18; 16 a 22). Druhý velký blok obsahuje kmeny M101 (4), M125 (17), M067 (5), M471 (11), M132 (12), M062 (6), M484 (10), M151 (13) a M160 (14). Tyto kmeny byly soustředěny do několika skupin – jedna větší skupina čítající kmeny (pořadové č.: 5, 11, 12, 6, 10) s mírou podobnosti v rozpětí 95 – 88 % a další skupiny po dvojicích kmenů (pořadové č.: 4 a 17; 13 a 14). Třetí blok tvoří kmeny M448 (3) a M432 (8). Poslední samostatný blok tvoří referenční americké kmeny BBA01 (23) a BBA02 (24), které se výrazně odlišují od všech autochtonních kmenů původem z jihočeského regionu. Míra jejich odlišnosti je na úrovni 30 %. Tato míra odlišnosti je velmi významná a naznačuje příslušnost těchto amerických kmenů k jiné genetické/geografické skupině.

Hodnocená sada kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* původem z různých lokalit jihočeského regionu vykázala nízkou variabilitu (7 – 18 %) v porovnání s referenčními americkými kmeny (28 %). Na druhou stranu RAPD analýzou nebyla ve většině případů prokázána shoda (míra podobnosti) mezi kmeny izolovanými ze stejných okresů nebo lokalit odběru. Například kmen M345 z lokality Pístina (Jindřichův Hradec) se nachází v prvém bloku s mírou podobnosti 91 % ke kmenu M445 z lokality odběru Hluboká (České Budějovice). Naproti tomu kmen M067 a M062 z lokality Pístina se nacházejí ve druhém bloku.

Obrázek 5.1: Podobnostní matice sady kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* izolované v jihočeském regionu.

	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21	L22	L23	L24
L2	1.00																						
L3	0.79	1.00																					
L4	0.83	0.85	1.00																				
L5	0.85	0.79	0.89	1.00																			
L6	0.86	0.80	0.86	0.90	1.00																		
L7	0.91	0.84	0.86	0.90	0.90	1.00																	
L8	0.91	0.91	0.90	0.94	0.94	0.98	1.00																
L9	0.90	0.81	0.88	0.87	0.90	0.90	0.83	1.00															
L10	0.82	0.83	0.96	0.89	0.88	0.90	0.83	0.88	1.00														
L11	0.96	0.83	0.87	0.95	0.89	0.90	0.87	0.89	0.89	1.00													
L12	0.86	0.80	0.86	0.90	0.87	0.88	0.82	0.88	0.90	0.92	1.00												
L13	0.81	0.82	0.84	0.83	0.84	0.90	0.81	0.83	0.81	0.81	0.78	1.00											
L14	0.90	0.82	0.83	0.92	0.92	0.95	0.86	0.94	0.86	0.86	0.84	0.91	1.00										
L15	0.84	0.80	0.83	0.86	0.84	0.85	0.82	0.82	0.87	0.85	0.84	0.83	0.85	1.00									
L16	0.84	0.74	0.82	0.83	0.85	0.85	0.76	0.83	0.84	0.80	0.80	0.86	0.81	0.89	1.00								
L17	0.93	0.77	0.87	0.86	0.85	0.88	0.76	0.85	0.85	0.85	0.87	0.82	0.82	0.84	0.85	1.00							
L18	0.85	0.73	0.81	0.82	0.83	0.86	0.76	0.83	0.86	0.82	0.84	0.82	0.81	0.89	0.84	0.87	1.00						
L19	0.89	0.80	0.86	0.89	0.87	0.90	0.95	0.93	0.86	0.88	0.83	0.87	0.84	0.91	0.87	0.89	0.88	1.00					
L20	0.83	0.76	0.83	0.86	0.82	0.84	0.86	0.82	0.85	0.89	0.86	0.81	0.82	0.87	0.83	0.86	0.85	0.82	1.00				
L21	0.89	0.78	0.83	0.86	0.85	0.90	0.82	0.86	0.84	0.87	0.85	0.85	0.81	0.86	0.86	0.87	0.85	0.91	0.92	1.00			
L22	0.91	0.77	0.77	0.81	0.84	0.96	0.91	0.96	0.86	0.82	0.83	0.81	0.84	0.85	0.87	0.83	0.85	0.86	0.85	0.83	1.00		
L23	0.89	0.68	0.71	0.67	0.67	0.75	0.89	0.75	0.72	0.69	0.71	0.70	0.65	0.69	0.74	0.73	0.69	0.75	0.74	0.73	0.76	1.00	
L24	0.76	0.67	0.73	0.69	0.74	0.74	0.73	0.76	0.75	0.71	0.74	0.71	0.77	0.77	0.78	0.73	0.81	0.76	0.76	0.75	0.78	0.82	1.00

Obrázek 5.2: Stanovení genetické variability sady kmenů entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* z jihočeském regionu. Dendogram získaný na základě dat zpracovaných pomocí programu *Biprofil 1D ++*.



[5] Na obrázku 5.2 je chybný název kmene pod číslem 7 (~~M435~~). Správný název kmene je M345.

5.4. Předaplikační studie

Cílem (před)aplikační studie bylo 1. stanovit kompatibilitu autochtonních kmenů entomopatogenních hub s nosičem Beta-liq pomocí základních „in vitro" (bio)testů; 2. ověřit životaschopnost vybraných kmenů entomopatogenních hub po krátkodobém zamrazení; 3. ověřit použití jednoduché genetické metody pro rozlišení kmene a za 4. vyprodukovat a upravit biomasu entomopatogenních hub pro potřeby její aplikace.

5.4.1. Hodnocení kompatibility a produkčních charakteristik kmenů entomopatogenních hub v kombinaci s organominerálním hnojivem Beta-liq

Tato studie byla realizována v návaznosti na polyfaktoriální hodnocení kmenů (kapitola 5.2) izolovaných z půdy (kapitola 5.1). Cílem „in vitro" (bio)testů bylo stanovit kompatibilitu vybraných kmenů entomopatogenních hub s organominerálním hnojivem Beta-liq (o různé koncentraci) pro potřeby následné studie zaměřené na *„Vývoj a využití biopreparátů a organominerálních hnojiv podporujících rozklad organických látek a zvyšujících supresivitu půdy"* jejíž součástí byly nádobové a polní pokusy prováděné pracovníky VÚP Troubsko.

Beta-liq (10 a 50 % koncentrace)

Vstupním (bio)testem byla prokázána kompatibilita vybrané skupiny kmenů entomopatgenní houby *B. bassiana* a *M. anisopliae* původem z lokality Troubsko s přípravkem Beta-liq o 10 a 50 % koncentraci (Tabulka 5.31 a 5.32). Ovšem detailním porovnáním výsledků klíčivosti a vývoje kmenů entomopatogenních hub s kontrolní variantou (Tabulka 5.25 a 5.26) byly zjištěny rozdíly v rámci hodnoceného druhu i kmene entomopatogenní houby. U hodnocené skupiny kmenů druhu *B. bassiana* byl u obou koncentrací přípravku Beta-liq pozorován pomalejší vývoj kmenů oproti kontrole po 24 hodinách testu viz. průměrné hodnoty vývoje kmenů (Graf 5.8). Tento rozdíl se vyrovnal po 48 hodinách testu, kdy byl pozorován rychlejší vývoj kmenů s přípravkem Beta-liq (10 %). Vývoj kmenů (s výjimkou kmene 1A-I-1) byl stejně jako u kontrolní varianty realizován do 72 hodin.

Do testování byly také zařazeny kmeny tří druhů entomopatogenních hub původem z jihočeského regionu (Tabulka 5.33). U kmenů druhu *P. fumosoroseus* a *B. bassiana* byl zjištěn vysoký stupeň kompatibility s přípravkem Beta-liq o 10 % koncentraci oproti entomopatogenní houbě *M. anisopliae*, kde byl zaznamenán výrazně pomalejší vývoj (Graf 5.12) a minimální (v průměru 3 %) klíčivost oproti v průměru 70 % klíčivosti u kmenů v kontrole (Tabulka 5.22). U většiny kmenů druhu *B. bassiana* byla pozorována po 48 hodinách testu větší produkce mycelia na úkor pozdější (o 24 hodin) plné sporulace.

Beta-liq (50 , 70 a 90 % koncentrace)

Na základě těchto zjištění byla připravena nová koncentrační řada přípravku Beta-liq o 50 %, 70 % a 90 % koncentraci. Kompatibilita s přípravkem byla hodnocena u kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* (Tabulka 5.34 – 5.36, Graf 5.13 – 5.16) a *M. anisopliae* (Tabulka 5.37 – 5.39, Graf 5.17 – 5.20) původem z lokality Troubsko. U obou druhů entomopatogenních hub nebyly patrné významné rozdíly mezi vývojem kmenů téhož druhu při zvolených koncentracích přípravku Beta-liq. Positivní efekt přípravku Beta-liq na rychlost vývoje kmenů byl pozorován především u druhu *M. anisopliae* (Graf 5.22) po 48 a 72 hodinách (bio)testu, kdy průměrná hodnota vývoje všech kmenů (*M. anisopliae*) po 48 hodinách a při všech zvolených koncentracích byla v průměru index GI 2,00 oproti průměrnému indexu vývoje 1,09 u kmenů v kontrole s rozpětím indexu vývoje od 0,30 do

2,02 (Tabulka 5.25 – 5.26). Oproti kontrolní variantě byl pozorován také pozitivní efekt přípravku Beta-liq na dřívější sporulaci (o 24 hodin) u kmene 1-D-II a M414 při všech zvolených koncentracích a kmene M398 a M400 při 50 % koncentraci. U entomopatogenní houby *B. bassiana* nebyl pozorován takový vliv přípravku Beta-liq na rychlost vývoje kmenů při všech zvolených koncentracích (Graf 5.21). Spíše došlo k podpoře růstu mycelia na úkor pozdější (o 24 hodin) plné sporulaci oproti kontrole např. u kmene M403 a M404 při všech hodnocených koncentracích a kmene M410 při 70 a 90 % koncentraci přípravku Beta-liq. Obdobně jako u druhu *M. anisopliae* vykazovaly kmeny (*B. bassiana*) při všech koncentracích přípravku Beta-liq minimální variabilitu rychlosti vývoje po 24 hodinách (bio)testu oproti kmenům v kontrolní variantě. Klíčivost kmenů (*B. bassiana*) byla také zřejmě ovlivněna přítomností přípravku Beta-liq, protože průměrná klíčivost všech hodnocených kmenů byla při 50 % koncentraci přípravku Beta-liq – 94 %, při 70 % koncentraci – 91 % a při 90 % koncentraci – 88 % oproti 79 % klíčivosti u kmenů (*B. bassiana*) v kontrolní variantě. U druhu *M. anisopliae* byla pozorována vyšší klíčivosti kmenů v kombinaci s přípravkem Beta-liq oproti (18 % klíčivosti) kmenů v kontrole, ale se vzrůstající koncentrací přípravku Beta-liq procento klíčivosti klesalo – 79 % při 50 % koncentraci přípravku Beta-liq oproti 40 % klíčivosti kmenů v kombinaci s 90 % koncentrací přípravku Beta-liq.

Základní růstové a produkční charakteristiky – Beta-liq (90 %)

Základní růstové a produkční parametry vybraných kmenů entomopatogenních hub izolovaných na lokalitě Troubsko vykazovaly při nejvyšší zvolené koncentraci (90 %) přípravku Beta-liq (Tabulka 5.40 – 5.41)obdobné výsledky jako kmeny v kontrole (Tabulka 5.27 – 5.28). Nepatrné rozdíly v růstových a produkčních charakteristikách byly zaznamenány pouze u některých kmenů, např. u kmene M409 (*B. bassiana*) nebo kmene M402 (*M. anisopliae*) byl pozorován nárůst středové kultury v průměru o 2 – 3 cm. Vliv přípravku Beta-liq na produkci konidií hodnocených kmenů na umělém živném médiu (PDA) byl u jednotlivých kmenů rozdíly, např.v porovnání s kontrolní variantou (Tabulka 5.27) byl u kmene (*B. bassiana*) M403, M408 a M410 v průměru zaznamenán nárůst produkce o $2{,}05.10^7$ konidií/ 100 mm^2 oproti poklesu produkce o $4{,}94.10^7$ konidií/ 100 mm^2 u kmene (*B. bassiana*) 1A-I-1, M396 a M399. U druhu *M. anisopliae* byl oproti kontrolní variantě (Tabulka 5.28) zaznamenán rozdíl v produkci především u kmene M 405 (nižší produkce o $4{,}31.\ 10^7$ konidií/ 100 mm^2) a M413 (nižší produkce o $5{,}53.\ 10^7$ konidií/ 100 mm^2). Celkově byla v průměru zaznamenána nižší produkce o $1{,}92.10^7$ konidií/ 100 mm^2 u kmenů druhu *B. bassiana* a stejně tak u kmenů druhu *M. anisopliae* o $1{,}92.10^7$ konidií/ 100 mm^2. Menší produkce konidií na přirozeném médiu byla pozorována také u obou hodnocených druhů entomopatogenních hub, např. u kmenů (*M. anisopliae*) byl tento rozdíl v průměru $2{,}26.10^7$ konidií/ 1g krup.

Na základě výsledků z „in vitro“ (bio)testů byl stanoven vysoký stupeň kompatibility vybraných kmenů nejfrekventovanějších druhů entomopatogenních druhů s organominerálním hnojivem Beta-liq přesto, že vstupní test klíčivosti v kombinaci s přípravkem Beta-liq (10 % a 50 %) nevykazoval tak příznivé vývojové charakteristiky (GI). Následným (bio)testem byl prokázán příznivý efekt přípravku Beta-liq především u kmenů druhu *M. anisopliae*. Optimální koncentrace přípravku Beta-liq byla pro vývoj kmenů (GI) stanovena na 50 % přípravku, kdy u většiny testovaných kmenů došlo k intenzivnímu myceliálnímu růstu především po 24 – 48 hodinách testu s vyšším procentem klíčivých konidií. Hodnocením základních růstových a produkčních charakteristik byla také potvrzena kompatibilita s přípravkem Beta-liq přesto, že byla u některých kmenů pozorována nižší produkce konidií na umělém nebo přirozeném živném médiu oproti kontrolní variantě. Z výsledků bylo zřejmé, že podpora růstu myceliální biomasy u většiny kmenů nezapříčinila také zvýšenou produkci konidií. Na základě hodnocení klíčových charakteristik kmenů

entomopatogenních hub bylo organominerální hnojivo Beta-liq doporučeno jako nosič entomopatogenních hub při introdukci do půdy ve studii zaměřené na „*Vývoj a využití biopreparátů a organominerálních hnojiv podporujících rozklad organických látek a zvyšujících supresivitu půdy*" Pro potřeby této studie byly z lokality Troubsko vybrány dva kmeny vykazující optimální výsledky ve sledovaných charakteristikách (kapitola 5.2.3 a 5.4.1) – kmen M408 (*B. bassiana*) a M394 (*M. anisopliae*).

Výsledky kompatibility s přípravkem Beta-liq (10 a 50 % koncentrace)

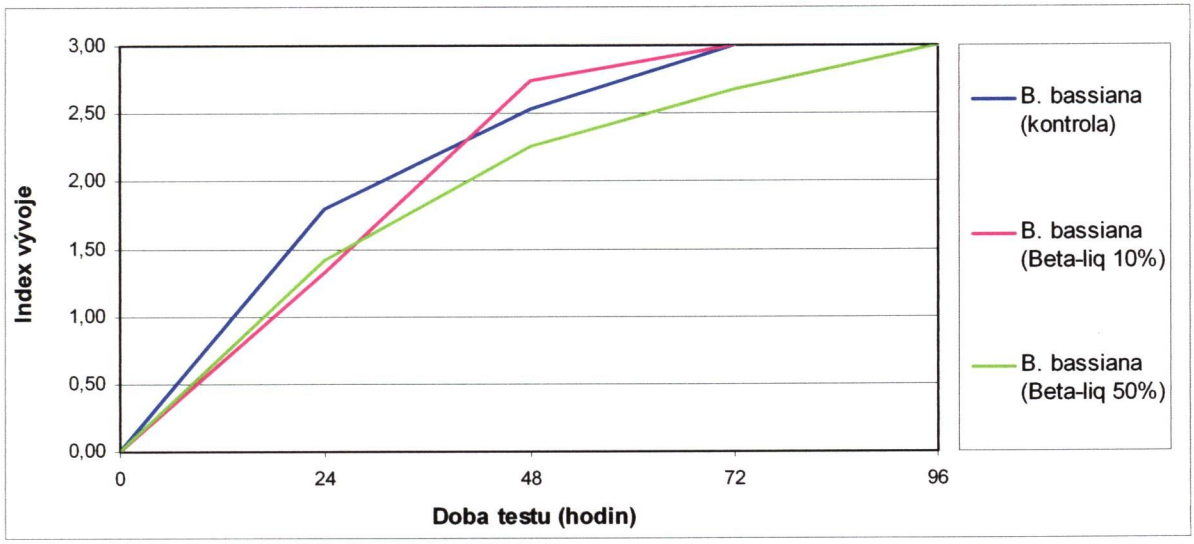
Tabulka 5.31: Hodnocení klíčivosti a vývoje kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* a *M. anisopliae* izolovaných na lokalitě VÚP Troubsko v kombinaci s přípravkem Beta-liq (10 % koncentrace)

Druh	Kmen	Klíčivost (%)	Průměrný index vývoje (± SMODCH)			
			24 hod	48 hod	72 hod	96 hod
Beauveria bassiana	1A-I-1	100	2,00 ± 0,0000	2,50 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000	–
	M395	98	1,91 ± 0,3788	2,50 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000	–
	M396	93	1,65 ± 0,6866	3,00 ± 0,0000	–	–
	M399	97	1,64 ± 0,6522	2,10 ± 0,2828	3,00 ± 0,0000	–
Metarhizium anisopliae	M401	85	1,68 ± 0,7259	2,50 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000	–

Tabulka 5.32: Hodnocení klíčivosti a vývoje kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* a *M. anisopliae* izolovaných na lokalitě VÚP Troubsko v kombinaci s přípravkem Beta-liq (50 % koncentraci)

Druh	Kmen	Klíčivost (%)	Průměrný index vývoje (± SMODCH)			
			24 hod	48 hod	72 hod	96 hod
Beauveria bassiana	1A-I-1	88	1,30 ± 0,8124	2,00 ± 0,0000	2,00 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000
	M395	100	1,67 ± 0,6214	3,00 ± 0,0000	–	–
	M396	88	1,54 ± 0,7671	2,00 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000	–
	M399	78	1,16 ± 0,8709	2,00 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000	–
Metarhizium anisopliae	M401	94	1,14 ± 0,7676	2,01 ± 0,0497	3,00 ± 0,0000	–

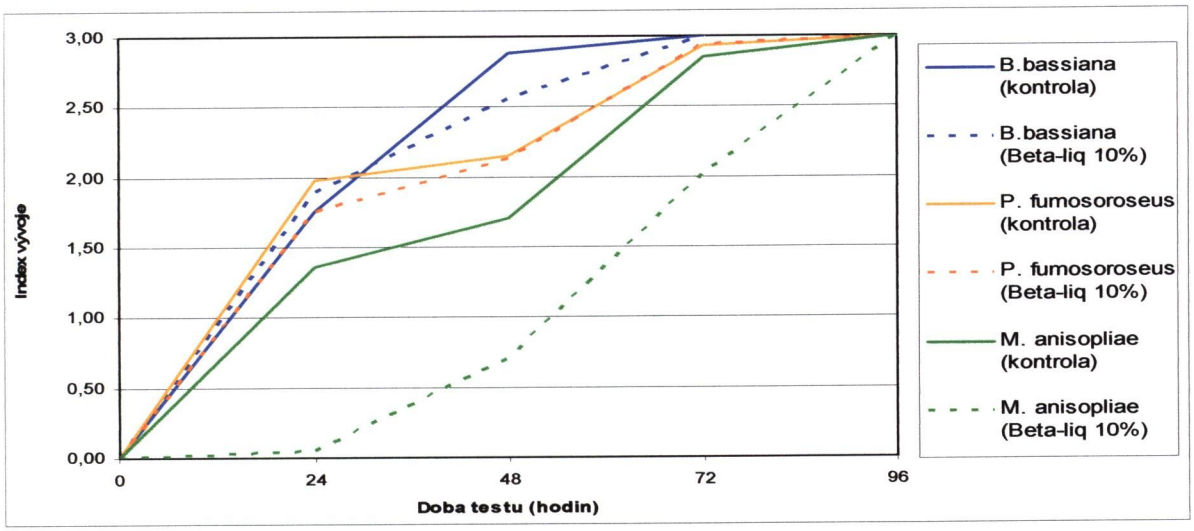
Graf 5.11: Porovnání průměrného indexu vývoje (GI) kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* v kontrole a v kombinaci s přípravkem Beta-liq (10 a 50 % koncentrace)



Tabulka 5.33: Hodnocení klíčivosti a vývoje kmenů entomopatogenních hub (*P. fumosoroseus*, *B. bassiana* a *M. anisopliae*) izolovaných na různých lokalitách jihočeského regionu v kombinaci s přípravkem Beta-liq (10 % koncentrace)

Druh	Kmen	Klíčivost (%)	Průměrný index vývoje (± SMODCH)			
			24 hod	48 hod	72 hod	96 hod
Beauveria bassiana	M062	99	1,83 ± 0,4859	2,50 ± 0,0000	–	–
	M067	100	2,00 ± 0,0000	2,90 ± 0,2000	3,00 ± 0,0000	–
	M081	90	1,80 ± 0,6004	2,50 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000	–
	M099	92	1,69 ± 0,6355	2,50 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000	–
	M101	100	2,00 ± 0,0000	2,50 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000	–
	M104	100	1,72 ± 0,5756	2,50 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000	–
	M108	100	2,00 ± 0,0000	2,55 ± 0,1500	3,00 ± 0,0000	–
	M152	100	2,00 ± 0,0000	2,60 ± 0,2000	3,00 ± 0,0000	–
	M175	100	2,00 ± 0,0000	2,50 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000	–
	M185	96	1,77 ± 0,5763	2,50 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000	–
Paecilomyces fumosoroseus	M064	90	1,71 ± 0,6561	2,00 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000	–
	M069	87	1,74 ± 0,6726	2,00 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000	–
	M074	81	1,62 ± 0,7846	2,00 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000	–
	M093	89	1,78 ± 0,6258	2,00 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000	–
	M094	100	1,82 ± 0,4874	2,00 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000	–
	M096	100	1,96 ± 0,2311	2,50 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000	–
	M098	100	1,65 ± 0,6062	2,00 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000	–
	M100	88	1,76 ± 0,6499	2,50 ± 0,0000	2,50 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000
Metarhizium anisopliae	M076	6	0,12 ± 0,4750	0,80 ± 0,9798	2,00 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000
	M080	2	0,04 ± 0,2800	0,20 ± 0,6000	2,06 ± 0,1625	3,00 ± 0,0000
	M102	0	0,00 ± 0,0000	1,14 ± 0,9902	2,00 ± 0,0000	–

Graf 5.12: Porovnání průměrného indexu vývoje (GI) kmenů entomopatogenních hub (*P. fumosoroseus, B. bassiana a M. anisopliae*) v kontrole (Tabulka 5.22) a v kombinaci s přípravkem Beta-liq – 10 % koncentrace(Tabulka 5.31)



Výsledky kompatibility s přípravkem Beta-liq (50 , 70 a 90 % koncentrace)

Tabulka 5.34: Hodnocení klíčivosti a vývoje kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* izolovaných na lokalitě VÚP Troubsko v kombinaci s přípravkem Beta-liq (50 % koncentrace)

Kmen	Klíčivost (%)	Průměrný index vývoje (± SMODCH)			
		24 hod	48 hod	72 hod	96 hod
M403	85	1,45 ± 0,7839	2,32 ± 0,2414	3,00 ± 0,0000	–
M404	100	1,82 ± 0,4925	2,39 ± 0,2104	3,00 ± 0,0000	–
M408	97	1,56 ± 0,6996	2,03 ± 0,1090	3,00 ± 0,0000	–
M409	96	1,39 ± 0,6995	2,15 ± 0,2291	3,00 ± 0,0000	–
M410	94	1,37 ± 0,7309	2,00 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000	–

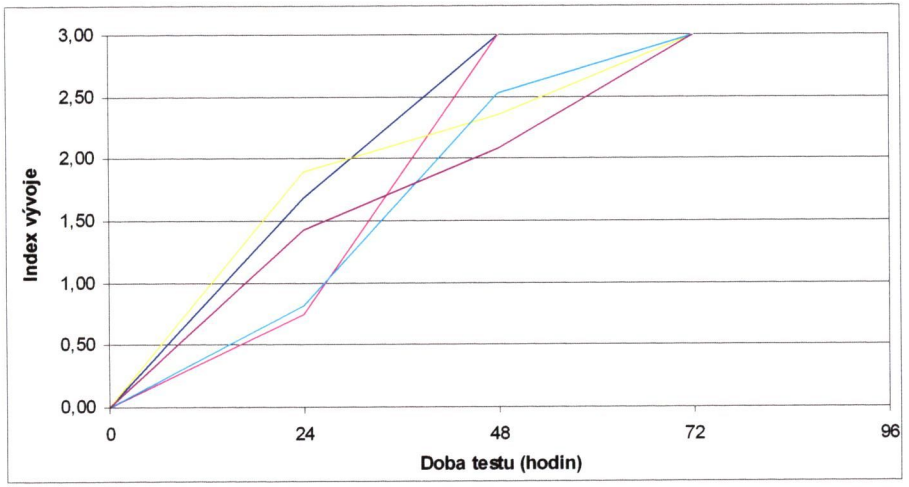
Tabulka 5.35: Hodnocení klíčivosti a vývoje kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* izolovaných na lokalitě VÚP Troubsko v kombinaci s přípravkem Beta-liq (70 % koncentrace)

Kmen	Klíčivost (%)	Průměrný index vývoje (± SMODCH)			
		24 hod	48 hod	72 hod	96 hod
M403	84	1,27 ± 0,8168	2,34 ± 0,2351	3,00 ± 0,0000	–
M404	96	1,66 ± 0,6507	2,33 ± 0,2385	3,00 ± 0,0000	–
M408	90	1,45 ± 0,7710	2,23 ± 0,2487	3,00 ± 0,0000	–
M409	95	1,28 ± 0,7013	2,50 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000	–
M410	94	1,16 ± 0,6808	2,00 ± 0,0000	2,00 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000

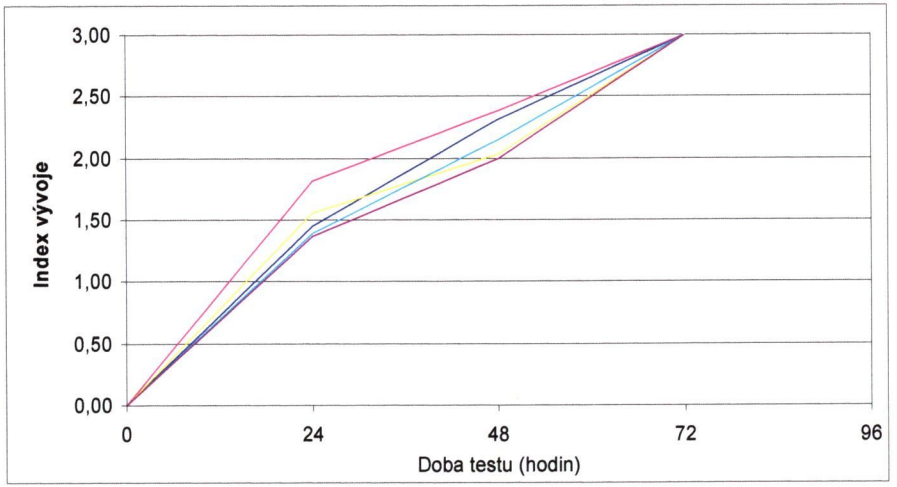
Tabulka 5.36: Hodnocení klíčivosti a vývoje kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* izolovaných na lokalitě VÚP Troubsko v kombinaci s přípravkem Beta-liq (90 % koncentrace)

Kmen	Klíčivost (%)	Průměrný index vývoje (± SMODCH)			
		24 hod	48 hod	72 hod	96 hod
M403	79	1,18 ± 0,8437	2,39 ± 0,2104	3,00 ± 0,0000	–
M404	95	1,36 ± 0,6975	2,24 ± 0,2495	3,00 ± 0,0000	–
M408	89	1,26 ± 0,8200	1,26 ± 0,8200	3,00 ± 0,0000	–
M409	90	1,12 ± 0,7411	2,04 ± 0,1356	3,00 ± 0,0000	–
M410	87	0,81 ± 0,5735	2,00 ± 0,0000	2,00 ± 0,0000	3,00 ± 0,0000

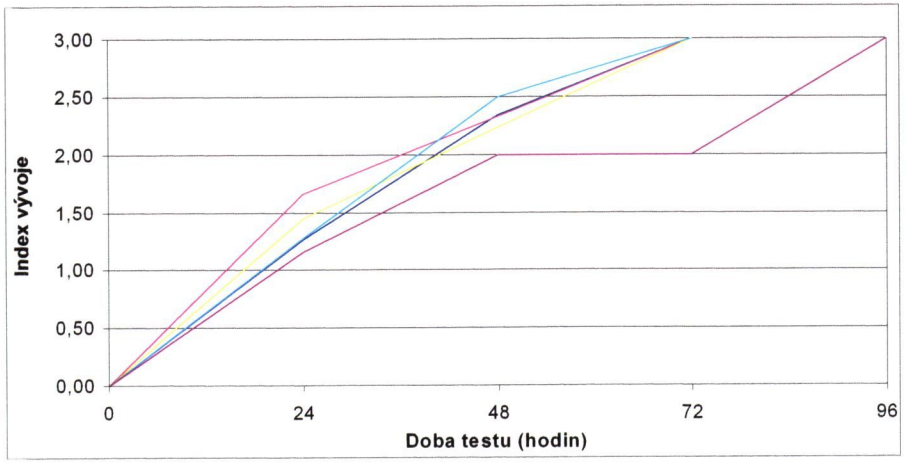
Graf 5.13: Vývoj kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* v kontrole (Tabulka 5.25)



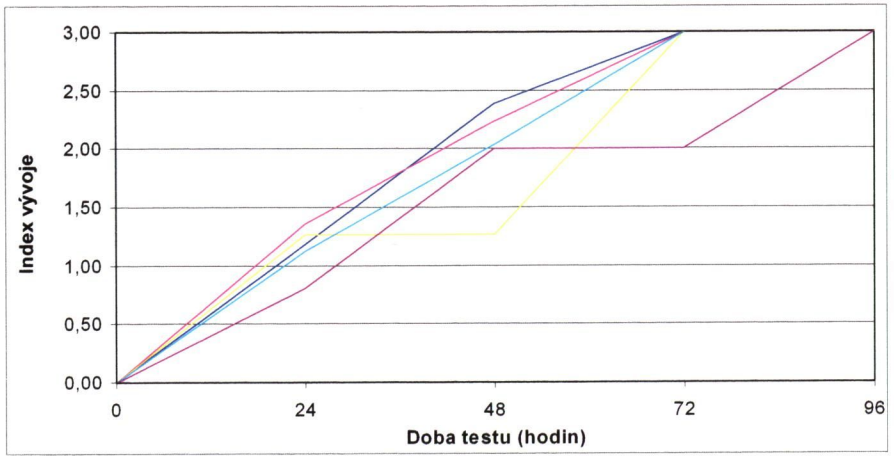
Graf 5.14: Vývoj kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* v kombinaci s přípravkem Beta-liq (50 % koncentrace)



Graf 5.15: Vývoj kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* v kombinaci s přípravkem Beta-liq (70 % koncentrace)

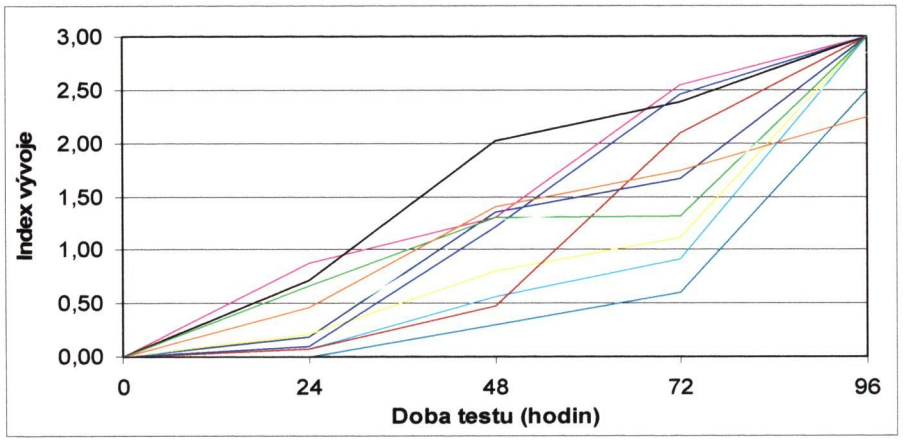


Graf 5.16: Vývoj kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* v kombinaci s přípravkem Beta-liq (90 % koncentrace)

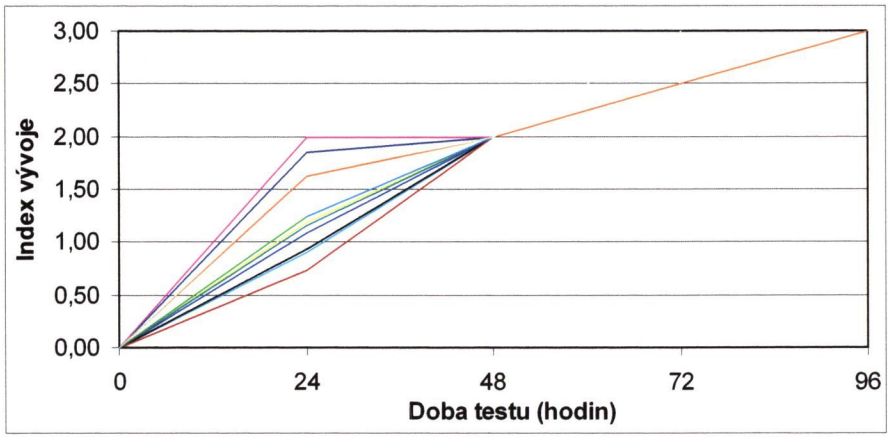


M 403 M404 M408 M409 M410

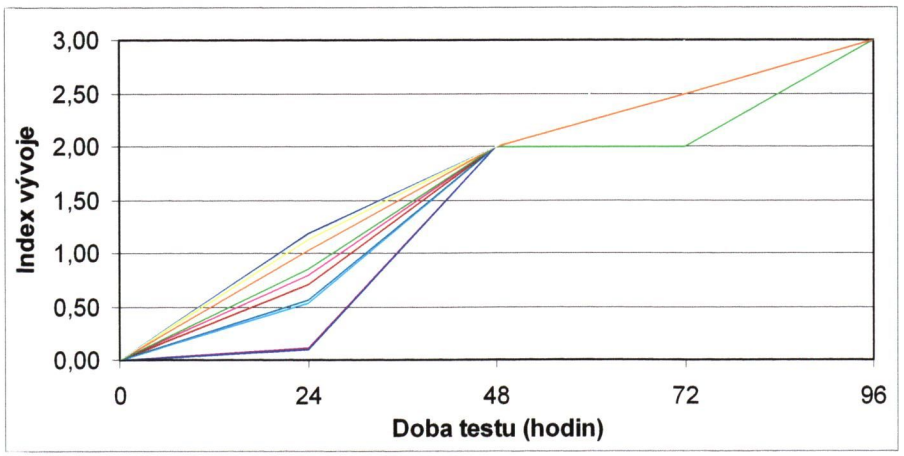
Graf 5.17: Vývoj kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* v kontrole (Tabulka 5.26)



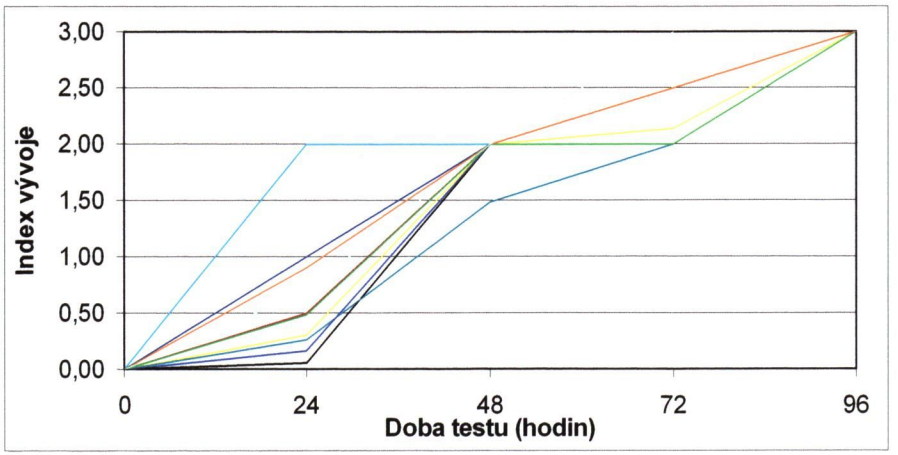
Graf 5.18: Vývoj kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* v kombinaci s přípravkem Beta-liq (50 % koncentrace)



Graf 5.19: Vývoj kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* v kombinaci s přípravkem Beta-liq (70 % koncentrace)

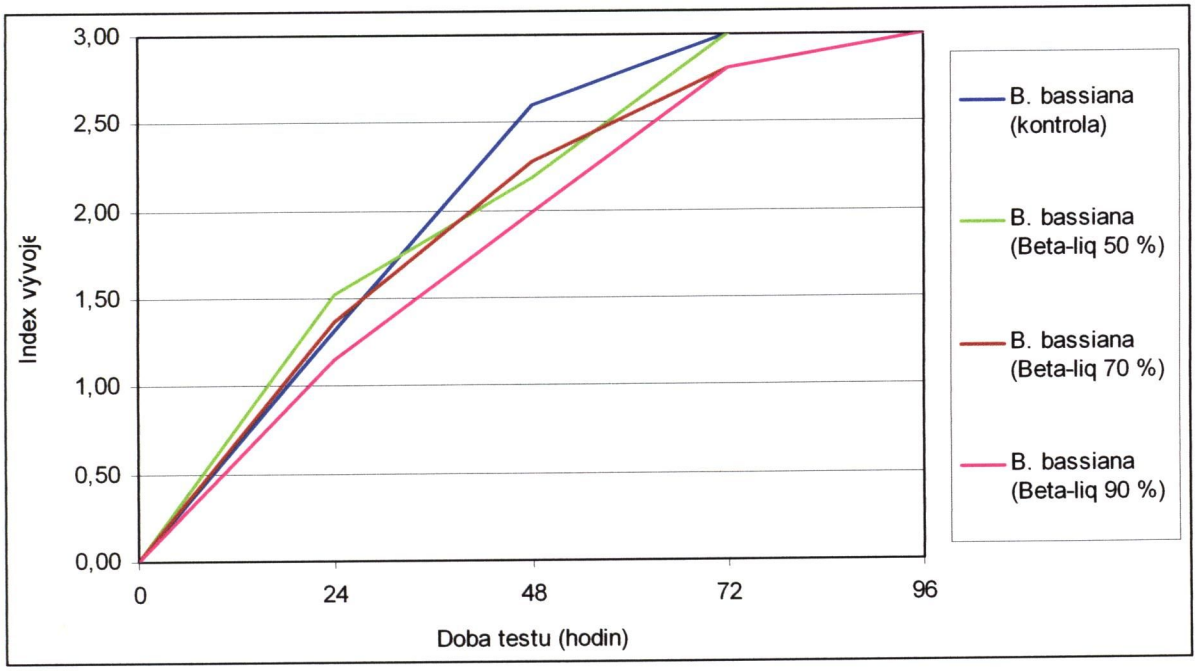


Graf 5.20: Vývoj kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* v kombinaci s přípravkem Beta-liq (90 % koncentrace)

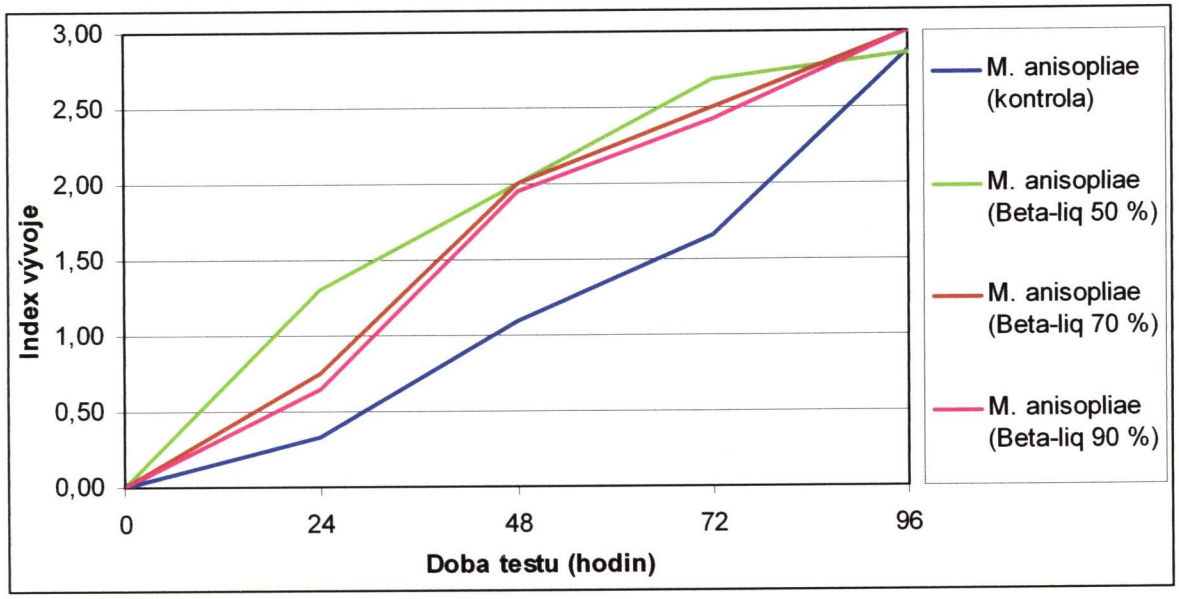




Graf 5.21: Porovnání průměrného indexu vývoje (GI) všech kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* v kontrole (Tabulka 5.25) a v kombinaci s přípravkem Beta-liq – 50, 70 a 90 % koncentrace (Tabulka 5.34 – 5.36)



Graf 5.22: Porovnání průměrného indexu vývoje (GI) všech kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* v kontrole (Tabulka 5.26) a v kombinaci s přípravkem Beta-liq – 50, 70 a 90 % koncentrace (Tabulka 5.37 – 5.39)



Výsledky základních růstových a produkčních charakteristik – Beta-liq (90 %)

Tabulka 5.40: Základní růstové a produkční charakteristiky kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* izolované na lokalitě VÚP Troubsko v kombinaci s přípravkem Beta-liq (90 %)

Kmen	Středová kultura			Substrát
	Radiální průměr ± SMDCH (mm)	Spory/ 1 kultura	Spory/ 100 mm^2	Spory/1g
1A-I-1	31,6 ± 0,8570	1,78.10^8	2,26.10^7	x [4)]
M395	33,3 ± 0,4330	2,47.10^8	2,84.10^7	x
M396	29,8 ± 0,6872	4,77.10^8	6,82.10^7	x
M399	29,8 ± 0,7993	7,13.10^8	1,02.10^8	x
M403	29,3 ± 2,9047	4,43.10^8	6,59.10^7	4,54.10^8
M404	29,3 ± 1,4604	2,00.10^8	2,97.10^7	1,04.10^8
M408	35,6 ± 0,8268	7,64.10^8	7,70.10^7	2,59.10^8
M409	29,5 ± 1,8540	8,86.10^8	1,30.10^8	2,44.10^8
M410	34,5 ± 0,6258	4,75.10^8	5,07.10^7	2,86.10^8

Tabulka 5.41: Základní růstové a produkční charakteristiky kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* izolované na lokalitě VÚP Troubsko v kombinaci s přípravkem Beta-liq (90 %)

Kmen	Středová kultura			Substrát
	Radiální průměr ± SMDCH (mm)	Spory/ 1 kultura	Spory/ 100 mm^2	Spory/1g
1-D-II	34,0 ± 0,8406	3,25.10^8	3,57.10^7	1,94.10^8
M394	32,6 ± 1,4476	3,47.10^8	4,16.10^7	4,80.10^8
M397	32,5 ± 0,5000	3,60.10^8	4,34.10^7	3,96.10^8
M398	31,4 ± 1,7685	5,40.10^8	7,00.10^7	1,18.10^8
M400	30,7 ± 1,2402	2,07.10^8	2,81.10^7	2,69.10^8
M401	36,5 ± 1,5546	2,13.10^8	2,04.10^7	4,96.10^8
M402	41,1 ± 2,7300	1,63.10^8	1,23.10^7	1,49.10^8
M405	29,9 ± 0,8122	4,00.10^8	5,69.10^7	1,03.10^8
M406	33,8 ± 2,1485	2,69.10^8	3,01.10^7	3,10.10^7
M411	32,0 ± 0,0000	5,70.10^8	7,09.10^7	3,77.10^8
M413	26,9 ± 0,7525	7,86.10^7	1,38.10^7	3,85.10^7
M414	30,7 ± 0,7174	3,00.10^8	4,05.10^7	2,29.10^8

5.4.2. Hodnocení životaschopnosti vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* a *M. anisopliae* po krátkodobém zamražení

Ze souhrnné charakteristiky kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* a *M. anisopliae* (kapitola 5.2.3 a 5.4.1) izolované na lokalitě Troubsko byly vybrány kmeny M408 (*B. bassiana*) a M394 (*M. anisopliae*), které vykazovaly optimální růstové, produkční a biologické parametry. Cílem této studie bylo ověřit životaschopnost a vitalitu konidií těchto dvou kmenů entomopatogenních hub po krátkodobém (14 denním) zamražení konidiové suspenze pro potřeby transportu vyprodukované biomasy hub ve studii zaměřené na *„Vývoj a využití biopreparátů a organominerálních hnojiv podporujících rozklad organických látek a zvyšujících supresivitu půdy"*.

U zamražené konidiové suspenze kmene M 408 a kmene M 394 byly prokázány srovnatelné hodnoty průměrného indexu vývoje a procenta klíčivosti konidií jako v kontrolní variantě (Tabulka 5.41 – 5.42). Tím byla ověřena životaschopnost a vitalita konidií entomopatogenní houby *B. bassiana* (kmen M 408) a *M. anisopliae* (kmen M 394) i po krátkodobém (14 denním) zamražení

Tabulka 5.42: Hodnocení klíčivosti a vývoje (index GI) kmene M408 (*B. bassiana*) po krátkodobém zamrazení

Doba testu (hodin)	Kontrolní suspenze		Rozmražená suspenze	
	Průměrný index vývoje ± SMODCH	Klíčivost (%)	Průměrný index vývoje ± SMODCH	Klíčivost (%)
24	1,97 ± 0,2216	99	2,11 ± 0,2071	100
48	2,68 ± 0,2385	100	2,84 ± 0,2332	100
72	3,00 ± 0,0000	100	3,00 ± 0,0000	100

Tabulka 5.43: Hodnocení klíčivosti a vývoje (index GI) kmen M 394 (*M. anisopliae*) po krátkodobém zamrazení

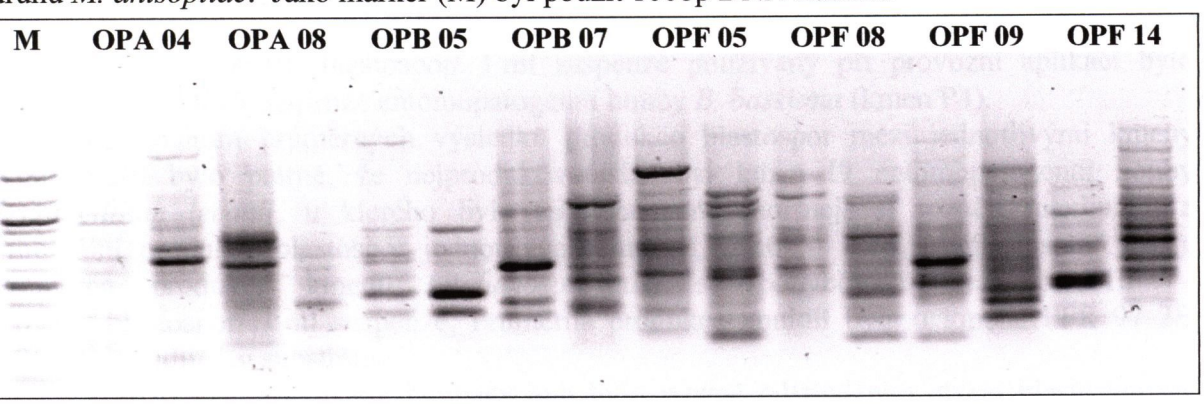
Doba testu (hodin)	Kontrolní suspenze		Rozmražená suspenze	
	Průměrný index vývoje ± SMODCH	Klíčivost (%)	Průměrný index vývoje ± SMODCH	Klíčivost (%)
24	0,79 ± 0,9676	40	0,86 ± 0,9902	43
48	1,34 ± 0,9404	67	1,46 ± 0,8879	73
72	2,50 ± 0,0000	100	2,50 ± 0,0000	100
96	3,00 ± 0,0000	100	3,00 ± 0,0000	100

5.4.3. Demonstrace použití RAPD analýzy pro rozlišení kmene entomopatogenní houby *B. bassiana*

Záměrem analýzy bylo prezentovat možnost použití jednoduché molekulárně-genetické metody RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) pro potřeby případné determinace re-izolovaných kmenů entomopatogenních hub na lokalitě Troubsko.

Pro demonstraci byl použito 8 náhodných primerů ze souboru OP-A, OP-B a OP-F (OPERON TECHNOLOGY, CA). Na obrázku 5.3 jsou ukázána spektra RAPD markerů u jednotlivých primerů selektovaných kmenů (v pořadí) M408 a M394. Přehled počtu generovaných pruhů pro každý primer udává tabulka (Tabulka 5.43) a číselné vyjádření specifického fingerprintu znázorňuje obrázek (Obrázek 5.4).

Obrázek 5.3: Ukázka RAPD produktů u kmene (M408) druhu *B. bassiana* a kmene (M394) druhu *M. anisopliae*. Jako marker (M) byl použit 100bp DNA Ladder.



Tabulka 5.44: Množství RAPD fragmentů u jednotlivých primerů (OPERON TECHNOLOGY, CA) u kmene M408 a M394 entomopatogenní houby *B. bassiana*

Primer	Sekvence 5´ - 3´	Počet amplifikovaných fragmentů u entomopatogenní houby kmene	
		M408	M394
OPA 04	AATCGGGCTG	7	8
OPA 08	GTGACGTAGG	5	6
OPB 05	TGCGCCCTTC	8	5
OPB 07	GGTGACGCAG	8	8
OPF 05	CCGAATTCCC	8	8
OPF 08	GGGATATCGG	8	8
OPF 09	CCAAGCTTCC	8	8
OPF 14	TGCTGCAGGT	8	8
Celkový počet fragmentů		60	59

Obrázek 5.4: Ukázka specifického fingerprintu kmenů (M408 a M394) (kit OP-A, -B a -F). V tabulce jsou uvedeny velikosti amplifikovaných RAPD fragmentů (bp).

	M	OPA 04	OPA 08	OPB 05	OPB 07	OPF 05	OPF 08	OPF 09	OPF 14
	MW-RF								
	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17
1	1.500	1.070	1.752	0.826	0.708	1.896	0.920	2.052	2.088	1.560	1.320	1.524	1.296	1.932	1.608	1.368	2.076
2	1.200	0.976	1.035	0.762	0.607	0.900	0.717	1.596	1.188	1.320	1.165	1.428	1.212	1.668	1.368	1.094	1.776
3	1.000	0.685	0.942	0.628	0.494	0.851	0.649	1.332	0.892	1.165	1.082	1.260	0.868	1.368	1.212	0.953	1.548
4	0.900	0.587	0.744	0.386	0.400	0.693	0.445	1.094	0.835	1.012	0.826	0.910	0.800	1.141	0.942	0.762	1.368
5	0.800	0.506	0.649	0.212	0.300	0.642	0.359	0.910	0.700	0.910	0.594	0.809	0.717	0.910	0.800	0.693	1.200
6	0.700	0.336	0.587		0.177	0.544		0.635	0.621	0.726	0.556	0.607	0.635	0.791	0.671	0.531	1.047
7	0.600	0.192	0.512			0.433		0.537	0.537	0.569	0.386	0.457	0.544	0.628	0.600	0.494	0.942
8	0.500		0.377			0.359		0.416	0.377	0.354	0.336	0.345	0.451	0.519	0.469	0.300	0.851

5.4.4 Produkce biomasy infekčních propagulí vybraných kmenů entomopatogenních hub a její úprava

Cílem této studie bylo ověřit možnost velkoobjemové produkce blastospor/ konidií kmenů vybraných druhů entomopatogenních hub v laboratorních podmínkách a vyprodukovanou biomasu hub upravit odstředěním.

Jednotlivé produkční charakteristiky (Tabulka 5.44 – 5.50) ukázaly, že za laboratorních podmínek bylo možné produkovat dostatečné množství biomasy entomopatogenních hub pro účely plošné aplikace. Velikost jednotlivých šarží se pohybovala mezi 700 – 6400 ml. Celkově nejvíce biomasy entomopatogenních hub bylo vyprodukováno pomocí submerzní kultivace u kmene Bba P4 (*B. bassiana*) v objemu 15 litrů o titru $7{,}28.10^8$ blastospor/ 1 ml suspenze a u kmene Man P4 (*M. anisopliae*) pomocí povrchové kultivace, kde bylo vyprodukováno 8 litrů konidiové suspenze o titru $2{,}42.10^8$ konidií/ 1 ml suspenze. Původ obou uvedených kmenů byl z lokality Pěnčín. Po přepočítání submerzní kultury na standardní titr $1{,}00.10^6$ blastospor/ 1 ml suspenze používaný při provozní aplikaci bylo získáno 11 397 litrů suspenze entomopatogenní houby *B. bassiana* (kmen P4).

Porovnáním průměrných výsledků produkce blastospor mezi jednotlivými kmeny (Graf 5.20) bylo patrné, že nejproduktivnějším byl kmen I9 entomopatogenní houby *Lecanicillium lecanii*, u kterého bylo také zaznamenáno nejširší rozpětí maximální a minimální produkce blastospor jednotlivých šarží ($1{,}22.10^9$ – $8{,}76.10^8$ blastospor/ 1 ml). Průměrná produkce kmenů (*P. fumosoroseus*) se pohybovala mezi $5{,}85.10^8$ – $4{,}65.10^8$ blastospor/ 1 ml suspenze. Průměrná produkce konidií byla u kmene PFR 97 2B $5{,}76.10^8$ konidií/ 1 g substrátu.

Z takto vyprodukované biomasy hub bylo možné odstředěním získat blastosporový nebo konidiový koncentrát v podobě blastosporové pasty o koncentraci $1{,}67.10^9$ – $6{,}83.10^9$ blastospor/ 1 g nebo konidiový koncentrát o $7{,}91.10^8$ – $1{,}12.10^9$ konidií/ 1 ml. Na získání 1 g takto koncentrovaného blastosporového koncentrátu bylo potřeba odstředit přibližně 5 litrů blastosporové suspenze. Výtěžnost blastosporového/ konidiového koncentrátu resp. podíl z původní submerzní kultury přepočítaný na standardní titr (100 %) byl nejlepší na přirozeném médiu (ječné kroupy) pomocí povrchové kultivace, kde byla výtěžnost konidiového koncentrátu přes 90 % oproti v průměru 82 % výtěžnosti blastosporové pasty.

Touto studií bylo ověřeno, že za daných laboratorních podmínek bylo možné vyprodukovat a upravit dostatečné množství biomasy entomomoptogenních hub v podobě konidiového koncentrátu nebo blastosporové pasty pro účely velkoplošné aplikace v množství 26 432 litrů blastosporové a konidiové suspenze o standardním titru $1{,}00.10^6$ blastospor-konidií/ 1 ml suspenze.

Produkce blastospor submerzní kultivací

Tabulka 5.45: Submerzní kultivace a výtěžnost blastosporové pasty entomopatogenní houby *Paecilomyces fumosoroseus* kmen PFR 97 2B

Produkční parametr	1. šarže	2. šarže	3. šarže	4. šarže	5. šarže
Submerzní kultura (ml)	1350	1600	2050	2400	2400
Titr (blastospor/1ml)	$4{,}30.10^{8}$	$5{,}90.10^{8}$	$4{,}80.10^{8}$	$6{,}30.10^{8}$	$6{,}10.10^{8}$
Blastospor celkem [5]	$5{,}81.10^{11}$	$9{,}44.10^{11}$	$9{,}84.10^{11}$	$1{,}51.10^{12}$	$1{,}46.10^{12}$
Suspenze $1{,}0x10^{6}$/ml (l) [6]	580,5	944	984	1512	1464
Pasta (g) [7]	274	352	461	439	410
Blastospor/ 1g pasty	$1{,}70.10^{9}$	$2{,}10.10^{9}$	$1{,}70.10^{9}$	$2{,}80.10^{9}$	$2{,}60.10^{9}$
Blastospor celkem	$4{,}66.10^{11}$	$7{,}39.10^{11}$	$7{,}83.10^{11}$	$1{,}22.10^{12}$	$1{,}06.10^{12}$
Suspenze $1{,}0x10^{6}$/ml (l)	465,8	739,2	783,7	1229,2	1066
Výtěžnost pasty (%) [8]	80,24	78,31	79,64	81,30	72,81

[5] Celkové množství blastospor/ konidií v původní submerzní/ povrchové kultuře

[6] Standardní titr suspenzí používaných při provozních aplikacích

[7] Blastosporový/ konidiový koncentrát získaný odstředěním submerzní/ povrchové kultury

[8] Podíl z původní submerzní/ povrchové kultury (100% = původní suspenze před finalizací odstředěním)

Tabulka 5.46: Submerzní kultivace a výtěžnost blastosporové pasty entomopatogenní houby *Paecilmyces fumosoroseus* kmen PFR 97 - H10

Produkční parametr	1. šarže	2. šarže	3. šarže	4. šarže
Submerzní kultura (ml)	1650	1400	1550	1000
Titr (blastospor/1ml)	$4{,}80.10^{8}$	$4{,}10.10^{8}$	$5{,}40.10^{8}$	$4{,}30.10^{8}$
Blastospor celkem [5]	$7{,}92.10^{11}$	$5{,}74.10^{11}$	$8{,}37.10^{11}$	$4{,}30.10^{11}$
Suspenze $1{,}0x10^{6}$/ml (l) [6]	792	574	837	430
Pasta (g) [7]	255	273	305	120
Blastospor/ 1g pasty	$2{,}50.10^{9}$	$1{,}60.10^{9}$	$2{,}10.10^{9}$	$2{,}80.10^{9}$
Blastospor celkem	$6{,}38.10^{11}$	$4{,}36.10^{11}$	$6{,}40.10^{11}$	$3{,}36.10^{11}$
Suspenze $1{,}0x10^{6}$/ml (l)	638	437	641	336
Výtěžnost pasty (%) [8]	80,49	76,10	76,52	78,14

Tabulka 5.47: Submerzní kultivace a výtěžnost blastosporové pasty entomopatogenní houby *Paecilomyces fumosoroseus* kmen PFR 97 H20

Produkční parametr	1.šarže	2. šarže	3. šarže	4. šarže
Submerzní kultura (ml)	700	700	1050	1400
Titr (blastospor/1ml)	$6{,}30.10^{8}$	$5{,}10.10^{8}$	$5{,}90.10^{8}$	$6{,}10.10^{8}$
Blastospor celkem [5]	$4{,}41.10^{11}$	$3{,}57.10^{11}$	$6{,}20.10^{11}$	$8{,}54.10^{11}$
Suspenze $1{,}0x10^{6}$/ml (l) [6]	441	357	619,5	854
Pasta (g) [7]	209	195	288	373
Blastospor/ 1g pasty	$1{,}90.10^{9}$	$1{,}67.10^{9}$	$1{,}82.10^{9}$	$1{,}94.10^{9}$
Blastospor celkem	$3{,}97.10^{11}$	$3{,}26.10^{11}$	$5{,}24.10^{11}$	$7{,}24.10^{11}$
Suspenze $1{,}0x10^{6}$/ml (l)	397,1	325,65	524,16	723,62
Výtěžnost pasty (%) [8]	90,05	91,22	84,61	84,73

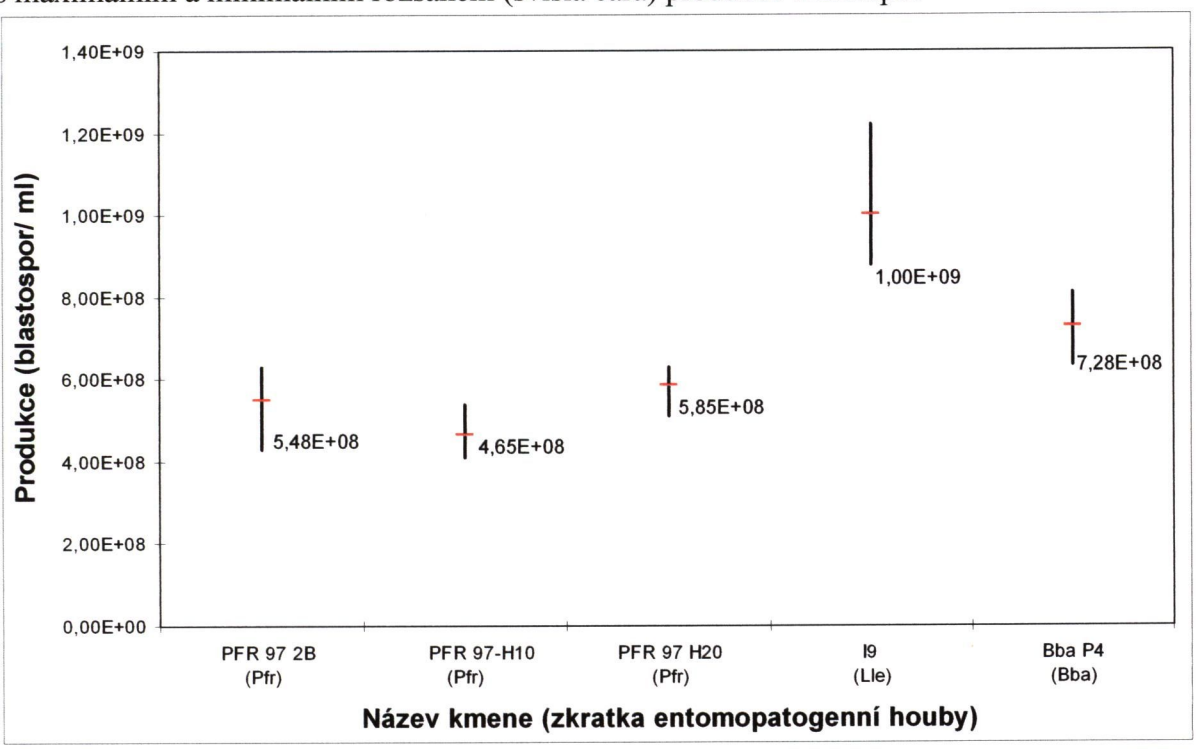
Tabulka 5.48: Submerzní kultivace a výtěžnost blastosporové pasty entomopatogenní houby *Lecanicillium lecanii* kmen I9

Produkční parametr	1.šarže	2.šarže	3. šarže	4. šarže	5. šarže
Submerzní kultura (ml)	1000	1400	1600	1050	1600
Titr (blastospor/1ml)	$8{,}84.10^{8}$	$1{,}05.10^{9}$	$8{,}76.10^{8}$	$9{,}80.10^{8}$	$1{,}22.10^{9}$
Blastospor celkem [5)]	$8{,}84.10^{11}$	$1{,}47.10^{12}$	$1{,}40.10^{12}$	$1{,}03.10^{12}$	$1{,}95.10^{12}$
Suspenze $1{,}0x10^{6}$/ml (l) [6)]	884	1470	1402	1029	1952
Pasta (g) [7)]	124	210	192	158	215
Blastospor/ 1g pasty	$5{,}77.10^{9}$	$5{,}63.10^{9}$	$6{,}33.10^{9}$	$5{,}66.10^{9}$	$6{,}83.10^{9}$
Blastospor celkem	$7{,}15.10^{11}$	$1{,}18.10^{12}$	$1{,}21.10^{12}$	$8{,}94.10^{11}$	$1{,}46.10^{12}$
Suspenze $1{,}0x10^{6}$/ml (l)	715,48	1182,3	1215,36	894,28	1468,45
Výtěžnost pasty (%) [8)]	80,94	80,43	86,71	86,91	75,23

Tabulka 5.49: Submerzní kultivace a výtěžnost blastosporové pasty entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* kmen Bba P4

Produkční parametr	1.šarže	2.šarže	3. šarže	4. šarže	5. šarže
Submerzní kultura (ml)	1350	1400	1050	6400	4800
Titr (blastospor/1ml)	$7{,}95.10^{8}$	$6{,}34.10^{8}$	$6{,}61.10^{8}$	$8{,}11.10^{8}$	$7{,}40.10^{8}$
Blastospor celkem [5)]	$1{,}07.10^{12}$	$8{,}88.10^{11}$	$6{,}94.10^{11}$	$5{,}19.10^{12}$	$3{,}55.10^{12}$
Suspenze $1{,}0x10^{6}$/ml (l) [6)]	1073	888	694	5190	3552
Pasta (g) [7)]	274	269	217	1143	865
Blastospor/ 1g pasty	$3{,}30.10^{9}$	$2{,}99.10^{9}$	$2{,}71.10^{9}$	$3{,}61.10^{9}$	$3{,}66.10^{9}$
Blastospor celkem	$9{,}04.10^{11}$	$8{,}05.10^{11}$	$5{,}88.10^{11}$	$4{,}13.10^{12}$	$3{,}17.10^{12}$
Suspenze $1{,}0x10^{6}$/ml (l)	904	805	588	4126	3166
Výtěžnost pasty (%) [8)]	84,25	90,65	84,73	79,50	89,13

Graf 5.23: Porovnání průměrné produkce (číselná hodnota) kmenů entomopatogenních hub s maximálním a minimálním rozsahem (svislá čára) produkce blastospor



Produkce konidií povrchovou kultivací

Tabulka 5.50: Povrchová kultivace a výtěžnost konidiového koncentrátu entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae* kmen Man P4

Parametr produkce	**1. šarže**	**2. šarže**	**3. šarže**
Substrát (g)	400	700	500
Základní suspenze (ml)	2000	4000	2000
Titr suspenze - spor/1ml	$2{,}10.10^{8}$	$2{,}42.10^{8}$	$2{,}73.10^{8}$
Celkem spor [5]	$4{,}20.10^{11}$	$9{,}68.10^{11}$	$5{,}46.10^{11}$
Spor/1g substrátu	$1{,}05.10^{9}$	$1{,}38.10^{9}$	$1{,}09.10^{9}$
Suspenze $1{,}0x10^{6}$ spor/1ml (l) [6]	420	968	546
Sporový koncentrát (ml) [7]	500	1000	600
Titr koncentrátu (spor/1ml)	$7{,}91.10^{8}$	$8{,}82.10^{8}$	$8{,}34.10^{8}$
Celkem spor v koncentrátu	$3{,}96.10^{11}$	$8{,}82.10^{11}$	$5{,}01.10^{11}$
Suspenze $1{,}0x10^{6}$ spor/1ml (l)	396	882	500
Výtěžnost koncentrátu (%) [8]	94,17	91,12	91,66

Tabulka 5.51: Povrchová kultivace a výtěžnost konidiového koncentrátu entomopatogenní houby *Paecilomyces fumosoroseus* kmen PFR 97 2B

Parametr produkce	**1. šarže**	**2. šarže**	**3. šarže**
Substrát (g)	600	600	800
Základní suspenze (ml)	2000	2000	3000
Titr suspenze - spor/1ml	$1{,}82.10^{8}$	$2{,}06.10^{8}$	$1{,}96.10^{8}$
Celkem spor [5]	$3{,}64.10^{11}$	$4{,}12.10^{11}$	$5{,}88.10^{11}$
Spor/1g substrátu	$6{,}07.10^{8}$	$6{,}87.10^{8}$	$7{,}35.10^{8}$
Suspenze $1{,}0x10^{6}$ spor/1ml (l) [6]	364	412	588
Sporový koncentrát (ml) [7]	300	400	600
Titr koncentrátu (spor/1ml)	$1{,}12.10^{9}$	$9{,}82.10^{8}$	$9{,}24.10^{8}$
Celkem spor v koncentrátu	$3{,}36.10^{11}$	$3{,}93.10^{11}$	$5{,}54.10^{11}$
Suspenze $1{,}0x10^{6}$ spor/1ml (l)	336	393	554
Výtěžnost koncentrátu (%) [8]	92,39	95,34	94,30

5.5. Persistence entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* po záměrné introdukci do půdy na pokusné lokalitě Žabčice u Brna

Cílem modelové studie bylo prokázat schopnost entomopatogenní houby *B. bassiana* po její záměrné introdukci do půdy vytrvat za přirozených polních podmínek na pokusné polní parcelce MZLU v Žabčicích u Brna alespoň po dobu vegetační sezóny.

Za tímto účelem byl na pokusné lokalitě realizován vstupní monitoring přirozeného výskytu entomopatogenních hub se zaměřením na izolaci místních kmenů druhu *B. bassiana*, které byly následně porovnávány s introdukovaným (nepůvodním) kmenem M062 (*B. bassiana*) a re-izolovanými kmeny entomopatogenní houby *B. bassiana* z prvního a druhého monitoringu pomocí morfologických a genetických markerů.

5.5.1. Vstupní monitoring entomopatogenních hub na pokusné lokalitě Žabčice u Brna realizovaný před aplikací kmene M062 (*B. bassiana*)

Vstupní monitoring entomopatogenních hub byl uskutečněn v polovině srpna a jeho cílem bylo stanovit druhovou diverzitu entomopatogenních hub na pokusné lokalitě se zaměřením druhu *B. bassiana*.

Analýzou půdních vzorků byla prokázána přítomnost entomopatogenních hub na všech pokusných parcelkách (Tabulka 5.51). Nejfrekventovanějším druhem, byla entomopatogenní houba *M. anisopliae*, která byla izolována jak pomocí GBM na 7 z 8 parcelek (7/8), tak pomocí SM a.i. dodine na všech pokusných parcelkách (8/8). Entomopatogenní houba *P. lilacinus* byla detekována pouze pomocí SM a.i. dodine (8/8) oproti kmenům houby *B. bassiana*, které byly izolovány pouze pomocí GBM (5/8). Nejnižší přítomnost (1/8) byla zaznamenána u druhu *P. fumosoroseus*.

Monitoring entomopatogenních hub na pokusné lokalitě MZLU v Žabčicích u Brna prokázal vysokou druhovou diverzitu a přítomnost druhu *B. bassiana* byla zaznamenána na celé zkoumané lokalitě s výjimkou parcelky (Ao3-II).

Tabulka 5.52: Výskyt entomopatogenních hub na pokusné lokalitě Žabčice u Brna před záměrnou aplikací kmene M062 (*B. bassiana*)

Číslo vzorku	Parcela	Druh odizolované houby podle detekční metody			
		***Galleria* bait method**		**SM a.i. dodine**	
1.	Ao3-I	*M. anisopliae*	(M505)	*M. anisopliae* *P. lilacinus*	(M533)
2.	Ao3-II	–		*M. anisopliae* *P. lilacinus*	(M534)
3.	Ao3-I	*M. anisopliae* *B. bassiana* *P. fumosoroseus*	(M506) (M507) (M508)	*M. anisopliae* *P. lilacinus*	(M535)
4.	Ao3-II	*M. anisopliae* *B. bassiana*	(M509) (M510)	*M. anisopliae* *P. lilacinus*	(M536)
5.	Ao4-I	*M. anisopliae* *B. bassiana*	(M511) (M512)	*M. anisopliae* *P. lilacinus*	(M538)
6.	Ao4-II	*M. anisopliae* *B. bassiana*	(M513) (M514)	*M. anisopliae* *P. lilacinus*	(M539)
7.	Ao4-I	*M. anisopliae*	(M515)	*M. anisopliae* *P. lilacinus*	(M540)
8.	Ao4-II	*M. anisopliae* *B. bassiana*	(M516) (M517)	*M. anisopliae* *P. lilacinus*	(M541)

5.5.2: První monitoring entomopatogenních hub na pokusné lokalitě MZLU v Žabčicích u Brna, 7 týdnů od cílené introdukce kmene M062 (*B. bassiana*)

Monitoringem byla na pokusné lokalitě v Žabčicích u Brna zjištěna dominantní přítomnost druhu *B. bassiana* a potvrzena vysoká druhová diverzita ostatních entomopatogenních hub (Tabulka 5.52)

Přítomnost entomopatogenní houby *B. bassiana* byla detekována pomocí GBM na 8 z 8 parcelek (8/8) a pomocí SM a.i. dodine na 7 z 8 parcelek (7/8). Druhým, nejfrekventovanějším druhem byla entomopatogenní houba *M. anisopliae* GBM (5/8) a SM a.i. dodine (8/8). Oproti vstupnímu monitoringu byla četnost výskytu pomocí SM a.i. dodine stanovena u druhu *P. lilacinus* (7/8) stejná, ale nebyla zde zaznamenána přítomnost druhu *P. fumosoroseus* na rozdíl od druhu *P. carneus* (3/8).

Úspěšnost záměrné introdukce entomopatogenní houby *B. bassiana* do půdy byla potvrzena analýzou půdních vzorků. Svědčí o tom např. množství infikovaných larev (3 – 8 infikovaných larev/ Petriho misku se vzorkem půdy) při detekci pomocí GBM, nebo např. počet 30 monosporových izolátů houby *B. bassiana* na jednu Petriho misku s SM a.i. dodine ve vzorku č. 7 (Ao4-I), čemuž odpovídá koncentrace $3{,}0.10^3$ CFU/1 ml půdy.

Tabulka 5.53: Výskyt entomopatogenních hub na pokusné lokalitě Žabčice u Brna po záměrné aplikaci kmene M062 (*B. bassiana*) – první odběr od aplikace kmene

Číslo vzorku	Parcela	Druh odizolované houby podle detekční metody			
		***Galleria* bait method**		**SM a.i. dodine**	
1.	Ao3-I	*M. anisopliae* *B. bassiana*	(M518)	*M. anisopliae* *B. bassiana* *P. carneus* *P. lilacinus*	(M542) (M561) (M577)
2.	Ao3-II	*M. anisopliae* *B. bassiana*	(M520) (M519)	*M. anisopliae* *B. bassiana* *P. carneus* *P. lilacinus*	(M543) (M562) (M578)
3.	Ao3-I	*B. bassiana*	(M521)	*M. anisopliae* *B. bassiana* *P. lilacinus*	(M544) (M563)
4.	Ao3-II	*B. bassiana*	(M522 – M525)	*M. anisopliae* *B. bassiana* *P. carneus* *P. lilacinus*	(M545) (M564 – M568) (M 579)
5.	Ao4-I	*M. anisopliae* *B. bassiana*	(M527) (M526)	*M. anisopliae* *P. lilacinus*	(M546 – M550, M552)
6.	Ao4-II	*M. anisopliae* *B. bassiana*	(M529) (M528)	*M. anisopliae* *B. bassiana* *P. lilacinus*	(M553 – M558) (M569)
7.	Ao4-I	*B. bassiana*	(M530)	*M. anisopliae* *B. bassiana* *P. lilacinus*	(M559) (M570 – M575)
8.	Ao4-II	*M. anisopliae* *B. bassiana*	(M531) (M532)	*M. anisopliae* *B. bassiana* *P. lilacinus*	(M560) (M576)

5.5.3. Hodnocení morfologické variability mezi introdukovaným kmenem M062, původními a re-izolovanými kmeny entomopatogenní houby *B. bassiana*

Cílem této studie bylo vizuálně a statisticky vyhodnotit variabilitu mezi kmeny (*B. bassiana*), které byly izolovány před (kapitola 5.5.1) a po aplikaci (kapitola 5.5.2) nepůvodního kmene M062 (*B. bassiana*) pomocí morfologického hodnocení středových kultur kmenů.

Morfologické charakteristiky kmenů, které byly izolovány pomocí GBM po aplikaci entomopatogenní houby *B. bassiana* (kmen M062), byly analyzovány jednofaktorovou analýzou rozptylu (Tabulka 5.55) a statisticky významný rozdíl byl stanoven pomocí Tukey HSD testu (Tabulka 5.56) spolu s grafickým vyjádřením (Graf 5.25). Stejně tomu bylo i u kmenů re-izolovaných pomocí SM a.i. dodine po cílené aplikaci kmene M062 (Tabulka 5.57 – 5.58) a (Graf 5.26). Ze souhrnných výsledků statistické analýzy průměrné velikosti středových kultur všech kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* (Tabulka 5.53 – 5.54 a Graf 5.24) byla zaznamenána nejmenší statistická odlišnost u re-izolovaných kmenů M574, M519, M532, M565, M526 a introdukovaného kmene M062, u kterého byla velikost středové kultury 42,95 mm. Významná odlišnost oproti vnesenému kmenu (M062) byla zaznamenána u všech původních kmenů – kmen M512, M517, M514, M510 a referenčního kmene BBA01 s průměrným radiálním růstem v rozpětí od 33,90 mm (BBA01) do 39,40 mm (M510). Vizuálním hodnocením morfologické struktury kultur kmenů byla potvrzena významná podobnost mezi aplikovaným a re-izolovanými kmeny, které byly ve středu kultury „kuželovitě" zašpičatělé a v poslední třetině kruhovitého obvodu paprskovitě členěné oproti různým morfologickým strukturám přirozeně se vyskytujícím kmenům na lokalitě Žabčice u Brna (Grafický list 9 a 10).

Na základě morfologického porovnání kultur re-izolovaných kmenů (*B. bassiana*) s aplikovaným kmenem (M062) nebylo možné jednoznačně potvrdit vytrvání aplikovaného kmene na lokalitě, ale morfologické charakteristiky naznačovaly u některých kmenů určitou podobnost s introdukovaným.

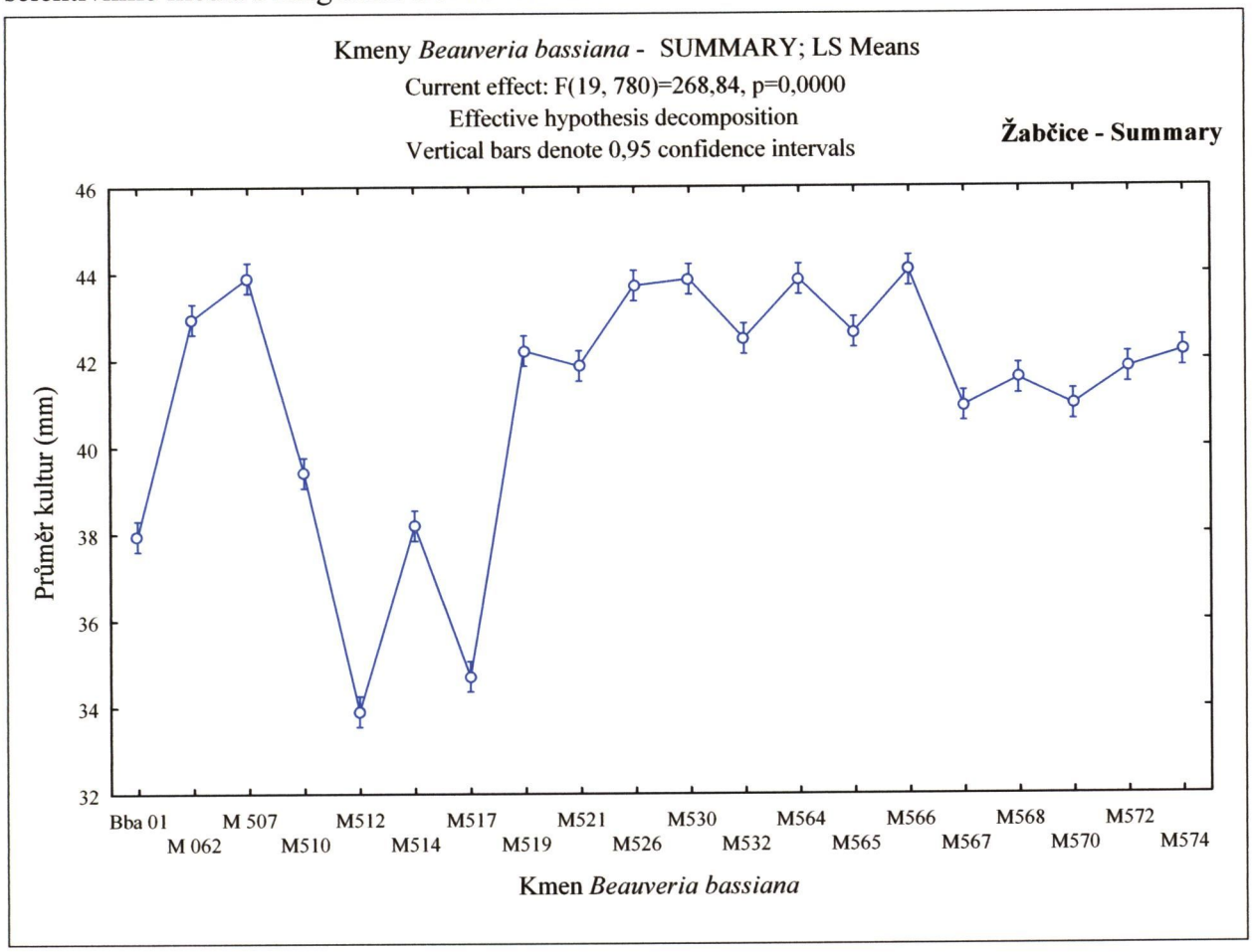
Tabulka 5.54: Statistické hodnocení pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu - morfologická charakteristika kmenů *B. bassiana* získaných před$^{(0)}$ introdukcí a po$^{(I)}$ introdukci kmene M062

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	1354576	1	1354576	1055645	0,00
Kmen *Beauveria bassiana*	6554	19	345	269	0,00
Error	1001	780	1	-	-

Tabulka 5.55: Morfologická charakteristika kmenů *B. bassiana* získaných před$^{(0)}$ introdukcí a po$^{(I)}$ introdukci kmene M062 (označení kmene doplněno o způsob izolace – pomocí GBM nebo SM a.i. dodine) (Tukey HSD test – statisticky významné rozdíly při $p< 0,05$)

P.č.	Kmen *Beauveria bassiana*	Průměr kultur (mm)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
5	M512 $^{(0)}$ GBM	33,90	****								
7	M517 $^{(0)}$ GBM	34,70	****								
1	Bba01 referenční	37,95		****							
6	M514 $^{(0)}$ GBM	38,18		****							
4	M510 $^{(0)}$ GBM	39,40			****						
16	M567 $^{(I)}$ SM a.i. dodine	40,93				****					
18	M570 $^{(I)}$ SM a.i. dodine	40,95				****					
17	M568 $^{(I)}$ SM a.i. dodine	41,55				****	****				
19	M572 $^{(I)}$ SM a.i. dodine	41,80				****	****	****			
9	M521 $^{(I)}$ GBM	41,85					****	****			
20	M574 $^{(I)}$ SM a.i. dodine	42,18					****	****	****		
8	M519 $^{(I)}$ GBM	42,20					****	****	****		
12	M532 $^{(I)}$ GBM	42,48						****	****		
14	M565 $^{(I)}$ SM a.i. dodine	42,63						****	****		
2	M062 introdukovaný	42,95							****	****	
10	M526 $^{(I)}$ GBM	43,70								****	****
13	M564 $^{(I)}$ SM a.i. dodine	43,85									****
11	M530 $^{(I)}$ GBM	43,85									****
3	M507 $^{(0)}$ GBM	43,90									****
15	M566 $^{(I)}$ SM a.i. dodine	44,05									****

Graf 5.24: Statistická analýza – morfologická charakteristika kmenů *B. bassiana* získaných po aplikaci kmene M062 re-izolací pomocí larev zavíječe voskového (*G. mellonella*) a selektivního média s fungicidní složkou dodine



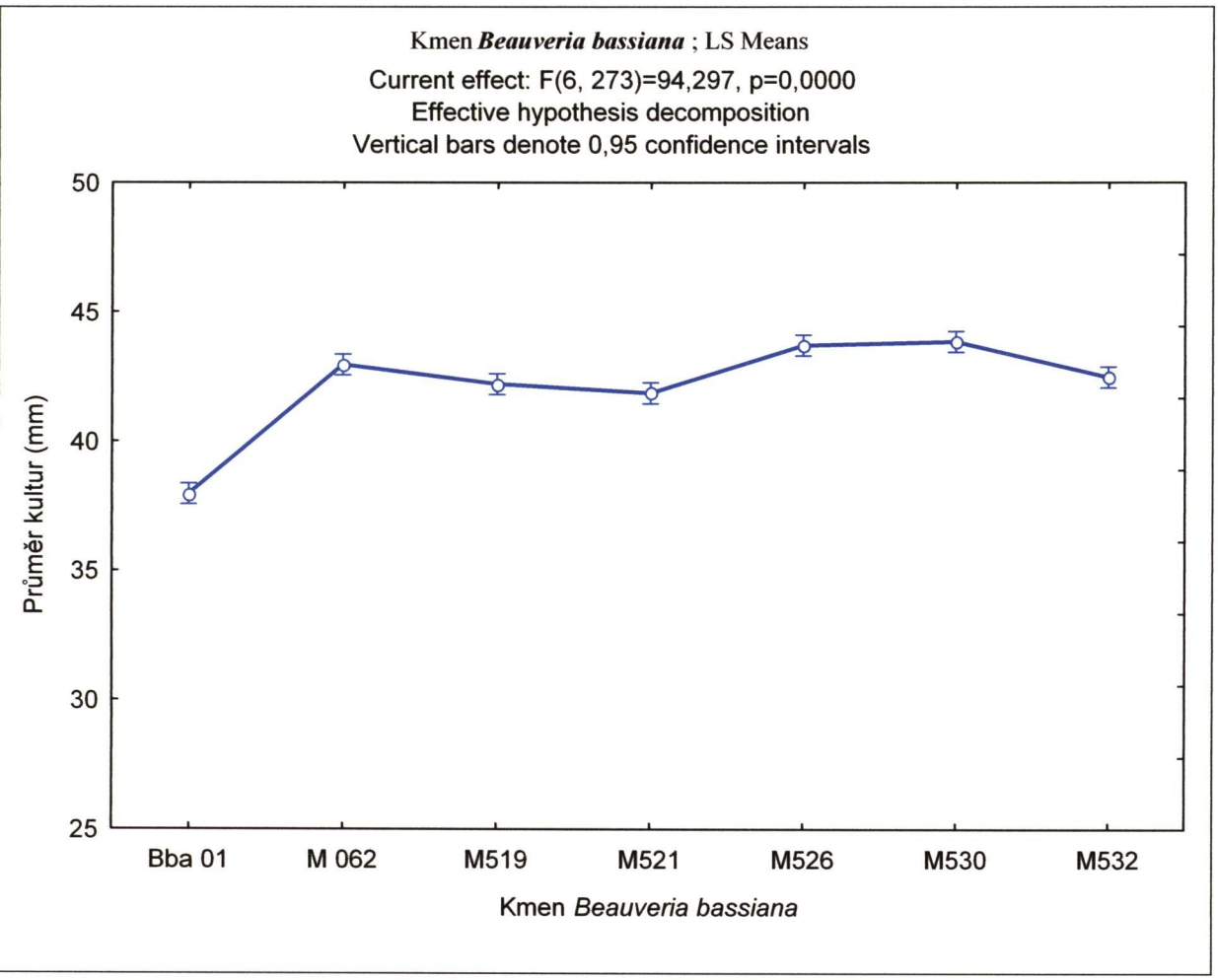
Tabulka 5.56: Statistické hodnocení pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu – morfologická charakteristika kmenů *B. bassiana* získaných po aplikaci kmene M062 re-izolací pomocí larev zavíječe voskového (*G. mellonella*)

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	1068166	1	1068166	824485,2	0,00
Kmen Beauveria bassiana	1356	14	97	74,7	0,00
Error	758	585	1	-	-

Tabulka 5.57: Morfologická charakteristika kmenů *B. bassiana* získaných po aplikaci kmene M062 re-izolací pomocí larev zavíječe voskového (*G. mellonella*) (Tukey HSD test – statisticky významné rozdíly při p< 0,05)

Kmen *B. bassiana*	Průměr kultur (mm)	1	2	3	4	5
Bba 01	37,95	****				
M521	41,85		****			
M519	42,20		****	****		
M532	42,48		****	****		
M 062	42,95			****	****	
M526	43,70				****	****
M530	43,85					****

Graf 5.25: Morfologická charakteristika kmenů *B. bassiana* získaných po aplikaci kmene M062 re-izolací pomocí larev zavíječe voskového (*G. mellonella*)



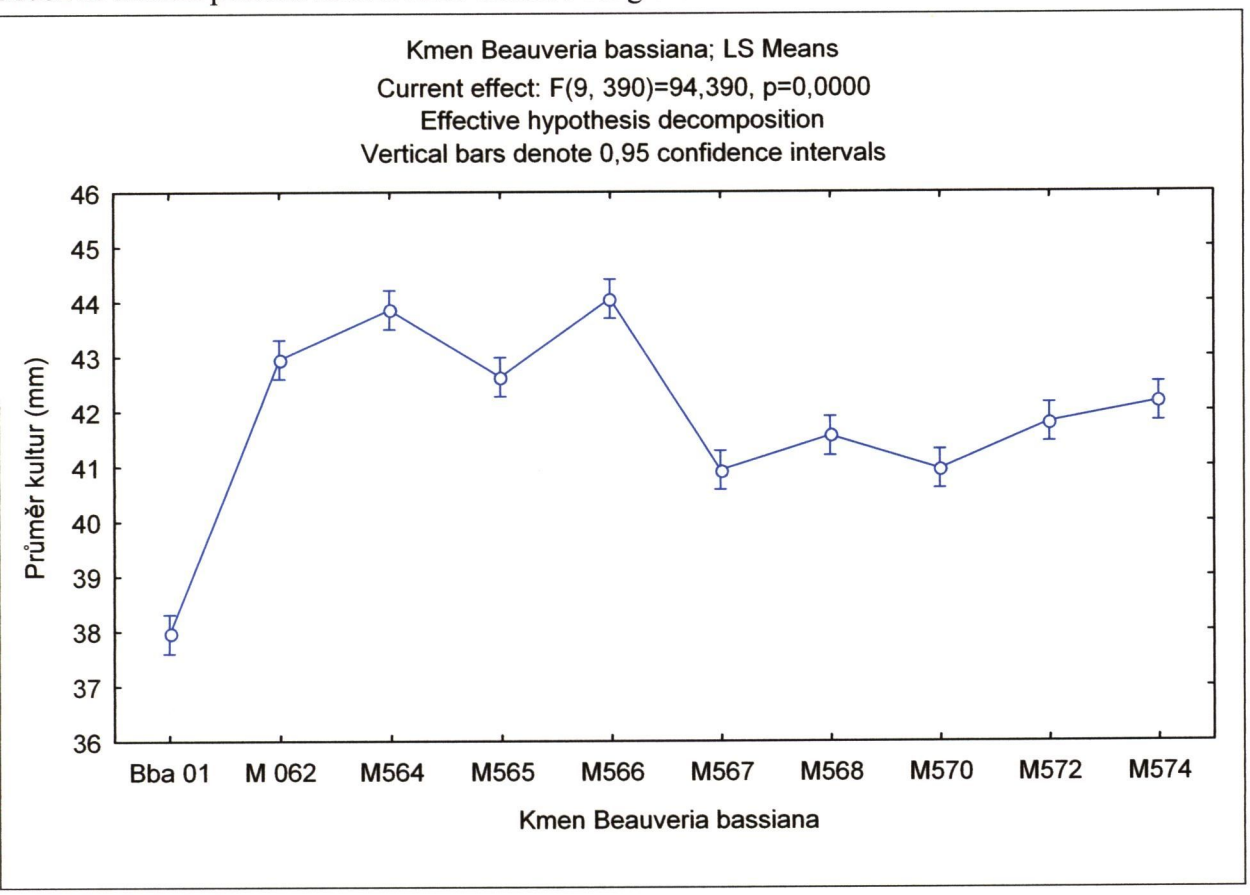
Tabulka 5.58: Statistické hodnocení pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu – morfologická charakteristika kmenů *B. bassiana* získaných po aplikaci kmene M062 re-izolací pomocí selektivního média s fungicidní složkou dodine

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	701657,5	1	701657,5	537695,0	0,00
Kmen *Beauveria bassiana*	1108,6	9	123,2	94,4	0,00
Error	508,9	390	1,3	-	-

Tabulka 5.59: Morfologická charakteristika kmenů *B. bassiana* získaných po aplikaci kmene M062 re-izolací pomocí selektivního média s fungicidní složkou dodine (Tukey HSD test – statisticky významné rozdíly při $p < 0,05$)

	Kmen *Beauveria bassiana*	Průměr kultur (mm)	1	2	3	4	5
1	Bba01	37,95	****				
6	M567	40,93		****			
8	M570	40,95		****			
7	M568	41,55		****	****		
9	M572	41,80			****		
10	M574	42,18			****	****	
4	M565	42,63				****	
2	M 062	42,95				****	
3	M564	43,85					****
5	M566	44,05					****

Graf 5.26: Morfologická charakteristika kmenů *B. bassiana* získaných po aplikaci kmene M062 re-izolací pomocí selektivního média s fungicidní složkou dodine



5.5.4. Hodnocení variability mezi původními a re-izolovanými kmeny entomopatogenní houby *B. bassiana* pomocí molekulárně genetické RAPD analýzy

V této studii bylo hodnoceno 14 re-izolovaných kmenů (*B. bassiana*) z prvého monitoringu (kapitola 5.5.2) 7 týdnů po záměrné introdukci kmene M062 na pokusné lokalitě v Žabčicích u Brna s cílem stanovit variabilitu mezi introdukovaným, re-izolovanými a původními kmeny v návaznosti na předcházející studii (5.5.3).

Na základě spektra rapidových fingerprintů získaných použitím třech vybraných primerů (OPERON TECHNOLOGY,CA: 1. OPB-01, 5′ GTTTCGCTCC 3′; 2. OPF-02, 5′ GAGGATCCCT 3′; 3. OPF-11, 5′ TTGGTACCCC 3′) byla stanovena nejvyšší míra podobnosti mezi aplikovaným kmenem M062 (poř. č. 7) a všemi re-izolovanými kmeny (č. 8 – 21). Ve studii byly použity pouze tři primery, které ale poskytovaly dostatečný polymorfismus pro odlišení původních kmenů (č. 2 – 5) od kmenů vykazujících nejvyšší míru podobnosti s introdukovaným kmenem (Obrázek 5.8).

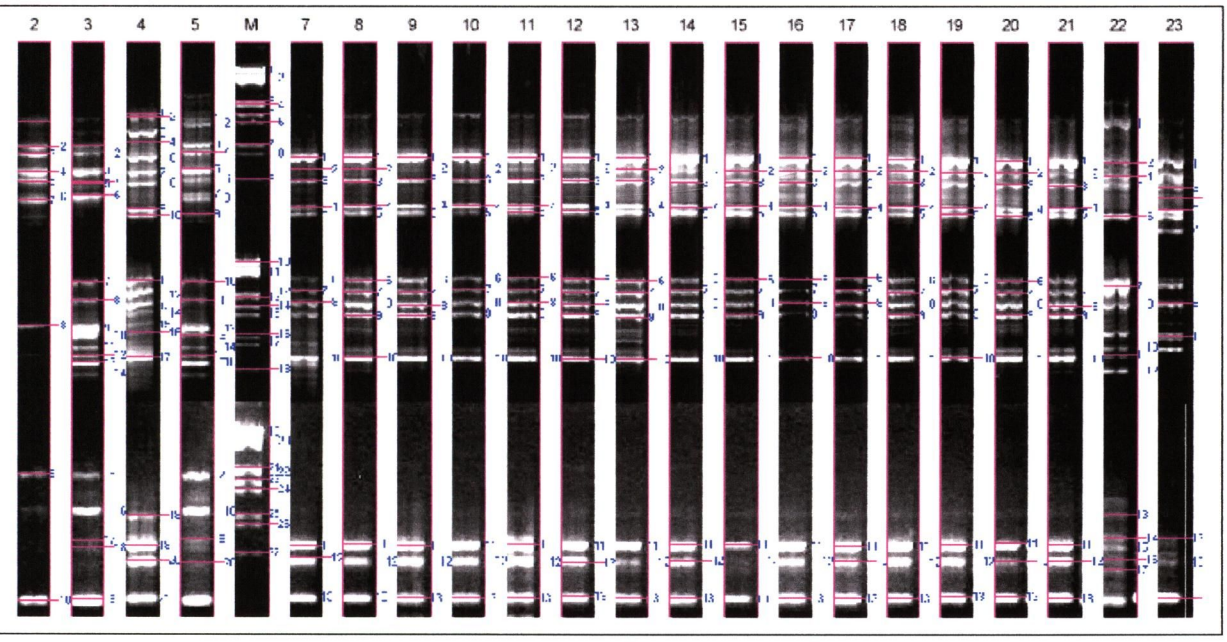
Původní (místní) kmeny druhu *B. bassiana* (M510, M512, M514, M517) izolované před vlastní aplikací se významně odlišovaly od introdukovaného kmene M062 s nebližší mírou podobnosti k tomuto kmeni na úrovni 72 % u kmene M514 (poř. č. 4). Samostatnou skupinu nativních kmenů tvořila dvojice kmenů M512 (poř. č. 3) a M517 (poř. č. 5) se vzájemnou mírou podobnosti na úrovni 87 % a kmen M510 (poř. č. 2), který byl k této skupině přidružen s 20 % odlišností. Referenční americké kmeny BBA01 (poř. č. 22) a BBA02 (poř. č. 23) vykazovaly vzájemnou podobnost na úrovni 70 %. Odlišnost těchto nepůvodních, amerických kmenů k aplikovanému kmeni byla na úrovni 40 %. Z výsledků RAPD analýzy nevyplývá žádná souvislost mezi genetickou variabilitou a způsobem izolace kmenů.

Rapidová analýza se ukázala být využitelnou i při tak malém počtu dobře zvolených primerů, které potvrdily persistenci kmene M062 (*B. bassiana*) v podobě re-izolovaných kmenů (poř. č. 8 – 21) na pokusné polní parcelce MZLU v Žabčicích u Brna po sedmi týdnech od aplikace. Vytrvání kmene dokazuje i vhodnost použité formulace entomopatogenní houby *B. bassiana* a použitelnost aplikační techniky v následujících studiích.

Tabulka 5.60: Pořadí kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* zahrnutých do RAPD analýzy

Poř. č.	Označení kmene	Způsob izolace	Číslo vzorku / Označení parcelky	Původ kmenů
2	M510	GBM	4 (Ao3-II)	Místní kmeny
3	M512	GBM	5 (Ao4-I)	
4	M514	GBM	6 (Ao4-II)	
5	M517	GBM	8 (Ao4-II)	
M	marker	–	–	–
7	M062	GBM	–	Aplikovaný kmen
8	M519	GBM	2 (Ao3-II)	Re-izolované kmeny z I. odběru
9	M521	GBM	3 (Ao3-I)	
10	M525	GBM	4 (Ao3-II)	
11	M564	SM a.i. dodine	4 (Ao3-II)	
12	M565	SM a.i. dodine	4 (Ao3-II)	
13	M566	SM a.i. dodine	4 (Ao3-II)	
14	M567	SM a.i. dodine	4 (Ao3-II)	
15	M568	SM a.i. dodine	4 (Ao3-II)	
16	M526	GBM	5 (Ao4-I)	
17	M530	GBM	7 (Ao4-I)	
18	M570	SM a.i. dodine	7 (Ao4-I)	
19	M572	SM a.i. dodine	7 (Ao4-I)	
20	M574	SM a.i. dodine	7 (Ao4-I)	
21	M532	GBM	8 (Ao4-II)	
22	BBA01	–	–	Referenční - americké kmeny
23	BBA02	–	–	

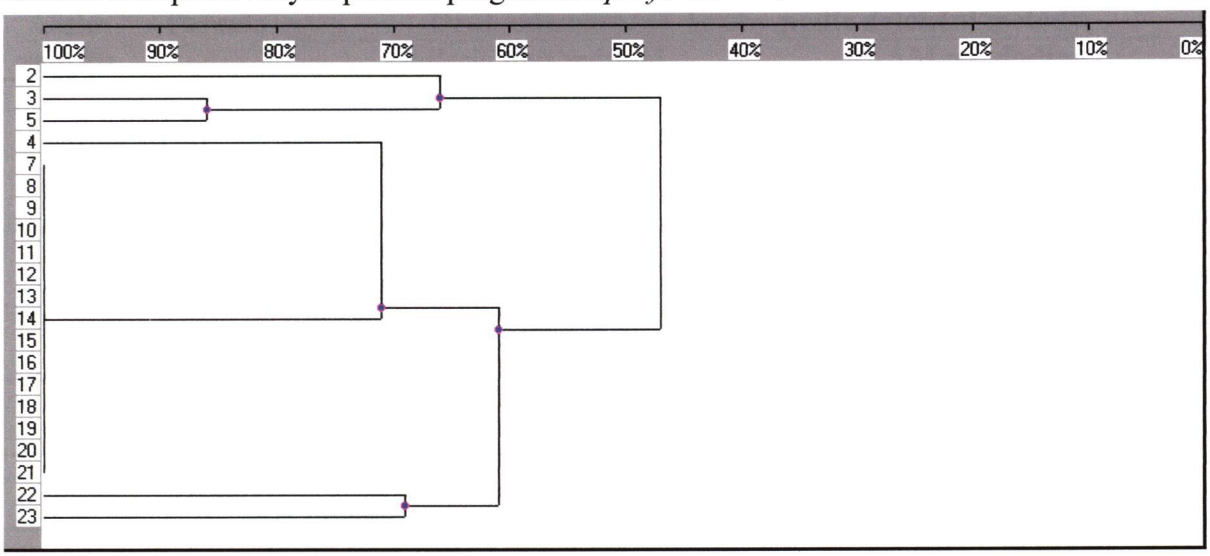
Obrázek 5.5: Ukázka získaného spektra pruhů pomocí RAPD analýzy u jednotlivých kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* a zpracované pomocí programu *Bioprofil* – nadefinování pruhů, na jehož základě byla vypočítána genetická vzdálenost (pozn. kopírováním došlo k poškození obrázku – chybějící barevné zvýraznění spekter pruhů)



Obrázek 5.6: Podobnostní matice pro jednotlivé kmeny entomopatogenní houby *B. bassiana* (koeficient podobnosti a genetické vzdálenosti Nei and Li)

	L2	L3	L4	L5	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21	L22	L23
L2	1.00																				
L3	0.67	1.00																			
L4	0.58	0.38	1.00																		
L5	0.67	0.87	0.62	1.00																	
L7	0.59	0.63	0.72	0.55	1.00																
L8	0.59	0.63	0.72	0.55	1.00	1.00															
L9	0.59	0.63	0.72	0.55	1.00	1.00	1.00														
L10	0.59	0.63	0.72	0.55	1.00	1.00	1.00	1.00													
L11	0.59	0.63	0.72	0.55	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00												
L12	0.59	0.63	0.72	0.55	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00											
L13	0.59	0.53	0.64	0.45	1.00	1.00	1.00	0.89	0.89	1.00	1.00										
L14	0.59	0.63	0.72	0.55	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00									
L15	0.59	0.53	0.72	0.55	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00								
L16	0.59	0.63	0.64	0.55	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.89	1.00	1.00	1.00							
L17	0.59	0.63	0.72	0.55	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00						
L18	0.47	0.53	0.72	0.55	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00					
L19	0.35	0.53	0.72	0.55	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.89	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00				
L20	0.35	0.53	0.72	0.55	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00			
L21	0.47	0.53	0.72	0.55	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00		
L22	0.47	0.42	0.64	0.64	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	1.00	
L23	0.42	0.67	0.59	0.67	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.70	0.70	0.70	0.70	1.00

Obrázek 5.7: Porovnání kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana.* Dendogram získaný na základě dat zpracovaných pomocí programu *Biprofil 1D ++*.



5.5.5. Druhý monitoring entomopatogenních hub na pokusné lokalitě MZLU v Žabčicích u Brna, 8 měsíců od cílené introdukce kmene M062 (*B. bassiana*)

V pořadí druhý odběr půdních vzorků od aplikace entomopatogenní houby *B. bassiana* měl za cíl izolovat dostatečné množství kmenů druhu *B. bassiana* pro následné ověření vytrvání introdukovaného kmene M062 (*B. bassiana*) v půdě.

Druhým monitoringem entomopatogenních hub na pokusné lokalitě Žabčice u Brna nebyla potvrzena taková druhová pestrost jako v předchozích dvou odběrech. Dominantním druhem zde byla entomopatogenní houba *B. bassiana* a houba *M. anisopliae* byla selektována pouze pomocí „živých pastí" (na 8 parcelkách z 8) (Tabulka 5.60).

Zvýšená přítomnost druhu *B. bassiana* na všech pokusných parcelkách, která byla zaznamenána jak pomocí GBM (6/8), tak pomocí SM a.i. dodine (8/8) byla zřejmým důsledkem vytrvání aplikovaného kmene v půdě přes celé zimní období.

Tabulka 5.61: Výskyt entomopatogenních hub na pokusné lokalitě Žabčice u Brna po záměrné aplikaci kmene M062 (*B. bassiana*) – druhý odběr od aplikace kmene

Číslo vzorku	**Parcela**	**Druh odizolované houby podle detekční metody**			
		***Galleria* bait method**		**SM a.i. dodine**	
1.	Ao3-I	*M. anisopliae* *B. bassiana*	(MOR1A, MOR1B)	*B. bassiana*	(MOR1-dod.)
2.	Ao3-II	*M. anisopliae*		*B. bassiana*	(MOR2-dod.)
3.	Ao3-I	*M. anisopliae* *B. bassiana*	(MOR3A, MOR3B)	*B. bassiana*	(MOR3-dod.)
4.	Ao3-II	*M. anisopliae* *B. bassiana*	(MOR4B)	*B. bassiana*	(MOR4-dod.)
5.	Ao4-I	*M. anisopliae* *B. bassiana*	(MOR5A)	*B. bassiana*	(MOR5-dod.)
6.	Ao4-II	*M. anisopliae* *B. bassiana*	(MOR6A, MOR6B)	*B. bassiana*	(MOR6-dod.)
7.	Ao4-I	*M. anisopliae* *B. bassiana*	(MOR7A)	*B. bassiana*	(MOR7-dod.)
8.	Ao4-II	*M. anisopliae*		*B. bassiana*	(MOR8-dod.)

5.5.6. Hodnocení variability mezi původními a re-izolovanými kmeny entomopatogenní houby *B. bassiana* pomocí molekulárně genetické RAPD analýzy

Cílem této genetické studie bylo stanovit genetickou variabilitu mezi aplikovaným kmenem, přirozeně se vyskytujícími a re-izolovanými kmeny z druhého monitoringu (kapitola 5.5.5) pomocí vybrané sady primerů (Tabulka 5.61).

Rapidová analýza kmenů vykazovala významně vyšší variabilitu mezi re-izolovanými kmeny (*B. bassiana*) z lokality Žabčice u Brna než tomu bylo v předchozí genetické analýze (kapitola 5.5.5).

Hodnocením kmenů pomocí „shlukové analýzy" (Obrázek 5.9) byly re-izolované kmeny spolu s původními a referenčními kmeny druhu *B. bassiana* rozděleny do dvou velkých bloků. První velký blok byl tvořen aplikovaným kmenem M062 (poř. č 2) spolu s některými kmeny z druhého odběru, které byly klastrovány podle jejich vzájemné podobnosti do menších skupin. Vzájemná podobnost těchto skupin kmenů byla na úrovni 98 %. Mezi kmeny z prvého bloku označené poř. č. 5, 9, 6, 7, 8, 10 (re-izolované kmeny z II. odběru) a aplikovaným kmenem M062 (poř. č. 2) byla stanovena 90 % podobnost. Tato podobnost byla ještě větší u kmene MOR8-DOD (poř. č. 12) – 94 %, který tvořil s aplikovaným kmenem samostatnou skupinu. K tomuto bloku byl přidružen ještě kmen MOR7-GBM (poř. č. 11) a kmeny z prvého odběru – kmen M519 (poř. č. 3) a kmen M565 (poř. č. 4), které v předchozí analýze (kapitola 5.5.5) vykazovaly s aplikovaným kmenem jednoznačnou shodu. Z prvého bloku byl vyčleněn americký kmen BBA02 (poř. č. 20) a místní kmen M514 (poř. č. 23) izolovaný při vstupním monitoringu.

Zbývající kmeny *B. bassiana* byly zformovány v druhém bloku. Samostatnou velkou skupinu tvořily kmeny z druhého odběru označené poř. č. 13 – 18, se vzájemnou podobností 85 – 90 %. Odděleně od této skupiny byly kmeny reprezentující tři zástupce přirozeně se vyskytujících kmenů – kmen M510 (poř. č. 21), kmen M512 (poř. č. 22) a kmen M517 (poř. č. 24) a americký-referenční kmen BBA01 (poř. č. 19), který se nejvíce vyčleňoval z druhého bloku. Určitou podobnost, alespoň podle „rapidových fingerprintů", lze spatřovat mezi původními kmeny M510 (poř. č. 21) a M512 (poř. č. 22) se vzájemnou podobností na úrovni 85 % a skupinou kmenů z druhého bloku (poř. č. 13 – 18).

Závěrem by bylo možné říci, že podobnost re-izolovaných kmenů soustředěných v prvém bloku byla s aplikovaným kmenem M062 vysoká. Z toho bylo možné usuzovat na schopnost vneseného kmene koexistovat s přirozeně se vyskytujícími kmeny a udržet si životaschopnost za přirozených polních podmínek minimálně po dobu osmi měsíců od jeho aplikace do půdy. Dále vysoká podobnost re-izovaných kmenů s původním kmenem M510 (poř. č. 21) a kmenem M512 (poř. č. 22) v druhém bloku vede ke spekulacím, zda introdukcí kmene M062 (*B. bassiana*) nedošlo k podpoře některých přirozeně se vyskytujících kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana*.

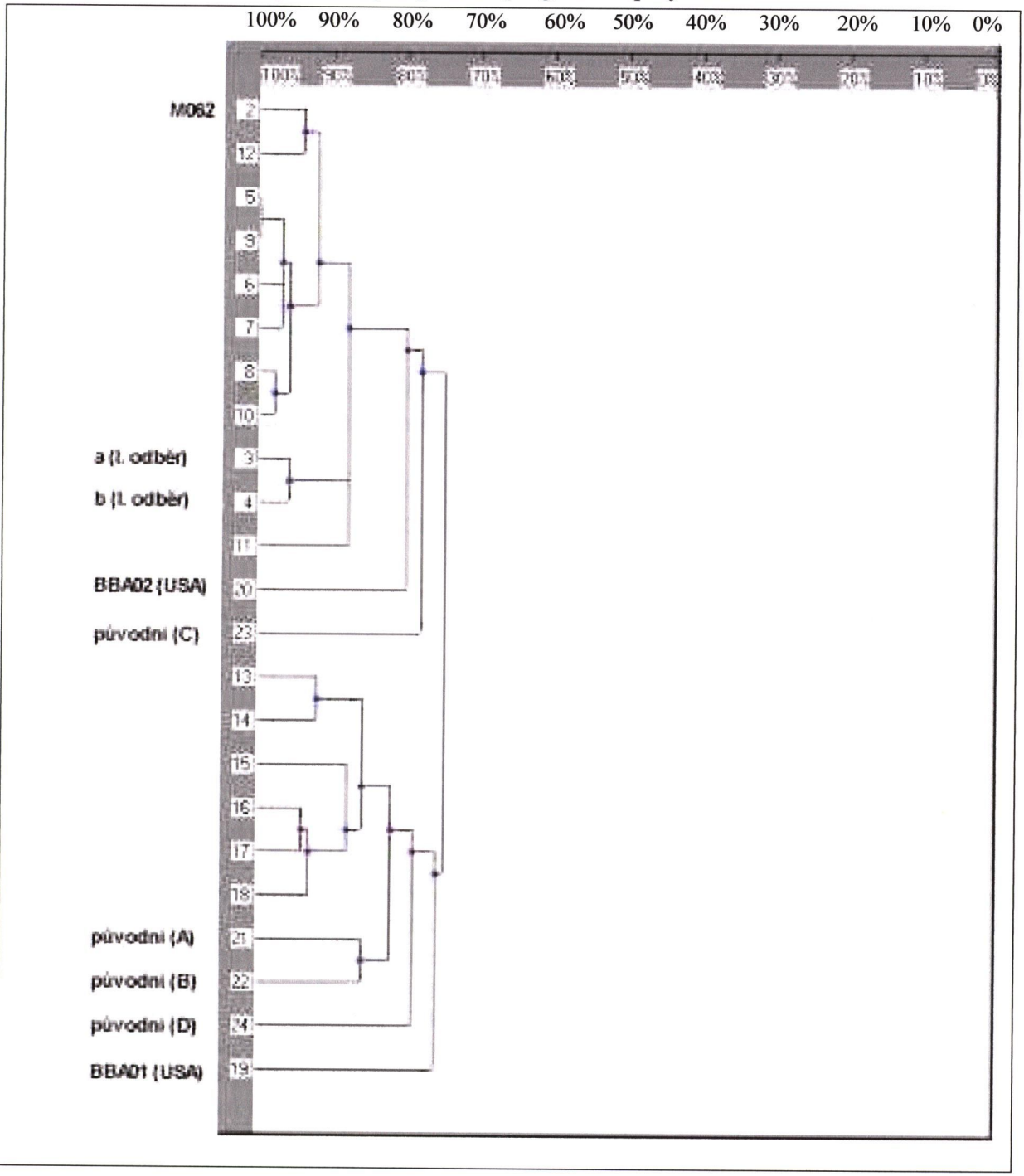
Tabulka 5.62: Použité primery (OPERON TECHNOLOGY, CA) v RAPD analýzách

Primer	Sekvence 5´ - 3´
OPF-01	ACGGATCCTG
OPF-02	GAGGATCCCT
OPF-03	CCTGATCACC
OPF-04	GGTGATCAGG
OPF-05	CCGAATTCCC
OPF-06	GGGAATTCGG
OPF-08	GGGATATCGG
OPF-10	GGAAGCTTGG
OPF-11	TTGGTACCCC
OPF-15	CCAGTACTCC
OPB-01	GTTTCGCTCC
OPB-04	GGACTGGAGT
OPB-07	GGTGACGCAG
OPB-15	GGAGGGTGTT
OPK-03	CCAGCTTAGG
OPK-08	GAACACTGGG

Tabulka 5.63: Pořadí kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* zahrnutých do RAPD analýzy

Poř. č.	Označení kmene	Způsob izolace	Číslo vzorku / Označení parcelky	Původ kmenů
2	M062	GBM	–	Aplikovaný kmen
3	M519	GBM	2 (Ao3-II)	Re-izolované kmeny z I. odběru
4	M565	SM a.i. dodine	4 (Ao3-II)	
5	MOR1-$_{GBM}$	GBM	1 (Ao3-I)	Re-izolované kmeny z II. odběru
6	MOR3-$_{GBM}$	GBM	3 (Ao3-I)	
7	MOR3-$_{DOD}$	SM a.i. dodine	3 (Ao3-I)	
8	MOR4-$_{GBM}$	GBM	4 (Ao3-II)	
9	MOR5 -$_{GBM}$	GBM	5 (Ao4-I)	
10	MOR6-$_{GBM}$	GBM	6 (Ao4-II)	
11	MOR7-$_{GBM}$	GBM	7 (Ao4-I)	
12	MOR8-$_{DOD}$	SM a.i. dodine	8 (Ao4-II)	
13	MOR1-$_{DOD}$	SM a.i. dodine	1 (Ao3-I)	
14	MOR2-$_{DOD}$	SM a.i. dodine	2 (Ao3-II)	
15	MOR4-$_{DOD}$	SM a.i. dodine	4 (Ao3-II)	
16	MOR5-$_{DOD}$	SM a.i. dodine	5 (Ao4-I)	
17	MOR6-$_{DOD}$	SM a.i. dodine	6 (Ao4-II)	
18	MOR7-$_{DOD}$	SM a.i. dodine	7 (Ao4-I)	
19	BBA01	–	–	Referenční – americké kmeny
20	BBA02	–	–	
21 (A)	M510	GBM	4 (Ao3-II)	Původní kmeny
22 (B)	M512	GBM	5 (Ao4-I)	
23 (C)	M514	GBM	6 (Ao4-II)	
24 (D)	M517	GBM	8 (Ao4-II)	

Obrázek 5.8: Porovnání sady kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana.* Dendogram získaný na základě dat zpracovaných pomocí programu *Biprofil 1D ++.*



6. DISKUZE

Pojetí „bio-intenzivní integrované ochrany rostlin" vytváří nový pohled na IOR (integrovaná ochrana rostlin – Integrated Pest Management). Důležitým rozdílem mezi konvenční a bio-intenzivní IOR je ten, že (bio)intenzivní IOR klade důraz na proaktivní opatření tak, aby přeměnou agroekosystému došlo k znevýhodnění škůdců a zvýhodnění komplexu patogen, parasit a predátor (Dufour 2001). Jednou z nejdůležitějších strategií patřící mezi proaktivní opatření je záměrná podpora přirozeně se vyskytujících prospěšných (organizmů), které jednoznačně vyhovují kritériu bio-intenzivní IOR (Landa et al. 2005).

Velmi málo je známo o četnosti a významu entomopatogenních hub v obhospodařované půdě a o jejich schopnosti kolonizovat půdní niku po jejich augmentativní introdukci (záměrem metod biologické ochrany je zvýšit množství nebo účinnost přirozeně se vyskytujících nepřátel) (Landa et al. 2005). Hlavním záměrem experimentální části proto bylo pomocí polyfaktoriálního hodnocení vybrat vhodný kmen izolovaný při monitoringu entomopatogenních hub v půdě a ověřit persistenci záměrně introdukovaného kmene do půdy s cílem stanovit možnost využití entomopatogenních hub v IOR.

6.1. Monitoring přirozeného výskytu vláknitých entomopatogenních hub (Deuteromycotina resp. Mitosporické houby, Hyphomycetes, Moniliales) v půdě

Entomopatogenní houby jsou často zaznamenány jako důležitá součást orné půdy. Zejména *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces lilacinus* a *P. fumosoroseus* jsou pravidelně detekovány v různých půdních nikách (Mietkiewski, Mietkiewska 1993, Bidochka et al. 1998, Landa et al. 2002). Znalost druhového složení místních kmenů entomopatogenních hub je nezbytná pokud vyhodnocujeme potenciál této skupiny přirozených nepřátel jakožto rezervoáru pro regulaci škůdců v určitém agroekosystému (Bidochka et al. 1998). Pro detekci entomopatogenních hub v půdě jsou použity různé metody. Zejména larvy zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) (Zimmermann 1986, Mietkiewski et al. 1997, Landa et al 2002) jsou běžně používané jako „živá návnada". Mimo to se pro detekci entomopatogenních hub v půdě používají různá selektivní umělá média (Goettel, Inglis 1997) včetně selektivního média a.i. dodine, které je vhodné pro stanovení přítomnosti *M. anisopliae* a *B. bassiana* (Chase et al. 1986; Pereira, Robets 1991). V současné době je velmi málo známo o přirozeném rozšíření entomopatogenních hub na území České republiky. Tato část experimentální části si proto kladla za cíl navázat na již dříve realizovaný velkoplošný monitoring entomopatogenních hub na území jihočeského regionu (Landa et al. 2002) a doplnit chybějící místa v síti lokalit odběru se zaměřením na lokality (orné pole) s porostem obiloviny. Součástí této kapitoly byl také monitoring na třech pokusných lokalitách (Smržice, Troubsko, Pěnčín) na území Moravy, který poskytl vstupní údaje o rozšíření entomopatogenních hub na pokusných parcelkách.

6.1.1. Metody použité při detekci a izolaci entomopatogenních hub z půdy

Keller et al. (2003) považují ***Galleria* bait method** (Zimmermann, 1986) za velmi citlivou metodu pro detekci entomopatogenních hub v půdních vzorcích. Pro úspěšnou detekci entomopatogenních hub je možné kromě larev zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) použít i jiné druhy hmyzu např. larvy *Tribolium destructor* (Coleoptera, Terebrionidae), *Acanthocinus aedilis* (Coleoptera, Cerambycidae) (Zimmermann 1986) nebo

Tenebrio molitor (Coleoptera, Terebrionidae) (Vänninen et al. 1989, Kleespies et al. 1989) a *Delia floralis* (Diptera, Anthomyiidae) (Klingen et al. 2002). Důvodem, proč v této i následujících studiích byly použity larvy zavíječe voskového (*G. mellonella*) bylo několik. Zavíječ voskový má relativně snadný kontinuální časově synchronizovaný chov, rychlý vývoj (36 – 46 dní) a poměrně velké málo pigmentované larvy. Velkou předností je snadné opatření potravy v kterékoliv roční době a schopnost vývoje larev za definovaných konstantních podmínek na umělém živném podkladě, tzv. „Haydakově půdě" (Skuhravý 1968). Kromě toho jsou larvy zavíječe voskového více citlivé k houbové infekci než běžný půdní hmyz, což Bedding a Akhurst (1975) vysvětlují tím, že půda je pro larvy zavíječe voskového nepřirozeným stresujícím prostředím (jiné životní podmínky, absence potravy), čímž se zvyšuje citlivost larev vůči entomopatogenním houbám. Z tohoto důvodu i nižší dávky houbového inokula v půdě mohou vyvolat houbovou infekci (Zimmermann 1986). Na druhou stranu některé larvy reagovaly na stresové podmínky půdy nadměrnou tvorbou vlákna a vyvářením „kokonu" nebo se přímo zakuklily. Meyling, Eilenberg (2006) rovněž používali larvy třetího až čtvrtého instaru (přibližně čtyři týdny po vylíhnutí), které ale před analýzou ponořily do vody o teplotě 56 °C po dobu 15 sekund, čímž byla minimalizována jejich schopnost vytvářet hedvábnou síť v půdě (Woodring a Kaya 1988). Jednou z nevýhod použití larev zavíječe voskového je, že metoda pastí (nástrah) může být méně citlivá pro izolaci entomopatogenních hub v porovnání s izolací entomoaptogenních háďátek v důsledku toho, že infekční propagule hub jsou nepohyblivé, a proto je infekce vnímavého hostitele (*G. mellonella*) závislá na pohybu larev v půdě, čímž se zvýší pravděpodobnost přichycení houbového inokula na povrch larvy, jak konstatují Chander et al. (1997). Mimoto infekce hostitele může být často maskována nebo inhibována infekcí hlístic (C.W. Barker a G.M. Barker 1998). Barbercheck a Kaya (1990) zjistili, že entomopatogenní nematoda byly schopny zabránit vstupu entomopatogenních hub do *G. mellonella* pokud byly aplikovány ve stejnou dobu. Z těchto důvodů bylo do pokusné jednotky, která se skládala z Petriho misky (90 ml) se 40 ml půdního vzorku vloženo minimálně 10 – 12 kusů larev (*G. mellonella*) a pro docílení zvýšeného pohybu larev v půdě, jak doporučují Klingen et al. (2002) a Meyling, Eilenberg (2006) byly pokusné jednotky pravidelně otáčeny o 180 °. Shodný objem analyzovaného vzorku a stejnou pokusnou jednotku použil také např. Klingen et al. (2002). Na druhou stranu Chandler et al. (1997) použili na 400 ml analyzovaného půdního vzorku pouze jednu larvu zavíječe voskového čtvrtého larválního instaru. Obdobně nízký počet larev zavíječe voskového použili Bidochka (1998) a Vänninenová (Vänninen 1995), kdy pro analýzu půdních vzorků zvolili 250 ml plastikové kontejnery, do kterých umístili pouze 3 larvy zavíječe voskového. Pokusné jednotky byly kontrolovány vždy 7., 10. a 14. den. Po této době byla analýza půdních vzorků ukončena, protože z předchozích zkušeností bylo zřejmé, že k infikování larev (*G. mellonella*) entomopatogenní houbou dochází během 14 dnů, což potvrzuje i Vänninenová (Vänninen 1995).

V současné době existuje celá řada **selektivních médií** určených pro izolaci entomopatogenních hub z půdy, ovšem každé z nich je doporučováno pro konkrétní druh entomopatogenní houby, např. Baath (1991) popsal selektivní médium na bázi mědi pro izolaci *B. bassiana* a *M. anisopliae*, Keller et al. (2003) modifikovali selektivní médium (Strasser et al. 1997) pro izolaci *B. brongniartii*, Beilharz et al. (1982) vyvinuli selektivní médium pro detekci *B. bassiana* podobně jako Shimazu, Salto (1996), Kerry et al. (1993) navrhnuli selektivní médium pro detekci hub z rodu *Paecilomyces* a *Verticillium*, Mitchell et al. (1987) pro izolaci houby *P. lilacinus*. Z toho je zřejmé, že v současné době není známé selektivní médium, které by umožňovalo izolaci co nejširšího spektra běžně se vyskytujících entomopatogenních hub v půdě a při tom účinně inhibovalo ostatní půdní druhy (např. *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp. apod.). Dalším důležitým aspektem, který je nutné zohlednit je bezpečnost použití selektivního média pro zdraví

člověka. Milner, Lutton (1976) uvádějí, že i přesto, že Veen's medium je jedním z nejvíce efektivních selektivních médií pro izolaci entomopatogenních hyphomycet, jehož princip je založen na vysoké dávce cycloheximidu, je použití metody živých pastí považováno za podstatně bezpečnější.

SM a.i. dodine, které se úspěšně používá pro izolaci houby *Beauveria bassiana* a *Metarhizium* spp. (Chase et al. 1986) bylo vhodným doplňkem ke *Galleria* bait method. Například při velkoplošném monitoringu v jihočeském regionu bylo 20 % kmenů entomopatogenních hub izolováno pouze pomocí tohoto média o koncentraci 50 μg fungicidní složky dodine/ 1 ml selektivního média. Ovšem Liu et al. (1993b) zjistili, že koncentrace 50 μg dodine na 1 ml média a vyšší zcela inhibovaly klíčivost všech testovaných kmenů *M. anisopliae*. Použité živné médium obsahovalo: 0,1 % kvasničný extrakt (Oxoid); 0,1 % dextrózu (Oxoid); 0,01 % chloramfenikol (Roussell) a 0,05 % Tween 80 (Sigma) (Milner et al. 1991). Toto tvrzení však vyvrátily výsledky z plošného (jihočeský region) i dílčích monitoringů (Morava), protože entomopatogenní houba *M. anisopliae* byla pomocí našeho SM a.i. dodine (50 μg) izolována jako dominantní druh spolu s houbou *P. lilacinus*, která je také známá jako nematofágní houba (Kiewnick, Sikora 2003). Naproti tomu Lingg, Donaldson (1981) použili 620 μg dodine na ml média, i když Chase et al. (1986) uvádějí, že 620 μg dodine na ml média významně snížilo re-izolaci houby *M. anisopliae*. Snížení koncentrace dodine na 550 μg dodine na ml média umožňovalo velmi dobře izolovat houbu *B. bassiana*, ale tato koncentrace byla stále vysoká pro izolaci houby *M. anisopliae*, kterou se podařilo úspěšně izolovat až při koncentraci 460 μg dodine na ml média. Z uvedených výsledků je zřejmé, že stupeň kompatibility s dodine se u jednotlivých druhů entomopatogenních hub liší a je velmi pravděpodobné, že tato odlišnost se bude projevovat i na úrovni jednotlivých kmenů. K podobným závěrům dospěl i Liu et al. (1993).

Jako daleko levnější a zároveň stejně účinné se jeví použití přípravku Syllit 65 WP (FUTURCHEM s.r.o.), kde je obsažena účinná látka dodine v 65 %. Tato dostupná alternativa k čisté látce dodine byla (mimo uvedené výsledky) testována se srovnatelným selektivním účinkem. Z tohoto důvodu bych Syllit 65 WP doporučil pro přípravu SM a.i. dodine.

6.1.2. Monitoring přirozeného výskytu vláknitých entomopatogenních hub v půdě na území jihočeského regionu a na třech pokusných lokalitách (Smržice, Troubsko, Pěnčín) na území Moravy

Monitoring entomopatogenních hub v jihočeském regionu a na třech pokusných lokalitách (Smržice, Troubsko, Pěnčín) na území Moravy naznačil, že entomopatogenní houby jsou běžnou součástí orné půdy na území České republiky. Toto tvrzení dokazuje 95,6 % přítomnost entomopatogenních hub ve 113 půdních vzorcích, které byly odebrány ze 65 lokalit s porostem obiloviny z celého jihočeského regionu a analyzovány pomocí obou izolačních metod – GBM a SM a.i. dodine. Přítomnost entomopatogenních hub byla prokázána i ve většině odebraných půdních vzorků (46 vzorků) při vstupním monitoringu na třech pokusných lokalitách na území Moravy. Bidochka et al. (1998) uskutečnili monitoring přirozeného výskyt entomopatogenních hub v oblasti mírného a na přechodu k severskému podnebí na území Ontaria (Kanada), kde pomocí GBM zjistili přítomnost entomopatogenních hub na 78 (91 %) z 86 lokalit a celkem zde bylo izolováno 357 kmenů (*M. anisopliae*), 187 kmenů (*B. bassiana*) a 13 kmenů náležejících do rodu *Paecilomyces*. Kleespies et al. (1989) prokázali výskyt entomopatogenních hub v okolí Darmstadtu (Německo) v 60 % půdních vzorků, které byly analyzovány pomocí GBM a nejfrekventovanějším druhem, zde byla entomopatogenní houba *M. anisopliae* s 42 % přítomností ve 100 půdních vzorcích. Ovšem nižší četnost výskytu entomopatogenních hub v různých půdách byla zjištěna ve Finsku, kde v 590 půdních vzorcích byla přítomnost entomopatogenních hub detekována pouze v 228

půdních vzorcích, což představuje 38,6 % (Vänninen 1995). Podobné výsledky zaznamenali Klingen et al. (2002) při monitoringu entomopatogenních hub pomocí metody živých pastí v Norsku, kde frekvence entomopatogenních hub dosahovala 30 % (200 půdních vzorků/ 60 izolátů hub). Tyto rozdílné výsledky naznačují, že výskyt entomopatogenních hub v půdě je ovlivněn biotickými a abiotickými faktory (Vänninen et al. 1989; Keller, Zimmermann 1998; Mietkiewski et al. 1994; Vänninen 1995; Chander et al. 1997), použitou metodou (druh hmyzu použitý jako živá návnada, teplota inkubace, hloubka odběru půdních vzorků) (Klingen et al. 2002) a jedná-li se o zemědělskou nebo nezemědělskou půdu (Vänninen 1996; Bidochka at al. 1998).

Druhové spektrum izolovaných entomopatogenních hub v jihočeském regionu a na území Moravy bylo poměrně pestré. V jihočeském regionu byl dominantním druhem entomopatogenní houba *P. lilacinus* se 104 izolovanými kmeny (v 92,2 % všech odebraných půdních vzorků respektive 52,8 % ze všech kmenů, které byly izolovány) a entomopatogenní houba *Metarhizium anisopliae* (67 kmenů, 67,8 %, resp. 34,0 %). Entmopatogenní houba *B. bassiana* byla izolována v počtu 16 kmenů (15,6 %, resp. 8,1 %). Nejnižší přítomnost v půdních vzorcích byla zaznamenána u entomopatogenní houby *P. carneus* (6 kmenů, 5,6 %, resp. 3,1 %) a *P. fumosoroseus* (4 kmeny, 3,8 %, resp. 2,0 %). Obdobné druhové zastoupení jako v jihočeském regionu bylo zjištěno v dílčích studiích např. na lokalitě Troubsko, kde bylo na 24 pokusných parcelkách pomocí GBM izolováno 15 kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae*, tj. 62,5 % z celkem izolovaných kmenů entomopatogenních hub z této lokality a 9 kmenů druhu *B. bassiana* (tj. 37,5 %). Naopak na lokalitě Smržov byla přítomnost entomopatogenních hub minimální, kde z pěti pokusných parcelek byl izolován pouze jeden kmen druh *P. fumosoroseus* pomocí GBM a jeden kmen houby *B. bassiana* pomocí SM a.i. dodine. Na všech parcelkách byla ale detekována přítomnost houby *P. lilacinus*. Mimo těchto druhů bylo v půdních vzorcích na lokalitě Pěnčín pomocí SM a.i. dodine izolováno několik kmenů rodu *Lecanicillium* spp.. Přítomnost vláknité houby *Lecanicillium* spp. v půdních vzorcích byla zřejmě způsobená odběrem půdních vzorků i s posklizňovými zbytky. Při monitoringu entomopatogenních hub ve Finsku bylo z 590 půdních vzorků odebraných v průběhu 5 let izolovány entomopatogenní houby z 228 půdních vzorků. Houba *B. bassiana* byla izolována z 19,8 % půdních vzorků, poté následoval druh *M. anisopliae* (15,6 %), *P. farinosus* (9,2 %) a *P. fumosoroseus* (1%) (Vänninen 1995). Kosmopolitní rozšíření těchto druhů potvrzuje např. izolace entomopatogenní houby *B. bassiana* a *M. anisopliae* na území tropické Jižní Ameriky (Tigano-Milani et al. 1995), Asie, Afriky (Humber 1992), za polárním kruhem ve Finsku (Vänninen 1995), Kanadě (Widden, Parkinson 1979; Bidochka et al. 1998), Rusku (Arkhipova 1965; Ogarkova, Ogarkov 1986), na území Palestiny (Ali-Shtayed et al. 2002), Austrálii, Japonsku (Roddam, Rath 1997); Tasmanii (Rath at al. 1992) a také na Antarktidě (A. Rath, ústní sdělení podle Bidochka et al. 1998).

V průběhu monitoringu v jihočeském regionu se obě izolační metody ukázaly být obdobně vnímavé k druhu *M. anisopliae*, který byl pomocí GBM detekován v 50,6 % a SM a.i. dodine ve 48,2 % půdních vzorků. K obdobnému zjištění dospěli Keller et al. (2003), kteří porovnávali obě metody na půdních vzorcích z 55 míst Švýcarska. Pomocí GBM zjistili přítomnost *M. anisopliae* v 61,3 % půdních vzorků a tato metoda se jevila jako více citlivější v porovnání s izolací na selektivním médiu, které mělo za výsledek 53,2 % positivních půdních vzorků. Nicméně rozdíl nebyl významný (párový t-test, $p = 0,119$, $df = 54$). V případě druhu *B. bassiana* a *P. fumosoroseus* byla jejich přítomnost v půdních vzorcích odebraných z jihočeského regionu daleko nižší než u druhu *M. anisopliae* a GBM se u těchto dvou druhů ukázala být citlivější metodou než SM a.i. dodine. Entomopatogenní houbu *B. bassiana* byla pomocí živé návnady zachycena ve 13,2 % půdních vzorků a *P. fumosoroseus* ve 3,4 % půdních vzorků oproti izolaci *B. bassiana* (4,4 %) a *P. fumosoroseus* (0,4 %) pomocí SM a.i. dodine. Nízkou přítomnost entomopatogenní houby

ivých konidií byl v polyfaktoriálním hodnocení zjištěn u entomopatogenní houby *assiana* u kmenů izolovaných v jihočeském regionu – kmen M185 (GI 2,00 a 100 % ivost) a kmen M062 (GI 1,87 a 99 % klíčivost) a u kmenů izolovaných na lokalitě ubsko – M403 (GI 1,69 a 94 % klíčivost). Je nutné poznamenat, že rychlost klíčení resp. oje konidií je důležitá vlastnost, protože konidie jsou vystaveny vysušení, antibióze, bici kutikulárními lipidy nebo jsou odstraněni svlékáním kutikuly hmyzu ještě než dojde klíčení nebo penetraci kutikuly (Fuxa 1987).

Dalším sledovaným parametrem byl ***radiální růst a výtěžnost konidií na umělém a rozeném živném substrátu (ječné kroupy)***. Jako kultivační médium pro porovnání notlivých kmenů entomopatogenních hub byl použit bramborovo – dextózový agar (PDA), ý je vhodným médiem pro kultivaci houby *B. bassiana* a *M. anisopliae*, což potvrzují np, Bidochka (2002), kteří uvádějí, že při kultivaci houby *B. bassiana* a *M. anisopliae* na A byla pozorována nejvyšší produkce konidií ve srovnání s ostatními komerčně tupnými živnými půdami (SDA, MEA, NA, CMA a YPD). V průběhu polyfaktoriálního nocení byl největší nárůst středových kultur po 14 dnech kultivace zaznamenán u kmenů *umosoroseus* (v rozpětí od 36,6 do 50,6 mm) s průměrnou velikostí středové kultury 7 mm. Menší velikost radiálního růstu byla zaznamenána u kmenů *M. anisopliae* elikostí středové kultury od 22,0 do 37,4 mm (v průměru 28,5) a u kmenů *B. bassiana* (v měru 31,9 mm), které vykazovaly vyšší variabilitu radiálního růstu mezi kmeny. Rozdíl ve kosti středových kultur mezi druhy zaznamenal také Landa et al. (2001) u kmenů omopatogenních hub izolovaných z infikovaných dospělců lýkožrouta smrkového (*Ips ographus*), kde byl rozdíl ve velikosti průměru středových kultur čtyř kmenů druhu *umosoroseus* (průměr 51,8 mm) a šesti kmenů druhu *B. bassiana* (průměr 42,1 mm) větší 10 mm. Fargues, Bon (2004) uvádí rychlost radiálního růstu dvou izolátů *P. fumosoroseus* *11* a *Pfr46*) mezi 3 – 12 dnem po inokulaci Petriho misek za střídavých teplotních režimů :12 hodin) a za standardních podmínek takto: Myceliální rychlost růstu kmene *Pfr 11* se a od 0 při 32 – 35 °C do 4,11 ± 0,09 mm.den^{-1} při 20 – 25 °C a u kmene *Pfr46* od 0,05 ± 2 mm/ 1 den při 32 – 35 °C do 3,91 ± 0,02 mm/ 1 den při 25 – 28 °C. Ekesi et al. (1999) dí průměrnou rychlost růstu za den (u kmenů houby *B. bassiana* a *M. anisopliae*) v rozpětí 2 mm při 15 a 35 °C a 2 – 5 mm při 25 a 30 °C. Z tohoto důvodu Ekesi et al. (1999) zují, že optimální teplota pro růst těchto kmenů leží mezi 25 – 30 °C a to odpovídalo i dii klíčivosti. Parker et al. (2003) upozorňují na pozoruhodnou rychlost růstu u čtyř kmenů *assiana*, protože zatímco jejich růst byl při teplotě 20 a 30 °C průměrný při 25 °C byl hlý. Varela, Morales (1996) poznamenávají, že metoda měření rychlosti růstu hyfy je lepší metoda kultury (radiální růst) pro hodnocení rozdílu v rychlosti růstu mezi izoláty, tože toto měření je více přesné a poskytuje výsledky rychleji. A dále dodávají, že izoláty, ré mají rychlejší tempo růstu jsou zvýhodněny jakožto biologické regulační agents, protože umožňuje zkrácení času nezbytného pro rozvoj bioinsekticidu, poskytuje skvělou kurenceschopnost hub vůči ostatním mikroorganizmům během jejich saprofytického ota a eventuálně urychlí úroveň regulace škůdců díky rychlejší infekci hmyzu.

V návaznosti na hodnocení radiálního růstu je nutné poznamenat, že mezi radiálním tem a produkcí konidií u kmenů z jihočeského regionu byla zaznamenána negativní elace v rámci kmenů téhož druhu nebo mezi druhy navzájem. Největší radiální průměr dové kultury byl zaznamenán u kmene M064, M069 (*P. fumosoroseus*) (50,6 – 48,2 mm) mene M081 (*B. bassiana*) s velikostí středové kultury 37,0 mm. Ovšem tyty kmeny azovaly nejnižší hodnoty produkce konidií z plochy. Naproti tomu kmen M185 *bassiana*) a kmen M076 (*M. anisopliae*) vykazovaly nejmenší velikost středové kultury, produkce konidií u těchto dvou kmenů patřila mezi nejvyšší – 4,40.10^7 konidií/ 100 mm^2 nen M185) a 7,10.10^7 konidií/ 100 mm^2 (kmen M076). Stejné zjištění učinil Landa et al. 01) mezi izoláty *B. bassiana*. Proto se domnívám, že velikost středové kultury by neměla

B. bassiana na orné půdě potvrzuje i Bidochka et al. (1998), kteří zjistili, že *B. bassiana* byla zaznamenána mnohem častěji v přirozeném nebo nenarušeném prostředí, zatímco *M. anisopliae* byla izolována častěji na kultivovaných zemědělských půdách. Tento fenomén byl také pozorován u těchto dvou hub v Evropě (Vänninen 1996; Kleespies et al. 1989) a v Austrálii (Rath et al. 1992). Ovšem prozatím nebyly stanoveny faktory, které ovlivňují preferování některého ze stanovišť. Vänninenová (Vänninen 1996) a obdobně Baker, Baker (1998) naznačili, že pro přežití, *B. bassiana* vyžaduje mnohonásobnou infekci (častou pasáž přes hmyz) a nedostatek hostitelů na intenzivně kultivovaných plochách způsobuje, že *B. bassiana* je na těchto půdách znevýhodněná. Naproti tomu konidie *M. anisopliae* jsou schopny déle vytrvat při nedostatku sekundárního hostitele a jsou schopny lépe přežívat v půdně než *B. bassiana* (Latch, Fallon 1976). Obdobně entomopatogenní houba *P. fumosoroseus* byla Vänninen (1995) klasifikována jako druh citlivý na porušení přirozeného prostředí vlivem kultivačních zásahů.

Nejvýznamnější rozdíl mezi použitými izolačními metodami, jak v jihočeském regionu tak na lokalitách na Moravě byla schopnost SM a.i. dodine izolovat druh *P. lilacinus* a *P. carneus*, které nebyly izolovány pomocí larev zavíječe voskového (*G. mellonella*), což je zřejmě způsobené odlišným hostitelským spektrem těchto druhů hub, protože např. houba *P. lilacinus* se považuje spíše za nematofágní druh (Jatala 1986; Rumbos, Kiewnick 2006). Předností selektivního média se složkou dodine je možnost kvantitativního hodnocení přítomnosti entomopatogenních hub v půdě při současné inhibici ostatních půdních hub. Např. při monitoringu v jihočeském regionu byl u druhu *P. lilacinus* zaznamenán průměrný počet 25,5 CFU/ Petriho misku (to představuje $2{,}60.10^3$ CFU/ 1ml půdního vzorku) oproti např. 4,1 CFU/ Petriho misku (tj. $4{,}10.10^2$ CFU/ 1ml půdního vzorku) u druhu *M. anisopliae* nebo 1,4 CFU/ Petriho misku (tj. $1{,}40.10^2$ CFU/ 1ml půdního vzorku) u druhu *B. bassiana*. Vzhledem ke způsobu vyjádření kvantitativního množství entomopatogenních hub v půdě (CFU/ 1ml) nelze výsledky jednoznačně srovnat s ostatními autory. Keller at al. (2003) např. uvádí, že četnost výskytu entomopatogenní houby *M. anisopliae* byla na orné půdě v průměru $3{,}79.10^2$ CFU/ 1 g půdy (v rozmezí 0,02 – $1{,}1.10^3$ CFU/ 1 g půdy). Nicméně kvantitativním hodnocením entomopatogenních hub v půdě nebylo možné stanovit rozmezí, kdy již četnost konidií entomopatogenních hub v půdě je detekovatelná pro GBM.

Monitoring entomopatogenních hub (v jihočeském regionu a na vybraných lokalitách na území Moravy) jednoznačně prokázal všudypřítomnost nejfrekventovanějších druhů vláknitých, entomopatogenních hub (Metarhizium anisopliae, Beauveria bassiana, Paecilomyces lilacinus a P. fumosoroseus) a umožnil tak doplnit mykologickou sbírku kmenů entomopatogenních hub Katedry rostlinné výroby ZF JU v Českých Budějovicích pro potřeby následných nebo budoucích studií. Výjimkou byla houba P. lilacinus, která představuje určité zdravotní riziko (Goettel et al. 2001) a z tohoto důvodu nebyl tento druh kultivován a uložen.

5.2. Polyfaktoriální charakteristika izolovaných kmenů entomopatogenních hub z půdy

Nezbytným předpokladem využití těchto přirozeně se vyskytujících entomopatogenních organizmů v programech (bio)intenzivní integrované ochrany rostlin je jejich polyfaktoriální hodnocení pomocí růstových, produkčních a biologických charakteristik, na základně kterých může být proveden výběr vhodného autochtonního kmene entompatogenní houby. Za tímto účelem byly vybrané kmeny entomopatogenních hub hodnoceny pomocí „in vitro“ a „in vivo“ (bio)testů s cílem vybrat nejvhodnější kmen popř. kmeny pro jejich případnou introdukci do půdy a současně doplnit informační databázi kmenů o výsledky získané z (bio)testů.

6.2.1. Polyfaktoriální hodnocení kmenů entomopatogenních hub izolovaných z půdy v jihočeském regionu a na lokalitě Troubsko pomocí „in vitro" a „in vivo" (bio)testů

Do polyfaktoriálního hodnocení kmenů byly zahrnuty vybrané kmeny izolované v jihočeském regionu a na pokusné lokalitě Troubsko. Kmeny izolované na pokusné lokalitě VÚP Troubsko byly hodnoceny odděleně s cílem vybrat vhodné kmeny entomopatogenních hub pro jejich následné využití ve studii zaměřené na *„Vývoj a využití biopreparátů a organominerálních hnojiv podporujících rozklad organických látek a zvyšujících supresivitu půdy"*, jejíž součástí byly nádobové a polní pokusy prováděné pracovníky VÚP Troubsko.

Všechny (bio)testy hodnotící morfologické, produkční a biologické vlastnosti druhů/kmenů entomopatogenních hub byly stanoveny při titru 1.10^7 konidií/ 1 ml suspenze a teplotě 25 °C, která se považuje např. pro houbu *B. bassiana* za optimální (Hallsworth a Magan 1999, Ekesi et al. 1999). Vstupním hodnotícím parametrem polyfaktoriálního hodnocení bylo ***stanovení klíčivosti a rychlosti vývoje konidií*** u testovaného kmene, protože klíčivost konidií je prvním předpokladem vzniku infekce hmyzu u většiny entomopatogenních hub, jak potvrzují autoři Luz, Fargues (1997), přičemž konidie s rychlejším tempem klíčivosti mohou mít větší potenciál pro vznik infekce (Leland 2001). Vitalita konidií každého z hodnocených kmenů byla vyjádřena formou procentní klíčivosti (Goettel at al. 1997). Při hodnocení vývoje kmenů byla využívána indexová hodnotící stupnice (Germination Index) a charakteristika kmenů byla vyjádřena formou průměrných denních indexů (Landa et al. 1994). Význam této stupnice spočívá především v jejím členění, protože každý stupeň přesně specifikuje vývojovou fázi patogena např. ve fázi (GI 0-1) je patogen ještě závislý na vlastních živinách, ale při indexu vývoje (GI 1-2) dochází již k využívání externích nutričních zdrojů až do fáze (GI 2-3), kdy je vývoj houby ukončen konidiogenezí. Obecně lze říci, že většina hodnocených kmenů entomopatogenních hub (*B. bassiana*, *M. anisopliae* a *P. fumosoroseus*) byla schopna dokončit svůj vývoj během 3 – 4 dnů. Nejrychlejší vývoj byl pozorován u kmenů druhu *B. bassiana*, které byly schopny dokončit vývoj během 48 – 72 hodin s průměrnou klíčivostí konidií 79 % (kmeny z Troubska) až 95,4 % (kmeny z jihočeského regionu) po 24 hodinách. Obdobně Devi at al. (2005) zjistili klíčivost konidií u 29 kmenů *B. bassiana* (při 25 °C po 24 hodinách) v rozpětí 81,3 – 97,3 % a Varela, Morales (1996) uvádí průměrný čas potřebný pro naklíčení 50 % konidií (TG_{50}) u šesti testovaných kmenů *B. bassiana* v délce 14:57 – 19:05 (hodin a minut). Porovnáním výsledků testu klíčivosti u kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* po 24 hodinách byla u kmenů lokality Troubsko zjištěna vyšší variabilita se směrodatnou odchylkou 0,3898 (s průměrným ndexem GI 1,32) než u kmenů z různých míst jihočeského regionu se směrodatnou dchylkou 0,2439 a průměrným indexem GI 1,75. Toto zjištění může naznačovat význam užití polyfaktoriálního hodnocení kmenů i v rámci jedné lokality odběru. Nejlepší votaschopnost konidií vykazovaly kmeny entomopatogenní houby *P. fumosoroseus* průměrnou klíčivostí 99,5 %, ovšem oproti kmenům druhu *B. bassiana* měly pozvolnější ývoj především po 48 hodinách testu. Srovnatelná rychlost vývoje v případě kmenů *B. bassiana*) a dokonce rychlejší vývoj u kmenů (*P. fumosoroseus*) byl zjištěn porovnáním ýsledků s komerčně využívaným kmenem BBA-M (*B. bassiana*) re-izolovaným mikrobiálního insekticidu MYCOTROL®, Mycotech Corporation, MT, USA (průměrný GI 76 a 100 % klíčivost) a kmenem PFR 97 (*P. fumosoroseus*) re-izolovaným z mikrobiálního sekticidu PFR 97™ 20%WDG, Thermo Trilogy Corp., MD, USA (průměrný GI 1,83 a 00 % klíčivost) (Landa et al. 2001). Nejpomalejší vývoj (v průměru GI 0,53) s 0 – 78 % íčivostí byl zaznamenán u kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae*. Liu et al. (2003), e zjistili u kmene (*M. anisopliae*) izolovaného z půdy 91,4 % klíčivost při 20 °C a Ekesi at (1999) dokonce 100 % klíčivost u čtyř kmenů *M. anisopliae* (původem z Afriky) při 25 °C. ejrychlejší počáteční vývoj s plnou sporulací do druhého dne testu a vysoké procento

být rozhodujícím kritériem při polyfaktoriálním hodnocení kmenů. V případě kmenů izolovaných na lokalitě VÚP Troubsko byly výsledky výtěžnosti konidií na umělé živné půdě vyšší a to především u druhu *B. bassiana* (v rozpětí 3,05 – 1,66.10^8 konidií/ 100 mm^2), kde průměrná produkce kmenů poskytovala produkci o 3,39.10^7 konidií/ 100 mm^2 vyšší než průměrná produkce kmenů (*B. bassiana*) z jihočeského regionu. Nejproduktivnější kmen na lokalitě Troubsko byl kmen M409 (*B. bassiana*) – 1,66.10^8 konidií/ 100 mm^2 a kmen M398 (*M. anisopliae*) – 1,03.10^8 konidií/ 100 mm^2. Při hodnocení produkce konidií na sabouraud dextrózovém agaru s 0,25 % přídavkem kvasničného extraktu (SDAY) zaznamenali Liu et al. (2003) produkci konidií u kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* v rozpětí 1,60.10^6 – 1,55.10^7 konidií/ 1 cm^2 při kultivační teplotě 20 °C. Naproti tomu Varela, Morales (1996) zaznamenali rozdílnou produkci konidií (2,2.10^8 konidií/ 1 cm^2 – 1,6.10^9 konidií/ 1 cm^2), zřejmě ovlivněnou vyšší kultivační teplotou (27 °C). Parker et al. (2003) hodnotili produkci konidií také v Petriho miskách s SDAY médiem, na jehož střed umístili kotouč z filtračního papíru nasátý konidiovou suspenzí (*B. bassiana*) a po 15 dnech kultivace při teplotě 25 °C zaznamenali rozpětí produkce od 2,51 – 5,97.10^8 konidií/ 1 cm^2. Landa et al. (2001) naproti tomu zaznamenal produkci u *B. bassiana* v rozpětí 2,98 – 8,63.10^8 konidií/ kulturu. Kamp, Bidochka (2002) poznamenává, že produkce konidií u *M. anisopliae* a *B. bassiana* je ovlivněna různými podmínkami živné půdy a různé typy výživy v agarizovaném médiu mají za následek rozdílné množství vyprodukovaných konidií po 14 dnech. Další faktorem, který ovlivňuje produkci konidií (*M. anisopliae* a *B. bassiana*) na médiu PDA, je síla vrstvy média, kde se vzrůstající vrstvou média významně klesá produkce konidií např. nejvyšší produkce konidií byla zaznamenána při tloušťce média PDA na 2 mm oproti 4 mm. Dalším hodnotícím parametrem byla ***produkce konidií na přirozeném živném substrátu***, protože pro komerční produkci konidií jsou většinou využívány metody produkce na pevných substrátech, které mohou být tvořeny obilnými zrny, rýží nebo jiným substrátem na bázi škrobu (Goettel, Roberts 1992). Produkce konidií na přirozeném živném substrátu u všech třech hodnocených druhů entomopatogenních hub izolovaných z jihočeského regionu prokázala dobré produkční charakteristiky, jak je zřejmé z průměrné produkce kmenů druhu *B. bassiana* (8,96.10^8 konidií/ g krup), *P. fumosoroseus* (6,86.10^8 konidií/ g krup) a *M. anisopliae* (4,10.10^8 konidií/ g krup). Nejproduktivnějším kmenem zde byl kmen M104 (*B. bassiana*) s produkcí 2,20.10^9 konidií/ g krup. Obdobné produkční charakteristiky vykazovaly kmeny izolované na lokalitě Troubsko, v rozpětí 7,00.10^6 – 4,63.10^8 konidií/ 1 g krup u druhu *B. bassiana* a 3,45.10^7 – 4,96.10^8 konidií/ 1 g krup u druhu *M. anisopliae*.

Na pevném médiu se běžný životní cyklus *B. bassiana* a obecně u všech vláknitých hub skládá z tvorby konidií po fázi vegetativního růstu v návaznosti na faktory prostředí, které jsou omezením pro vegetativní fázi. Nicméně v podmínkách ***submerzní kultury*** je sporulace mnoha Mitosporických hub potlačena (zůstávají zcela ve vegetativní fázi nebo produkují ve velkém množství blastospory) (Bosch, Yantorno 1999), ale za těchto podmínek může začít růst v různých formách, včetně tenkostěnných, jednobuněčných hyf (některé formy nazývané jako „blastospory") (Wraight et al. 2001). Polyfaktoriální charakteristika kmenů naznačila minimální (1,88 – 4,75.10^6 blastospor/ 1 ml) nebo vůbec žádnou schopnost produkovat infekční propagule pomocí submerzní kultivace u druhu *M. anisopliae*, kde např. u kmene M076 byl zaznamenán především růst mycelia v podobě myceliálních kuliček. Tyto výsledky ale neodpovídají produkci submerzních propagulí u *M. flavoviride* (1,4 – 2,4.10^8 propagulí/ 1 ml) při 28 °C po 72 hodinách na čtyřech různých médiích (Fargues et al. 2002). Obdobně byly produkovány u druhu *B. bassiana* blastospory v množství 7,4.10^8 blastospor/ 1 ml média se sacharózou (2,5 %) a s kvasničným extraktem (2,5 %) (Rombach 1989). Snížená schopnost entomopatogenní houby *M. anisopliae* produkovat srovnatelné množství blastospor jako např. u kmenů *B. bassiana* (1,24.10^8 – 1,18.10^9 blastospor/ 1 ml) nebo kmenů houby *P. fumosoroseus* (4,38.10^7 –

25.10^8 blastospor/ 1 ml) mohla být ovlivněna např. nízkou kultivační teplotou (22 °C) nebo ožením kultivačního média, protože pomocí změn ve složení živného média a podmínek ostředí může být aktivována tvorba submerzních konidií bez rozvoje mycelia (Bosch, antorno 1999). Je nutné zdůraznit, že množství blastospor je důležitou charakteristikou, otože tento typ spor je parazitickou formou uvnitř hmyzího hostitele (Varela, Morales 96). V mnoha případech hyfy a blastospory hyfomycet mohou být stejně nebo více rulentní než vzdušné konidie (Vandenberg et al. 1998) a to naznačuje značný potenciál pro ich formulaci a aplikaci jako mikrobiální insekticid.

Součástí polyfaktoriálního hodnocení kmenů entomopatogenních hub byly také io)testy na modelových hostitelích, jako např. molici skleníkové (*Trialeurodes poratiorum*) (Homoptera, Aleyrodidae) a zavíječi voskovém (*Galleria mellonella*) epidoptera, Pyralidae) v „in vivo" systémech. Všechny hodnocené kmeny zahrnuté do ndardního laboratorního ***(bio)testu FDGI*** (Landa et al. 1994) vykazovaly virulenci vůči stupci z řádu Homoptera, přestože byly izolovány z půdy pomocí larev zavíječe voskového BM). Virulence hodnocených kmenů vůči dalším řádům hmyzu je pravděpodobná, jak kládá Chandler et al. (1997), který prokázal virulenci čtyř kmenů *M. anisopliae* vůči ětilkám (*Delia radicum* a *Delia antiqua*) (Diptera, Anthomyiidae). Tanada, Kaya (1993), předpokládají, že kmeny v rámci druhů izolované z určitého hostitele jsou většinou ulentnější pro tohoto hostitele, než pro ostatní hostitele. Charnley (1997) poznamenává, že e není konsensus, který by stanovil pravděpodobně nejvhodnějšího kandidáta pro koinsekticid jedná-li se o izolát původem z cílového hostitele (homologický izolát), statních hostitelů (heterologický izolát) nebo se jedná o exotickou houbu (druhy které sou přítomny v místě aplikace). Nicméně, virulence je vyjádřena z hlediska indexu „fungus wth development" (FDGI) spíše než LC_{50} nebo rychlosti infekce (Wraight et al. 1998). případě (bio)testu FDGI byl zaznamenán rychlejší nástup vývoje kmenů na pupariu molice eníkové u entomopatogenní houby *M. anisopliae* než *B. bassiana* (kmen 1A-I-1, M395, 96 a M399) při dávce 1.10^7 konidií/ 1 ml suspenze. Všechny kmeny s výjimkou kmene -I-1 (*B. bassiana*) byly schopny dokončit svůj vývoj (index 3,00 – plná sporulace) do 96 din. Nejintenzivnější vývoj byl zaznamenán u entomopatogenní houby *M. anisopliae* nen M406, M394 a M402) a *B. bassiana* (kmen M408, M403, M410 a M404) u kterých byl namenán rychlejší vývoj po celou dobu testu v porovnání s re-izolovaným kmenem BBA- (*B. bassiana*) z mikrobiálního insekticidu MYCOTROL®, Mycotech Corporation, MT, A (Landa et al. 2001). Wraight et al. (1998) zjistil, že střední letální dávka (LC_{50}) u čtyř 3 testovaných kmenů *B. bassiana* byla v rozmezí 50 – 150 konidií/ 1 cm^2 při nanesení penze na povrch listů ibišku (*Hibiscus rosa-sinensis*), kde se nacházely 15 denní nymfy lice (*Bemisia argentifolii*). Eyal et al. (1994) zase zaznamenal 52 – 98 % mortalitu *rgentifolii*, která následovala po ponoření nymf do suspenze *B. bassiana* o koncentraci 1 – 0^6 konidií/ 1 ml po dobu 10 sekund. Během našeho (bio)testu byla u některých lnocených kmenů (*B. bassiana*) pozorována, obdobně, jak uvádí Wraight et al. (1998) dentifikovatelná pigmentace (o různé intenzitě červené barvy) uvnitř hemocelu hostitele olice). Ovšem tento jev byl nejintenzivněji pozorován během (bio)testu na zavíječi kovém (kapitola 6.2.2), především v době, kdy docházelo k porůstání larev myceliem. ejvětší pravděpodobností se jedná o červeně se barvící dibenzoquinone oosporein, který je duktem velkého množství půdních hub, a entomopatogenní houby patřící do rodu *uveria* (Eyal et al. 1994).

6.2.2. Standardní laboratorní bio-test na larvách zavíječe voskového (*G. mellonella*)

Stejně jako (bio)test na molici skleníkové (*T. vaporatiorum*) přináší (bio)test na zavíječi voskovém (*G. mellonella*) potřebné informace pro polyfaktoriální hodnocení a výběr kmenů. Cílem této studie bylo navázat na předchozí zkušenosti s tímto modelovým hostitelem a stanovit optimální dobu pro porovnání virulence u sady kmenů (*B. bassiana*) vůči 3. – 4. instaru larev zavíječe voskového (G. mellonella).

6.2.2.1. Stanovení optimální délky (bio)testu pro jednorázové vyhodnocení rychlosti vývoje entomopatogenní houby *B. bassiana* na larvách zavíječe voskového (*G. mellonella*)

Na základě porovnání rychlosti vývoje kmene M432 a M062 se jako optimální doba pro výběr kmenů ukázala být 96. hodina od zahájení (bio)testu, kdy 40 – 60 % larev dosáhlo indexu vývoje 3 a více (hodnoceny jako usmrcené). Inglis et al. (2001) uvádí, že smrt hmyzu může být způsobená kombinací vyčerpání živin, fyzickým zablokováním nebo narušením orgánů a toxikózou. Například *B. bassiana* produkuje mnoho toxických sloučenin, zahrnujících beauvericin, bassianolide a oosporein (Vey et al. 2001). V porovnání s kontrolní variantou byly zaznamenány první rozdíly po 48 hodinách testu, kdy u většiny ošetřených larev byly patrné jednotlivé až splývavé melanizační skvrny (index 2). Tvorba melanizačních skvrn je v případě (bio)testu na zavíječi voskovém důležitým determinačním znakem, který umožňuje upřesnit vývojovou fázi patogena. Melanizační skvrny vznikají jako obranná reakce hostitele při poškození anebo podráždění jednotlivých buněk mikrobiální buněčné stěny, čímž se v kutikule aktivuje produkce fenoloxidázy a výsledkem je lokální produkce chinonu a melaninu (Wilson et al. 2001). Melanin se tak podílí na zvyšování imunitní schopnosti hmyzu, což je dáno tím, že melanin je polymer a pravděpodobně se podílí na zpevnění kutikuly, čímž zvyšuje její schopnost fungovat jako fyzická bariera proti patogenům a parazitům, kteří do těla hostitele penetrují skrz kutikulu (houby, bakterie a parazitoidi) (StLeger et al. 1988; Hajek, StLeger 1994).

6.2.2.2. Hodnocení vývoje kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na larvách zavíječe voskového (*G. mellonella*) po 96 hodinách (bio)testu

Podle indexu vývoje kmenů a procenta mortality larev bylo možné jednotlivé kmeny rozdělit na kmeny s vysokou (8 kmenů), střední (6 kmenů) a nízkou (8 kmenů) úrovní virulence vůči zavíječi voskovému. Všechny kmeny s výjimkou kmenů s nízkou virulencí bylo schopno během 96 hodin usmrtit minimálně 50 % larev (index 3 a více). Ovšem pouze u čtyř kmenů (M493, M432, M062 a M132) s vysokou virulencí byla zaznamenána mortalita larev v rozpětí 80 – 90 % s 15 – 20 % larev, které již byly porostlé myceliem (index 4 – 5). Liu et al. (2003) uvádějí, že izoláty houby *B. bassiana*, které produkovaly větší konidie, měly vyšší produkci spor, rychlejší klíčení a růst, při velkém rozpětí teplot byly obecně nejvirulentnější vůči druhému instaru *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). Další autoři většinou inokulovali entomopatogenní houbu injekčně a z tohoto důvodu nebylo srovnání získaných výsledků možné.

6.3. Využití RAPD analýzy pro hodnocení genetické variability na vybrané sadě kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* izolovaných z jihočeského regionu

Pro rozvoj účinné strategie biologické ochrany jsou důležité dva předpoklady, a to stanovení variability a kde je to možné, prokázání totožnosti kmene (Piatti et al. 1998). Z tohoto důvodu byla ověřena možnost použití metody RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) nejdříve jako jednoduchého prostředku ke stanovení variability mezi kmeny izolovanými z různých lokalit jihočeského regionu a později jako prostředek pro prokázání persistence kmene po jeho záměrné introdukci do půdy (kapitola 6.5). Cílem této dílčí studie bylo stanovit genetickou variabilitu autochtonních kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana*, které byly izolovány z půdy z různých míst jihočeského regionu. Z tohoto důvodu bylo možné porovnat vzájemný vztah mezi genetickou variabilitou, místem původu kmenů a jejich virulencí vůči zavíječi voskovému (*G. mellonella*).

Na základě vstupního screeningu bylo z 20 primerů (OPERON TECHNOLOGY, CA) vybráno 11 primerů, které poskytovaly dostatečný a detekovatelný polymorfismus. Obdobně Piatti et al. (1998) pro svou studii vybral 12 oligonukleotidových primerů z 20, které již dříve použil Cravanzola et al. (1997). Naproti tomu Devi et al. (2001) vybral pouze 4 z 20 primerů, které dávaly stálé RAPD-PCR profily mezi jednotlivými reakcemi. Ostatní nukleotidy nebyly do studie zahrnuty, protože dávaly rozporuplné výsledky nebo produkovaly velké množství pruhů, které stěžovaly analýzu. Castrillo et al. (2003) vybral také 4 primery, poskytující silné a reprodukovatelné pruhy, ovšem screenig prováděli z celkového počtu 88 RAPD primerů.

Pomocí klastrové analýzy byla většina kmenů *B. bassiana* rozdělena do dvou velkých bloků, které se dále členily na menší skupiny po dvou a více kmenech. Třetí blok tvořily dva místní kmeny a poslední blok, který se výrazně odlišoval od všech autochtonních kmenů tvořily dva referenční americké kmeny *B. bassiana*. Míra jejich odlišnosti od ostatních autochtonních kmenů byla na úrovni 30 %. Tato míra odlišnosti se jeví jako velmi významná a mohla by naznačovat příslušnost těchto kmenů k jiné genetické nebo geografické skupině. Hodnocená sada kmenů původem z různých míst jihočeského regionu vykazovala nízkou variabilitu na úrovni 7 – 18 % v porovnání s nepůvodními referenčními kmeny. Devi et al. (2001) prováděli RAPD analýzu na izolátech *B. bassiana* původem z různých klimatických pásem obou polokoulí a zjistili vysokou (~70 %) úroveň podobnosti. Naproti tomu větší genetická vzdálenost byla pozorována mezi izoláty *B. bassiana* v RAPD analýze Berretta et al. (1998) a ve studii zaměřené na kmeny *B. bassiana,* sbírané z jedinců potemníka stájového (*Alphitobius diaperinus*) (Coleoptera: Tenebrionidae), kde byla podobnost mezi kmeny ze stejného regionu od 31 - 84 %. Obdobné výsledky genetické variability jako u kmenů z jihočeského regionu zaznamenal Landa et al. (2001) na čtyřech izolátech *B. bassiana* získaných z lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) (Coleoptera, Scolytidae), kde vzdálenost mezi těmito izoláty podle Nei & Li koeficientu genetické vzdálenosti se nacházela mezi 3,5 až 16,7 %. Všechny izoláty byly v tomto případě shlukovány do jedné skupiny, která byla zřetelně oddělena od nepůvodního kmene BBA-M. Landa et al. (2001) dále pokračují a poznamenávají, že výsledek RAPD analýzy umožňuje rozlišit izoláty *B. bassiana* původem ze Šumavy od nepůvodního izolátu s hodnotou koeficientu Nei & Li mezi izoláty ze Šumavy a BBA-M v rozpětí od 0,219 – 0,278. V této souvislosti byla také vedena zajímavá studie na 71 izolátech entomopatogenní houby *B. brongniartii*, které byly získány z larev chrousta obecného (*Melolontha melolontha*) (Coleoptera, Scarabaeidae). Nejvíce (58 izolátů) bylo původem z oblasti Valle d'Aosta (Itálie) z rozlohy 7 830 ha a ostatní izoláty byl získány z různých evropských zemí. Ze těchto izolátů *B. brongniartii* bylo 50 izolátů pomocí RAPD analýzy seskupeno s podobností vyšší než 93,4 %. Všechny izoláty byly rozděleny do pěti skupin a přestože 3., 4. a 5. skupina obsahovala izoláty z oblasti Valle d'Aosta byla malá

korelace mezi skupinami a geografickým původem (Ozino et al.1998). V případě jihočeského regionu nebyla také zaznamenána žádná souvztažnost mezi seskupením kmenů v dendogramu a lokalitou resp. okresem původu. Například kmen M345 z lokality Pístina (Jindřichův Hradec) se nachází v prvém bloku s mírou podobnosti 91 % ke kmeni M445 z lokality odběru Hluboká (České Budějovice). Naproti tomu kmen M067 a M062 z lokality Pístina se nacházejí ve druhém bloku. Pomocí této metody však bylo možné odlišit nepůvodní kmeny (USA) od přirozeně se vyskytujících se kmenů *B. bassiana* v jihočeském regionu, jak také viz. výše potvrdil Landa et al. (2001). Další autoři (Berretta et al. 1998; Castrillo a Brooks 1998) také nezjistili žádnou korelaci mezi shlukováním kmenů a jejich geografickým původem.

Porovnáním genetické analýzy kmenů a jejich virulence vůči larvám zavíječe voskového (kapitola 6.2.2) zjistíme, že kmeny s vysokou úrovní virulence k hostiteli byly zároveň seskupeny s kmeny se střední a nízkou virulencí. Na základě těchto výsledků je možné konstatovat, že nebyla pozorována ani minimální korelace mezi virulencí kmenů a genetickou variabilitou či jejich původem. Nicméně Barretta et al. (1998) zjistil u čtyř z šesti izolátů *B. bassiana*, které tvořily jednu genotypovou skupinu o 85 % podobnosti, vysokou virulenci vůči *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae) patřícího do čeledi zavíječovití. Zároveň ale dodává, že pro pochopení této otázky by mělo být analyzováno více izolátů. Naproti tomu Devi et al. (2001) konstatuje, že seskupení izolátů *B. bassiana* (pomocí RAPD) nekoreluje s agresivitou izolátů vůči *Chilo partellus* (Lepidoptera, Pyralidae) a dokládá to tím, že dva vysoce agresivní izoláty byly klastrovou analýzou seskupeny do dvou různých skupin s nejméně agresivními izoláty. Devi et al. (2001) dále poznamenává, že Luz et al. (1998) měli stejnou zkušenost s izoláty *B. bassiana* proti *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae), u kterých také nezaznamenali žádnou korelaci.

6.4. Předaplikační studie

Cílem (před)aplikační studie bylo 1. stanovit kompatibilitu autochtonních kmenů entomopatogenních hub s nosičem Beta-liq pomocí základních „in vitro" (bio)testů; 2. ověřit životaschopnost vybraných kmenů entomopatogenních hub po krátkodobém zamrazení; 3. ověřit použití jednoduché genetické metody pro rozlišení kmenů a za 4. posoudit možnost velkoobjemové produkce biomasy entomopatogenních hub a její úpravy.

6.4.1. Hodnocení kompatibility a produkčních charakteristik kmenů entomopatogenních hub v kombinaci s organominerálním hnojivem Beta-liq

V rostlinné výrobě se v současné době (se změnou struktury rostlinné a živočišné výroby) produkuje značné množství slámy. Přirozený rozklad těchto posklizňových zbytků na poli je velmi pozvolný a z tohoto důvodu bylo (pracovníky VÚP Troubsko) testováno organominerální hnojivo na bázi výpalků řepné melasy BETA-LIQ® (REDAM SMRŽICE s.r.o.), které podporuje rozklad posklizňových zbytků a slámy. Pro zvýšení supresivního účinku půdy byla testována varianta organominerálního hnojiva v kombinaci s entomopatogenními houbami v projektu „*Vývoj a využití biopreparátů a organominerálních hnojiv podporujících rozklad organických látek a zvyšujících supresivitu půdy*". Z tohoto důvodu bylo jedním z cílů předaplikační studie stanovit kompatibilitu entomopatogenních hub s organominerálním hnojivem Beta-liq.

Pro hodnocení byly zvoleny dvě koncentrační řady přípravku Beta-liq, které byly porovnány s výsledky růstu a vývoje kmenů v kontrole (kapitola 6.2.1 resp. kapitola 5.2). Přesto, že v průběhu **vstupního (bio)testu** (10 a 50 % koncentrace přípravku Beta-liq) byla zaznamenána kompatibilita přípravku Beta-liq (10 %) s entomopatogenní houbou

P. fumosoroseus a *B. bassiana*, byl také pozorován nepříznivý vliv organominerálního hnojiva na výraznější tvorbu mycelia u kmenů *B. bassiana* (z jihočeského regionu) na úkor jejich pozdější sporulace (o 24 hodin) v porovnání s kontrolou. Opačný efekt přípravku Beta-liq (10 %) však byl pozorován u kmenů z lokality Troubsko. Negativní vliv přípravku Beta-liq (10 %) byl pozorován především u entomopatogenní houby *M. anisopliae*, kde byl zaznamenán výrazně pomalejší vývoj kmenů s minimální (3 %) klíčivostí konidií oproti 70 % klíčivosti kmenů v kontrole. Ovšem výsledky ze vstupního testu byly v rozporu s hodnocením kompatibility kmenů z lokality Troubsko v nově zvolené **koncentrační řadě** (50 %, 70 % a 90 % přípravku Beta-liq). Zde byla prokázána vysoká kompatibilita kmenů testované entomopatogenní houby *B. bassiana* a také houby *M. anisopliae* při všech zvolených koncentracích. Oproti vstupní koncentrační řadě byl zde pozorován positivní vliv přípravku Beta-liq především u druhu *M. anisopliae*, kde byla stimulována rychlost vývoje kmenů po 48 a 72 hodinách, kdy průměrný index vývoje dosahoval indexu GI 2,00 oproti GI 1,09 v kontrolní variantě. Odlišnost reakce (třech kmenů z jihočeského regionu v porovnání s ostatními kmeny z Troubska) na přípravek Beta-liq je obtížné vysvětlit. U entomopatogenní houby *B. bassiana* (např. M403 a M404) byl potvrzen vliv přípravku Beta-liq na růst mycelia na úkor tvorby konidií. Li, Holdom (1995) uvádějí, že nedostatek živin obvykle stimuluje konidiogenezi a v případě houby *M. anisopliae* a *B. bassiana* houba přechází do fáze konidiogeneze pravděpodobně po vyčerpání dusíkatých zdrojů v přítomnosti uhlohydrátů. Na rozdíl od vstupní studie byla při všech koncentracích zjištěna výrazně vyšší klíčivost konidií. Při hodnocení **základních růstových a produkčních charakteristik** kmenů v kombinaci s 90 % koncentrací přípravku Beta-liq byly pozorovány rozdílné reakce jednotlivých kmenů na přítomnost přípravku Beta-liq. Např. u kmene M403 (*B. bassiana*) byl oproti kontrole zaznamenán nárůst produkce o $2{,}05.10^7$ konidií/ 100 mm^2 PDA přesto, že tento kmen vykazoval při hodnocení vývoje nadměrný růst mycelia. Nadměrný růst mycelia v prvních dnech vývoje kmene mohl mít zřejmě pozitivní vliv na vyšší produkci konidií v delším časovém horizontu (14 dní) pro hodnocení produkce na PDA. Ovšem tento nárůst se neprojevil na velikosti středové kultury, která byla dokonce o 1,3 cm menší než v kontrolní variantě. V porovnání s kontrolní variantou byla však celkově zaznamenána nižší průměrná produkce o $1{,}92.10^7$ konidií/ 100 mm^2 u kmenů druhu *B. bassiana* a *M. anisopliae*. Menší produkce konidií na přirozeném médiu byla pozorována také u obou hodnocených druhů entomopatogenních hub, např. u kmenů (*M. anisopliae*) byl tento rozdíl v průměru $2{,}26.10^7$ konidií/ 1g krup.

Na základě hodnocení klíčových charakteristik kmenů entomopatogenních hub bylo organominerální hnojivo Beta-liq doporučeno jako nosič entomopatogenních hub při introdukci do půdy ve studii zaměřené na „*Vývoj a využití biopreparátů a organominerálních hnojiv podporujících rozklad organických látek a zvyšujících supresivitu půdy*“ Pro potřeby této studie byly z lokality Troubsko vybrány dva kmeny, vykazující optimální výsledky ve sledovaných charakteristikách – kmen M408 (*B. bassiana*) a M394 (*M. anisopliae*). Pozitivní vliv přípravku Beta-liq v kombinaci s vybranými kmeny entomopatogenních hub byl prokázán v laboratorních a polních maloparcelkových pokusech v roce 2002 – 2005 (data nejsou uvedena). Zde byl pozorován pozitivní vliv entomopatogenních hub např. na nárůst zelené hmoty u testovací plodiny (hořčice bílá), intenzitu produkce CO_2, strukturní stav půdy a podporu rozkladu slámy oproti kontrolní variantě Beta-liq bez entomopatogenních hub nebo samotné půdy bez jakéhokoli přídavku hnojiva.

6.4.2. Hodnocení životaschopnosti vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* a *M. anisopliae* po krátkodobém zamražení

Významným omezením ve využití hub jakožto mikrobiálních regulačních agents je jejich nízká stabilita při dlouhodobém skladování, definovaná jako zachování životaschopnosti propagulí, uvádí Wraight et al. (2001) a dále poznamenává, že nejčastěji byla dosažena stálost spor jejich smícháním s různými materiály. Přesto cílem této studie bylo ověřit životaschopnost suspenze konidií entomopatogenních hub (bez jakýchkoli příměsí) po krátkodobém zamražení (- 20 °C) z důvodu potřeby jejího uskladnění po dobu přípravy celkové produkce biomasy hub a jejího transportu za účelem následné aplikace. Co se týká skladování, Wraight et al. (2001) uvádí, že v několika studiích byla také vyčíslena a hodnocena stabilita různých typů spor po jejich vysušení. Pro potřeby biotestu Vandenberg a Cantone (2004) např. skladovali suspenzi konidií při - 80 °C v kryogenní nádobě. V případě hodnocení vývoje a klíčivosti konidií kmenů (M408 a M394), vybraných v polyfaktoriálním hodnocení, byla ověřena dobrá životaschopnost a stabilita obou kmenů po krátkodobém (14 denním) zamrazení. Pokud by však v dalších studiích byla prokázána nižší klíčivost konidií po krátkodobém zamražení bylo by množství aplikované houby navýšeno o tento rozdíl, jak detailně popisuje Goettel a Inglis (1997). Je nutné zdůraznit, že rychlé rozmražení konidiové suspenze před aplikací na pokusné lokalitě Pěnčín mohlo být jedním z důvodů neúspěšné introdukce vybraných kmenů entomopatogenních hub v kombinaci s přípravkem Beta-liq na pokusném pozemku.

6.4.3. Demonstrace použití RAPD analýzy pro rozlišení kmene entomopatogenní houby

Záměrem analýzy bylo prezentovat možnost použití jednoduché molekulárně-genetické metody RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) pro potřeby případné determinace re-izolovaných kmenů entomopatogenních hub na lokalitě Troubsko. Jak už bylo naznačeno (viz. kapitol 6.3 resp. 5.3), RAPD analýza je relativně levnou a zároveň rychlou genetickou metodou, kterou může být ověřena např. persistence záměrně introdukovaného kmene do půdy. V případě kmene M408 a M394 byla stanovena vzájemná podobnost těchto kmenů na úrovni 85 %.

6.4.4. Produkce biomasy infekčních propagulí vybraných kmenů entomopatogenních hub a její úprava

Cílem této studie bylo ověřit možnost velkoobjemové produkce blastospor a konidií kmenů vybraných druhů entomopatogenních hub v laboratorních podmínkách spolu se způsobem jejich úpravy (v podobě konidiového/submerzního koncentrátu). Nejedná se zde o formulaci v pravém slova smyslu, ale pouze o úpravu odpovídající našim potřebám. Jenkins et al. (1998) upozorňuje, že nejdůležitější při plánování způsobu masové produkce je kompatibilita produktu s jeho formulací a aplikační technikou. V našem případě byla vyprodukovaná biomasa hub, po jejím naředění aplikována postřikem na strniště nebo povrch půdy (popř. list v jiných studiích) pomocí aplikační zemědělské techniky nebo zádových postřikovačů. Např. pro použití olejové formulace při aplikaci ultra-nízkých objemů (ULV) je potřeba produkce lipofilních konidií, které jednoduše vytvářejí suspenzi v olejích (Jenkins et al. 1998). Navzdory výhodám submerzní fermentace a možnosti produkovat konidie mnoha mitosporických hub v submerzní kultuře (Jenkins, Prior 1993), submerzní konidie jsou hydrofilní a nejsou jednoduše formulovány v oleji (Jenkins et al. 1998). Blastospory (také hydrofilní) jsou jednoduše produkovány pomocí submerzní fermentace, ale relativně rychle ztrácejí životaschopnost během skladování (Kleespies, Zimmermann 1992).

Jenkins et al. (1998) uvádí seznam vhodných substrátů, které jsou dostupné pro produkci hub využívaných v biologické ochraně a dodává, že výběr substrátu závisí na mnoha faktorech, včetně jeho dostupnosti, ceně a vhodnosti pro izolát. Používané substráty pro produkci vzdušných konidií Mitosporických hub rozděluje do dvou skupin na: obilný/ výživný substrát (rýže a rýžové otruby, pšenice a pšeničné otruby, pohanka, sójová kaše, kukuřičná mouka, kukuřičné klasy, proso, oves, ječmen, čirok, brambory, chléb, mouka z podzemnice olejné) a inertní/ nevýživný substrát (vermikulit, textilie, jíl nebo granule jílu). V této i v předešlých studiích byly jako přirozený živný substrát použity ječné kroupy především pro jejich nízké pořizovací náklady, jejich dostupnost, možnost skladování a dlouhodobé zkušenosti s jejich použitím. Přesto, že produkce biomasy byla za daných (technických) podmínek relativně velká a jako nejproduktivnější byl zjištěn kmen I9 entomopatogenní houby *Lecanicillium lecanii*, u kterého bylo také zaznamenáno nejširší rozpětí maximální a minimální produkce blastospor jednotlivých šarží ($1{,}22.10^9$ – $8{,}76.10^8$ blastospor/ 1 ml) a dobrou produkci vykázal také kmen Man P4 (v průměru $1{,}17.10^9$ konidií/ 1 g substrátu). Je zde ještě určitý potenciál pro navýšení produkce biomasy hub. Např. Dorta, Arcas (1998) vyprodukovali při fermentaci s nuceným provzdušněním $1{,}85.10^{12}$ konidií (*M. anisopliae*)/ 1 litr pevného substrátu. Ovšem nejběžněji používanou (z historického pohledu) metodou pro masovou produkci konidií houby *Metarhizium* na pevném substrátu (většinou celná zrna) je kultivace v plastových sáčcích nebo jiných malých nádobách (Wraight et al. 2001). Pomocí této „low-technology" Jenkins et al. (1998) vyprodukovali 1 – 5.10^{12} konidií/ 1 kg substrátu. Latge et al. (1986) podle Wraight et al. (2001) uvádí, že u drobně sporulujícího kmene *Verticillium lecanii* dosáhli výtěžnosti 5.10^{12} blastospor/ 1 litr. V našem případě byly pro produkci vzdušných konidií použity plastové krabice (používané pro uskladnění potravin) nebo 120 l plastové sáčky a v případě produkce na umělé, tekuté živné půdě (PDB) bylo po sečtení produkce všech kmenů vyprodukováno množství blastosporové suspenze přesahující 11 tisíc litrů.

6.5. Persistence entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* po záměrné introdukci do půdy na pokusné lokalitě Žabčice u Brna

Cílem této studie bylo ověřit (pomocí morfologických a genetických markerů) schopnost entomopatogenní houby *B. bassiana* po její záměrné introdukci do půdy vytrvat za přirozených polních podmínek na pokusné, polní parcelce MZLU v Žabčicích u Brna, alespoň do dobu zahájení nové vegetační sezóny. Za tímto účelem byl z polyfaktoriálního hodnocení kmenů z jihočeského regionu selektován kmen M062 entomopatogenní houby *B. bassiana*, který v rámci hodnocených kmenů vykazoval optimální biologické, produkční a růstové parametry.

6.5.1. Monitoring entomopatogenních hub na pokusné lokalitě Žabčice u Brna realizovaný před (vstupní monitoring) a po (první monitoring) aplikaci kmene M062 (*B. bassiana*)

Před vlastní introdukcí kmene (pol. srpna) byla na pokusné lokalitě monitorována vysoká druhová diversita nejfrekventovanějších entomopatogenních hub (*M. anisopliae*, *P. lilacinus*, *B. bassiana*, *P. fumosoroseus*) s nejvyšší četností druhu *M. anisopliae*. Entomopatogenní houba *B. bassiana* byla na pokusné lokalitě detekována na 5 z 8 parcelek a to pouze pomocí GBM. Izolované „místní" kmeny entomopatogenní houby *B. bassiana*, byly později použity pro odlišení re-izolovaných kmenů po záměrné introdukci „nepůvodního" kmene. Následným monitoringem (7 týdnů od aplikace) byl prokázán jasný nárůst přítomnosti entomopatogenní houby *B. bassiana* na všech parcelkách (vyšší počet infikovaných larev na

Petriho misku nebo celkově vyšší počet CFU) při zachování druhové diversity. Přítomnost druhu *P. fumosoroseus* nebyla zjištěna naproti tomu byla zaznamenána přítomnost druhu *P. carneus* na 3 z 8 parcelek.

6.5.2. Hodnocení morfologické variability mezi introdukovaným kmenem M062, původními a re-izolovanými kmeny entomopatogenní houby *B. bassiana*

Pro ověření vytrvání kmene M062 v půdě s odstupem několika týdnů od jeho introdukce byly s tímto kmenem porovnány a statisticky vyhodnoceny rozdíly ve velikosti středových kultur re-izolovaných a původních kmenů. Vizuálním hodnocením morfologické struktury kultur kmenů byla potvrzena významná podobnost mezi aplikovaným a re-izolovanými kmeny, které byly ve středu kultury „kuželovitě" zašpičatělé a v poslední třetině kruhovitého obvodu paprskovitě členěné oproti různým morfologickým strukturám přirozeně se vyskytujícím nebo americkým (referenčním) kmenům. Ovšem ani statistické vyhodnocení jednoho faktoru (radiální růst) nebylo jednoznačným důkazem o vytrvání kmene na lokalitě. Samšiňáková at al. (1983) poznamenává, že v důsledku nedostatku charakteristických vlastností je téměř nemožné pouze pomocí morfologických znaků rozlišit individuální izoláty hub.

6.5.3. Hodnocení variability mezi původními a re-izolovanými kmeny entomopatogenní houby *B. bassiana* pomocí molekulárně genetické RAPD analýzy

Pro identifikaci anebo rozlišení kmenů entomopatogenních hub Bidochka (2001) popisuje a porovnává celou řadu různých biochemických a molekulárních metod. RAPD je jednou z těchto molekulárních metod, která byla použita při hodnocení variability mezi kmeny. Na základě předchozích zkušeností (viz. kapitol 6.3 resp. 5.3) byly pro RAPD analýzu vybrány tři primery poskytující malý počet dobře čitelných produktů. Na základě spektra rapidových fingerprintů byla stanovena nejvyšší míra podobnosti mezi aplikovaným kmenem M062 (poř. č. 7) a všemi re-izolovanými kmeny (č. 8 – 21). Původní (místní) kmeny druhu *B. bassiana* (M510, M512, M514, M517) izolované před vlastní aplikací se významně odlišovaly od introdukovaného kmene M062 s nejbližší mírou podobnosti k tomuto kmeni na úrovni 72 % u kmene M514 (poř. č. 4). Jak morfologické tak genetické markery potvrdily přítomnost introdukovaného kmene v půdě. Z výsledků RAPD analýzy však nevyplývá žádná souvislost mezi genetickou variabilitou a způsobem izolace kmenů.

6.5.4. Druhý monitoring entomopatogenních hub na pokusné lokalitě MZLU v Žabčicích u Brna od cílené introdukce kmene M062 (*B. bassiana*)

Druhým monitoringem po 8 měsících od aplikace (duben) byla prokázána vysoká přítomnost *B. bassiana* na pozemku především pomocí SM a.i. dodine ovšem přítomnost ostatních druhů se omezila pouze na entomopatogenní houbu *M. anisopliae*, která byla detekována na všech parcelkách pouze pomocí GBM.

6.5.5. Hodnocení variability mezi původními a re-izolovanými kmeny entomopatogenní houby *B. bassiana* pomocí molekulárně genetické RAPD analýzy

Na rozdíl od předcházející studie bylo pro hodnocení použito 16 primerů (zahrnujíc tři z předchozí studie). Kromě re-izolovaných kmenů z druhého odběru od aplikace byly do studie RAPD zahrnuty i dva kmeny (M519 a M565) z prvého odběru po aplikaci. Oproti předchozí RAPD analýze byla zaznamenána významně vyšší variabilita mezi re-izolovanými

kmeny (*B. bassiana*). Všechny kmeny byly rozděleny do dvou velkých bloků. Původní kmeny (M510, M512, M517) tvořily samostatnou skupinu v opačném bloku než byl soustředěn aplikovaný kmen s šesti re-izolovanými kmeny se vzájemnou podobností s aplikovaným kmenem na úrovni 98 %. Z prvého bloku, kde byl přítomen aplikovaný kmen M062, byl vyčleněn čtvrtý přirozeně se vyskytující kmen (M514). RAPD analýzou však nebyla potvrzena nejvyšší podobnost dvou kmenů (M519, M565) z prvého odběru po aplikaci. K tomuto zjištění Bidochka (2001) poznamenávají, že tato technika je sice relativně jednoduchá, není potřeba velkého množství DNA a houba nemusí být kultivována, ale přináší také potenciální problémy s reprodukovatelností. Ovšem Wang et al. (2004) porovnávali různé molekulární metody (mikrosatelitní markery, RAPD a RFLP) při hodnocení dvou re-izolovaných kmenů *B. bassiana* a zjistili, že výsledky byly u každé metody rozdílné. Na to konto dodávají, že pro získání přesných informací je nutné použít několik doplňujících molekulárních technik na rozdíl od 1 – 2 metod pro monitorování osudu biologického agens na pozemku. Závěrem by bylo možné říci, že podobnost re-izolovaných kmenů soustředěných v prvém bloku byla s aplikovaným kmenem M062 vysoká. Z toho bylo možné usuzovat na schopnost vneseného kmene koexistovat s přirozeně se vyskytujícími kmeny a udržet si životaschopnost za přirozených polních podmínek minimálně po dobu osmi měsíců (srpen – duben) od jeho aplikace do půdy. Dále vysoká podobnost re-izovaných kmenů s původním kmenem M510 (poř. č. 21) a kmenem M512 (poř. č. 22) v druhém bloku vede ke spekulacím, zda introdukcí kmene M062 (*B. bassiana*) nedošlo k podpoře některých přirozeně se vyskytujících kmenů enotomopatogenní houby *B. bassiana*.

Z výsledků modelové studie je zřejmé, že záměrně introdukovaný kmen M062 (*B. bassiana*) byl schopen vytrvat v půdě za přirozených polních podmínek, zvoleném způsobu (zádový postřikovač), době (konec vegetační sezóny) a dávce (5.10^9 konidií/ blastospor na $1m^2$) aplikace na pokusném polním pozemku minimálně do doby zahájení následné vegetační sezóny. Např. Kessler et al. (2003) zjistili při hodnocení doby aplikace a půdních faktorů na výskyt entomopatogenní houby *B. brongniartii* využívané v biologické ochraně proti larvám chrousta obecného (*Melolontha melolontha*) v půdě, že pro dosažení patřičné četnosti tohoto biologického agens v půdě je významná doba aplikace, kdy podmínky pro růst a sporulaci jsou vhodné. Dále zjistili, že teplota půdy je rozhodujícím faktorem, naproti tomu druh půdy hraje druhotnou roli pro vytrvání houby v půdě a spíše než půdní textura, mají pravděpodobně větší význam biotické faktory. Nízká přítomnost hostitele nebo nepřizpůsobení se kmene novému prostředí může mít za následek nízkou četnost vneseného kmene (*B. bassiana*) do půdy, uvažují Wang et al. (2004). Lze však říci, že výzkumy dokazují schopnost entomopatogenních hub vytrvat v půdě od několika měsíců (Vänninen et al. 2000) až po dobu několika let (Enkerli et al. 2004). Domnívám se, že pro budoucí monitorování záměrně re-introdukovaného autochtonního kmene entomopatogenní houby v integrované ochraně rostlin bude správná volba jedné nebo více identifikačních metod, nezbytných především pro zhodnocení jejího biologického účinku, ekonomického přínosu a nákladů, stejně tak případného vedlejšího efektu. Z tohoto důvodu bych pro budoucí výzkum přítomnosti entomopatogenní houby *B. bassiana* v půdě doporučil relativně novou, rychlou a zároveň i spolehlivou metodu, která využívá mikrosatelitních markerů.

7. ZÁVĚRY

První část disertační práce byla zaměřena na monitoring přirozeného výskytu entomopatogenních hub v orné půdě na území jihočeského regionu (se zaměřením na pole s obilovinou) a třech lokalitách (Smržice, Troubsko, Pěnčín) na území Moravy. Dílčí výsledky lze formulovat takto:

- Na základě výsledků z plošného monitoringu a dílčích monitoringů na území Moravy je možné konstatovat, že entomopatogenní houby jsou přirozenou součástí orné půdy v České republice. Přítomnost entomopatogenních hub (na poli s porostem obilovin) byla zjištěna v 95,6 % půdních vzorků a nejfrekventovanějším druhem byla entomopatogenní houba *P. lilacinus* (v 92,1 % půdních vzorků), *M. anisopliae* (67,8 %) a *B. bassiana* (15,6 %).
- Pomocí selektivního média s fungicidní složkou dodine (SM a.i. dodine) bylo možné u jednotlivých druhů entomopatogenních hub stanovit průměrnou četnost výskytu v hodnotě $2{,}6.10^3$ CFU/ 1ml půdního vzorku (*P. lilacinus*), $4{,}1.10^2$ CFU/ 1ml půdního vzorku (*M. anisopliae*), $1{,}4.10^2$ CFU/ 1ml půdního vzorku (*B. bassiana*) a minimální četnost výskytu u druhu *P. carneus* a *P. fumosoroseus*.
- Pro monitorování přítomnosti entomopatogenních hub v půdě je výhodné kombinovat obě izolační metody, protože druh *P. fumosoroseus* a *P. carneus* bylo možné detekovat pouze pomocí SM a.i. dodine ovšem *Galleria* bait method (GBM) se ukázala být citlivější metodou pro detekci druhu *B. basssiana* a *P. fumosoroseus*.
- Z výsledků nevyplývá žádná závislost mezi frekvencí výskytu nebo izolovaným druhem entomopatogenních hub a pěstovanou obilovinou.
- Z výsledků nelze ani jednoznačně stanovit hranici citlivosti u metody GBM vyjádřenou počtem CFU/ 1 ml půdy zjištěnou pomocí SM a.i. dodine.
- Následným monitoringem po velkoplošné aplikaci entomopatogenních hub na lokalitě Pěnčín nebylo prokázáno navýšení re-introdukovaného kmene Pe4 (*B. bassiana*) ani ostatních introdukovaných hub, zřejmě z důvodu nevhodně zvoleného způsobu aplikace.

Druhá část disertační práce byla zaměřena na polyfaktoriální hodnocení kmenů entomopatogenních hub pomocí „in vivo" a „in vitro" (bio)testů:

- Pomocí sady laboratorních (bio)testů bylo možné porovnat a následovně vybrat kmen(y) s optimálními růstovými, produkčními a biologickými vlastnostmi.
- Většina hodnocených kmenů entomopatogenních hub (*B. bassiana*, *M. anisopliae* a *P. fumosoroseus*) byla schopna dokončit svůj vývoj během 3 – 4 dnů. Nejrychlejší vývoj byl pozorován u kmenů druhu *B. bassiana*, které byly schopny dokončit vývoj během 48 – 72 hodin s průměrnou klíčivostí konidií 79 – 95,4 %.
- Největší nárůst středových kultur byl zaznamenán u kmenů *P. fumosoroseus* (v rozpětí od 36,6 do 50,6 mm) s průměrnou velikostí středové kultury 44,7 mm. Radiální růst byl menší u druhu *B. bassiana* (v průměru 31,9 mm) a *M. anisopliae* (v průměru 28,5).
- Mezi radiálním růstem a produkcí konidií u kmenů z jihočeského regionu byla zaznamenána negativní korelace, např. kmen M185 (*B. bassiana*) a kmen M076 (*M. anisopliae*) vykazovaly nejmenší velikost středové kultury, ale produkce konidií u těchto dvou kmenů patřila mezi nejvyšší – $4{,}40.10^7$ konidií/ 100 mm^2 (kmen M185) a $7{,}10.10^7$ konidií/ 100 mm^2 (kmen M076).

- Pomocí submerzní kultivace byla dosažena nejvyšší produkce blastospor ($1{,}19.10^9$ blastospor/ 1ml) u kmene M101 (*B. bassiana*). Naproti tomu minimální produkce blastospor v submerzní kultuře byla zaznamenána u druhu *M. anisopliae*, kde kmeny vytvářely převážně myceliální biomasu „kuličky".
- Všechny hodnocené kmeny vykazovaly dobré produkční parametry na přirozeném živném substrátu např. kmeny entomopatogenní houby *B. bassiana* izolované na lokalitě Troubsko vykazovaly produkci v rozpětí $7{,}00.10^6 - 4{,}63.10^8$ konidií/ 1 g krup
- Všechny hodnocené kmeny byly schopné dokončit vývoj na pupáriu molice skleníkové (*T. vaporariorum*) do 96 hodin s výjimkou jednoho kmene.
- Nejvhodnější pro hodnocení virulence kmenů *B. bassiana* vůči larvám zavíječe voskového (*G. mellonella*) se ukázala být doba po 96 hodinách od zahájení (bio)testu, kdy 14 z 22 kmenů dosáhlo 50 % mortality larev, ale jen u 8 kmenů byla zaznamenána vysoká virulence v rozpětí 80 – 90 % (s 15 – 20 % larev porostlých myceliem).

V samostatné kapitole disertační práce byla hodnocena variabilita kmenů *B. bassiana* izolovaných v jihočeském regionu pomocí RAPD analýzy:

- Na základě výsledku z RAPD analýzy nebyla zjištěna žádná korelace mezi variabilitou kmenů a místem (okresem) původu nebo virulencí kmenů k zavíječi voskovému.

Ve třetí části disertační práce byla především hodnocena kompatibilita kmenů s organominerálním hnojivem Beta-liq, které mělo být využito jako „nosič" hub při jejich záměrné introdukci do půdy. Součástí této části byla také studie zaměřená na velkoobjemové produkce entomopatogenních hub.

- Vstupní studie s koncentrační řadou (10 a 50 %) přípravku Beta-liq nevykazovala přesvědčivou kompatibilitu kmenů s tímto organominerálním hnojivem.
- Následná koncentrační řada (50, 70 a 90 %) přípravku Beta-liq prokázala vysokou kompatibilitu entomopatogenních hub s tímto nosičem.
- Na základě polyfaktoriálního hodnocení kmenů a jejich kompatibility s přípravkem Beta-liq byly vybrány dva kmeny s optimálními vlastnostmi – kmen M408 (*B. bassiana*) a kmen M394 (*M. anisopliae*). Tyto kmeny byly dále hodnoceny v poloprovozních podmínkách při kterých vykázaly pozitivní vliv v kombinaci s přípravkem Beta-liq na stimulaci produkce zelené hmoty u testovací plodiny a podporu mikrobiální činnosti při rozkladu posklizňových zbytků (data nejsou uvedena).
- (Bio)testem vývoje a klíčivostí konidií byla potvrzena životaschopnost kmenů (M408 a M394) po krátkodobém (14 denním) zamražení pro potřeby jejich transportu nebo krátkodobého skladování.
- V této části byla ověřena schopnost našeho pracoviště za daných (technických) podmínek vyprodukovat relativně velké množství infekčních propagulí. Nejproduktivnějším byl kmen I9 entomopatogenní houby *Lecanicillium lecanii*, s produkcí $1{,}22.10^9 - 8{,}76.10^8$ blastospor/ 1 ml a kmen Man P4 a průměrnou produkcí $1{,}17.10^9$ konidií/ 1 g krup.

Závěrečnou částí disertační práce byla modelová studie zaměřená na hodnocení perzistence záměrně introdukovaného kmene M062 entomopatogenní houby *B. bassiana* v půdě na lokalitě Žabčice u Brna. Tato část byla rozdělena na tři dílčí studie takto:

Vstupní monitoring entomopatogenních hub před cílenou aplikací (v pol. srpna) kmene M062 (*B. bassiana*)

- Na pokusné lokalitě byla monitorována vysoká druhová diverzita nejfrekventovanějších entomopatogenních hub (*M. anisopliae*, *P. lilacinus*, *B. bassiana* a *P. fumosoroseus*) s nejvyšší četností u druhu *M. anisopliae*.

První monitoring po 7 týdnech od záměrné introdukce kmene M062 (*B. bassiana*) a hodnocení perzistence kmene pomocí morfologických a genetických markerů.

- První monitoring prokázal zřejmý nárůst výskytu entomopatogenní houby *B. bassiana* na všech parcelkách při zachování druhové diverzity.
- Vizuální hodnocení morfologické struktury kultur kmenů naznačilo významnou podobnost mezi aplikovanými a re-izolovanými kmeny. Ovšem ani statistické vyhodnocení jednoho faktoru (radiální růst) nebylo jednoznačným důkazem o vytrvání kmene na lokalitě.
- Na základě spektra rapidových fingerprintů byla stanovena nejvyšší míra podobnosti mezi aplikovaným kmenem M062 a všemi re-izolovanými kmeny.

Druhý monitoring po 8 měsících od záměrné introdukce kmene M062 (*B. bassiana*) a hodnocení perzistence kmene pomocí genetických markerů.

- Druhý monitoring (duben) prokázal stále vysokou přítomnost druhu *B. bassiana* na zkoumané lokalitě. Přítomnost ostatních druhů nebyla zjištěna s výjimkou entomopatogenní houby *M. anisopliae*.
- Oproti předchozí RAPD analýze byla zaznamenána významně vyšší variabilita mezi re-izolovanými kmeny (*B. bassiana*). U šesti re-izolovaných kmenů byla prokázána 98 % podobnost s aplikovaným kmenem.
- Lze konstatovat, že aplikovaný kmen byl schopen koexistovat s místními kmeny minimálně po dobu 8 měsíců (od ukončení do zahájení vegetační sezóny).

8. SEZNAM LITERATURY

AIKI, R.K., ARNHEIM, N., ERLICH, H.A., 1985: A Novel Method for the Detection of Polymorphic Restriction Sites by Cleavage of Oligonucleotide Probes: Application to Sickle-Cell Anemia. Bio/Technology, 3: 1008-1012.

AINSWORTH, G.C., 1973: Introduction and keys to higher taxa, Vol. IV. A: 1-7, In: Ainsworth, G.C., Sarrrow, F.K., Sussman, A.S., (Eds.) The Fungi – An Advanced Treatise. Academic Press, New York.

ALI-SHTAYEH, M.S., MARA'I, A.B.M., JAMOUS, R.M., 2002: Distribution, occurrence and characterization of entomopathogenic fungi in agricultural soil in the Palestinian area. Mycopathologia 156: 235-244.

ALTRE, J.A., VANDENBERG, J.D., CANTONE, F.A., 1999: Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to diamondback moth, *Plutella xylostella*: Correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. Journal of Invertebrate Pathology, 73 (3): 332-338.

ANONYM 1, 2005: Biopesticidy a jejich uvádění do praxe v Británii a USA, vydáno 27.4.2005, Agronavigátor, ÚZPI, přejato: Grower, 2004, January 22, pp. 23-25; zdroj: http://www.agronavigator.cz/ekozem/default.asp?ch=94&typ=1&val=31480&ids=902

ANONYM 2, 2005: Budoucí potenciál biopesticidů, vydáno 10.4.2005, Agronavigátor, ÚZPI, přejato: Grower, 2005, 20 January, pp. 17; zdroj: http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=1&typ=1&val=34720&ids=117

ANONYM 3, 2007: The University of Adelaide, Australia. Mycology Online. *Beuveria bassiana*, zdroj: http://www.mycology.adelaide.edu.au/gallery/photos/beauveria1.html

ARKHIPOVA, V.D., 1965: Fungus diseases of the codling moth, *Carpocapsa pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). Entomol. Rev., 44: 432-435.

ASKARY H., BENHAMOU N., BRODEUR J. 1997: Ultrastructural and cytochemical investigations of the antagonistic effect of *Verticillium lecanii* on cucumber powdery mildew. Phytopathology, 87 (3): 359-368.

BAATH, E., 1991: Tolerance of copper by entomopathogenous fungi and the use of copperamended media for isolation of entomopathogenous fungi from soil. Mycological Research, 95: 1140-1142.

BAJAN, C., 1973: *Paecilomyces fumosoroseus* (WIZE) – pathogenic agent of Colorado beetle (*Letinotarsa decemlineata* Saz). Ekologia Poska, 24: 705-712.

BALAZY, S., 1965: Entomopathogenous fungi from the order Hyphomycetes damaging forest insects in Poland. Roczniki Wyzsj Szkoly Rolniczej to Poznamu, 27: 221-230.

BARBERCHECK, M.E., KAYA, H.K., 1990: Interactions between *Beauveria bassiana* and the entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis heliothidis*. Journal of Invertebrate Pathology, 55: 225-234.

BARBERCHECK, M.E., KAYA, H.K., 1991: Competitive Interactions Between Entomopathogenic Nematodes and *Beauveria bassiana* (Deutoeromycotina: Hyphomycetes) in Soilborne Larvae of *Spodoptera exigua*. Environmental Entomology, 20 (2):707-712.

BARKER, C.W., BARKER, G.M., 1998: Generalist entomopathogens as biological indicators of deforestation and agricultural land use impacts on waikato soils. New Zealand Journal of Ecology, 22 (2): 189-196.

BARNETT H.L. 1962: Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess Publishing Company, Minneapolis, 174.

BEDDING, R.A., AKHURST, R.J., 1975: A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. Nematologica, 21: 109-116.

BEILHARZ, V. C., PARBRRY, D. G., SWART, H. J., 1982: Dodine: A selective agent for certain soil fungi. Trans. British Mycol. Soc., 79: 507 – 511.

BERNHARD, K., HOLLOWAY, P.J., BURGES, H.D., 1998: Appendix I: A catalogue of formulation additives: function, nomenclature, properties and suppliers. In: Burges, H.D. (Eds.) Formulation of Microbial Biopesticides, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp. 333-365.

BERRETTA, M.F., LECUONA, R.E., ZANDOMENI, R.O., GRAU, O., 1998: Genotyping Isolates of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* by RAPD with Fluorescent Labels. Journal of Invertebrate Pathology, 71: 145-150.

BIDOCHKA, M.J., KASPERSKI, J.E., WILD, G.A.M., 1998: Occurence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and nearnorthern habitats. Canadian Journal of Botany, 76: 1198-1204.

BIDOCHKA, M.J., MENZIES, F.V., KAMP, A.M., 2002: Genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Beuveria bassiana* are associated with habitat and thermal growth preferences. Archives of Microbiology, 178 (6): 531-537.

BIDOCHKA, M.J., ST. LEGER, R.J., JOSHI, L., ROBERTS, D.W., 1995: The rodlet layer from aerial and submerged conidia of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* contains hydrophobin Mycological Research,99 (4): 403-406.

BIDOCHKA, M.J., ST. LEGER, R.J., ROBERTS, D.W., 1997: Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overwiew. In: Goettel, M.S., Johnson, D.L. (Eds), Microbial control of Grasshoppers and Locusts. Memoirs of the Entomological Society of Canada, 171: 213-224.

BIDOCHKA, M.J.,2001: Monitoring the Fate of Biocontrol Fungi. In: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.): Fungi as Biocontrol Agents – Progres, Problems and Potential. CABI Publishing, pp. 193-218.

BING, L.A., LEWIS, L.C., 1991: Suppression of *Ostrinia nubilalis* (Hüber) (Lepidoptera: Pyralidae) by endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. Environmental Entomology, 20: 1207-1211.

BOSCH, A., YANTORNO, O., 1999: Microcycle conidiation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* bals. (vuill.). Process Biochemistry 34: 707-716.

BOUCIAS, D.G., PENDLAND, J.C., 1984: Nutritionalrequirements for conidial germinatio of several host range pathotypes of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. Journal of Invertebrate Pathology, 43: 288-292.

BOUCIAS, D.G., PENDLAND, J.C., 1998: Principles of insect pathology. Kluwer Academic Publishers, Boston, Massachusetts.

BOUCIAS, D.G., PENDLAND, J.C., LATGE, J.P., 1988: Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. Applied and Environmental Microbiology, 54: 1795-1805.

BRIDGE, P.D., WILLIAMS, M.A.J., PRIOR, C., PAERSON, R.R.M., 1993: Morphological, biochemica and molecular characteistics of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. J. Gen. Mocrobiol., 139: 1163-1169.

BROWN, I.F., SISLER, H.D., 1960: Mechanism of fungitoxic action n-dodecylguanidine acetate. Phytopathology, 50: 830.

BRUCK, D.J., LEWIS, L.C., 2002: Rainfall and crop residue effects on soil dispersion and *Beauveria bassiana* spread to corn. Applied Soil Ecology, 20: 183-190.

BRUNS, T.D., WHITE, T.J., TAYLOR, J.W., 1991: Fungal molecular systematic. ANNUAL Reviews of Ecol. Syst-. 22: 525-564.

BURGES, H.D., JONES, K.A., 1998: Formulation of bacteria, viruses and protozoa to control insects. In: Burges, H.D. (Eds.) Formulation of Microbial Biopesticides. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp. 33-127.

BUTT, T.M., GOETTEL, M.S., 2000: Biooassays of Entomopathogenous Fungi. In: Navon A., Ascher K.R.S. (Eds.): Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. CAB International, Wallingford, UK, 95-140.

CABANILLAS, F., BARKER, K.R., DAYKIN, M.E., 1989: Histology of the interactions of *Paecilomyces lilacinus* with *Meloidogyne incognita* on tomato. Journal of Nematology, 20: 362-365.

CABRAL, J.P.S., 1991: Dmage to the cytoplamyc membrane and cell death caused by Dodine (dodecylguanidine monaoacetate) in *Pseudomonas syringae* ATCC 12271. Antimicrob. Agents Ch., 35: 341.

CAMMON, S.A., RATH, A.C., 1994: Separation of *Metarhizium anisopliae* strains by temperature dependent germination rates. Mycological Research, 98: 1253-1257.

CASTRILLO, L.A., BROOKS, W., 1998: Differentiation of *Beauveria bassiana* Isolates from the Darkling Beetle, *Alphitobius diaperinus*, Using Isozyme and RAPD Analyses. Journal of Invertebrate Pathology, 72: 190-196.

CASTRILLO, L.A., GRIGGS, M.H., VANDENBERG J.D., 2004: Vegetative compatibility groups in indigenous and mass-released strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: likelihood of recombination in the field. Journal of Invertebrate Pathology 86: 26-37.

CASTRILO, L.A., VANDENBERG, J.D., WRAIGHT, S.P., 2003: Strain-specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence-characterized amplified region markers. Journal of Invertebrate Pathology, 82: 75-83.

CERENIUS, L., THORNQUIST, P.O., VEY, A., JOHANSSON, M.W., SODERHALL, K., 1990: The effects of the fungal toxin destruxin E on isolated crayfish haemocytes. Journal of Insect Physiology, 6: 785-789.

CHANDLER, D., HAY, D., REID, A.P., 1997: Sampling and occurrence of entomopathogenic fungi and nematodes in UK soils. Appl. Soil Ecol., 5: 133-141.

CHARNLEY, A.K., 1997: Entomopathogenic Fungi and Their Role in Pest Control. In: Wicklow/Söderström (Eds.), The Mycota IV, Environmental and Microbial Relationships, Springer – Verlag Berlin Heidelberg 1997, pp. 185 – 201.

CHASE, A. R., OSBORNE, L. S., FERGUSON, V. M., 1986: Selective isolation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from an artificial potting medium. Florida Entomologist., 69: 285 – 292.

CLARK, T.B., KELLEN, W.R., FUKUDA, T., LINDEGREN, J.E., 1968: Field and laboratory studies of the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. Journal of Invertebrate Pathology, 11: 1-7.

COOK, R.J., BRUCKART, W.L., COULSON, J.R., GOETTEL, M.S., HUMBER, R.A., LUMSDEN, R.D., MADDOX, J.V., McMANUS, M.L., MOORE, L., MEYER, S.F., QUIMBY, P.C., STACK, J.P. VAUGHN, J.L., 1996: Safety of microorganisms for pest and plant disease control: a framework for scientific evaluation. Biological Control, 7: 333-351.

COSTA, G.L., SARQUIS, M.I.M., MORAES, A.M.L., BITTENCOURT, V.R.E.P., 2001: Isolation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from *Boophilus microplus* tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro state, Brazil. Mycopathologia, 154: 207-209.

CRAVANZOLA, F., PIATTI, P., BRIDGE, P.D., OZINO, O.I., 1997: Detection of genetic polymorphism by RAPD-PCR in strains of the entomopathogenic fungu *Beauveria brongniartii* isolated from the European cockchafer (*Melolontha* spp.). Letters in Applied Microbiology, 25: 289-294.

CUPERUS, G.W., MULDER, P.G., ROYER, T.A., 2000: Implementation of Ecologically-Based IPM. In:Rechcigl J.E. (Eds.), Rechcigl N. A.: Insect Pest Management, Techniques for Environmental Protection. LEWIS Publishers, pp. 172-198.

CURRY, A.N., 1962: Translocation and metabolism of dodecylguanidine acetate (dodine) fungicide in apple, using C^{14} radiotagged dodine. J. Agric. Food Chem., 19: 13.

DEACON J.W. 1983: Microbial control of plant pests and diseases. In: Van Reinhold N. (Ed.): Aspects of Microbiology. Co. Ltd., Wokingham, England, 31-42.

DEVI, K.U., PADMAVATHI, J., SHARMA, H.C., SEETHARAMA, N., 2001: Laboratory evaluation of the virulence of *Beauveria bassiana* isolates to the sorghum shoot borer *Chilo partellus* Swinhoe (Lepidoptera: Pyralidae) and their characterization by RAPD-PCR. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 17: 131-137.

DEVI, K.U., SRIDEVI, V., MOHAN, CH.M., PADMAVATHI J., 2005: Effect of high temperature and water stress on in vitro germination and growth in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. Journal of Invertebrate Pathology 88: 181-189.

DOANE, C., 1959: *Beauveria bassiana* as a pathogen of *Scolytus multistriatus*. Annales of the Entomological Society of America, 52: 109-111.

DOBERSKI, J.W., 1981: Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle Scolytus scolytus: Effect of temperature and humidity on infetion by *Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. Journal of Invertebrate Pathology, 37: 195-200.

DOMSCH, K.M., GAMS, W., ANDERSON, T.H., 1980: Compendium of soil fungi. Vol. 1. Academic Press, New York, pp. 859.

DORTA, B., ARCAS, J., 1998: Sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-state fermentation with forced aeration. Enzyme and Microbial Technology 23, 501-505.

DRIVER F., MILNER R.J. 1998: PCR Applications to the Taxonomy of Entomopathogenic Fungi. *In:* Bridge P.D., Arora D.K., Reddy C.A., Elander R.P. (Eds.): Applications of PCR in Mycology. CAB International, Wallingford, UK, 153-186.

DRIVER F., MILNER R.J., TRUEMAN J.W. 2000: A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. Mycological Research, 104 (2): 134-150.

DROMPH, K.M., VESTERGAARD, S., 2002: Pathogenicity and attractiveness of entomopathogenic hyphomycete fungi to collembolans. Applied Soil Ecology, 21: 197-210.

DUFOUR R., 2001: Biointensive integrated pest management (IPM). Attra, [cit. 2005-05-13], available on http://attra.ncat.org/attra-pub/PDF/ipm.pdf

DUMAS, C., MATHA, V., QUIOT, J.M., VEY, A., 1996: Effects of destruxins, cyclic depsipeptide mycotoxins, on calcium balance and phosphorylation on intracellular proteins in lepidopteran cell lines. Comparative Biochemistry and Physiology, 114 C: 213-219.

EKESI, S., MANIANIA, N.K., AMPONG-NYARKO, K., 1999: Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. Biocontrol Sci. Technol. 9: 177-185.

ENDRYCHOVÁ, V., 2004: Využití technik molekulárních markerů na modelových skupinách hub. Zemědělská fakulta, JU v Českých Budějovicích (disertační práce), České Budějovice, 28-31.

ENKERLI, J., WIDMER, F., GESSLER, C., KELLER, S., 2001: Strain-specific microsatellite markers in the entomopathogenic fungus *Beaueria brongniartii*. Mycol. Res. 105 (9): 1079-1087.

ENKERLI, J., WIDMER, F., KELLER, S., 2004: Long-term field persistence of *Beauveria brongniartii* strains applied as biocontrol agents against European cockchafer larvae in Switzerland. Biological Control, 29: 115-123.

EYAL, J., MABUD, M.A., FISCHBEIN, K.L., WALTER, J.F., OSBORNE, L.S., LANDA, Z., 1994: Assessement of *Beauveria bassiana* Nov EO-1 (ATCC 74037), which produces a red pigment for microbial control. Appl. Biochem. Biotechn., 44: 65-80.

FARGUES, J., 1976: Specificité des champignons pathogenes imparfaits (Hyphomycetes) pour les larves de coleopteres (Scarabaeidae et Chrysomelidae). Entomophaga, 21: 313-323.

FARGUES, J., BON, M.C., 2004: Influence of temperature preferences of two *Paecilomyces fumosoroseus* lineages on their co-infection pattern. Journal of Invertebrate Pathology, 87: 94-104.

FARGUES, J., GOETTEL, M.S., SMITS, N., OUEDRAOGO, A., VIDAL, C., LACEY. L.A., LOMER, C.J., ROUGIER, M., 1996: Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. Mycopathologia 135, 171-181.

FARGUES, J., LUZ, C., 2000: Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on sporulation of *Beauveria bassiana* on cadavers of *Rhodnius prolixus*. Biocontrol Science and Technology 8: 323-334.

FARGUES, J., OUEDRAOGO, A., GOETTEL, M.S., LOMER, C.J., 1997: Effects of temperature, humidity and inoculation method on susceptibility of *Schistocerca gregaria* to *Metarhizium flavoviride*. Biocontrol Science and Technology, 7: 345-356.

FARGUES, J., REMAUDIERE, G., 1977: Considerations on the specificity of entomopathogenic fungi. Mycopathologia, 62: 31-37.

FARGUES, J., SMITS, N., VIDAL, C., VEY, A., VEGA, F., MERCADIER, G., QUIMBY, P., 2002: Effect of liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity of the Hyphomycete, *Metarhizium flavoviride*. Mycopathologia, 154: 127-138.

FASSATIOVÁ, O., 1979: Plísně a vláknité houby v technické mirobiologii. SNTL, Praha, pp. 211.

FENG, M.G., POPRAWSKI, TJ., KHACHATOURIANS, G.C., 1994: Production, formulation and appliacation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: Current status. Biocontrol Science and Technoloy, 4: 3-34.

FERNANDES, P.M., MAGALHAES, B.P., ALVES, S.B., ROBERTS, D.W., 1989: Effects of physical and biological factors on the conidiogenesis and survival of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Inside cadavers of *Ceotoma arcuata* (Oliver, 1791) (Coleoptera: Chrysomelidae). Anais da Sociedade Entomologica do Brasil., 18: 147-156.

FERRON, P., 1967: Etude en laboratoire des conditions ecologiques favorisant le developpement de la mycose a *Beauveria tonella* du ver blanc. Entomophaga, 12: 257-293.

FERRON, P., 1978: Biological control of insect pests by entomogenous fungi. Annual Review of Entomology, 23: 409-442.

FERRON, P., 1981: Pest control by the fungi Beauveria and Metarhizium. In: Burges, H.D. (Eds.) Microbial control of pests and plant diseases. Academic New York, pp. 465-482.

FRANCO J., JATALA P., BOCANGEL M. 1981: Efficacy of *Paecilomces lilacinus* as a biological agent of *Globodera pallida.* Journal of Nematology, 13 (4): 438-439.

FUXA, J.R., 1987: Ecological considerations for the use of entmopathogens in IPM. Annu. Rev. Entomol., 32: 225-251.

FUXA, J.R., TANADA, Y., 1987: Epizootiology of Insect Diseases. Wiley-Interscience, New York.

GARDNER, W.A., STOREY, G.K, 1985: Sensitivity of *Beauveria bassiana* to selected herbidides. J. Econ. Entomol., 78: 1275-1279.

GARDNER, W.A., SUTTON, R.M., NOBLET, R., 1977: Persistence of *Beauveria bassiana*, *Nomuraea rileyi*, and *Nosema necatrix* on soybean foliage. Environmental Entomology, 6: 616-618.

GARRETT, S. D., 1963: Soil fungi and soil fertility. New York, 165 pp.

GAUGLER, R., COSTA, S.D., LASHOMB, J., 1989: Stability and efficacy of *Beauveria bassiana* soil inoculations. Environmental Entomology, 18: 412-417.

GOETTEL M.S., INGLIS G.D., 1997: Fungi: Hyphomycetes *In:* Lacey L.A. (Ed.): Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, London, Chapter V-3, 210-250.

GOETTEL, M.S., HAJEK, A.E., SIEGEL, J.P., EVANS, H.C., 2001: Safety o Fungal Biocontrol Agents. In: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.): Fungi as Biocontrol Agents – Progres, Problems and Potential. CABI Publishing, pp. 347-384.

GOETTEL, M.S., ROBERTS, D.W., 1992: Mass production, formulation and field application of entomopathogenic fungi. In: Lomer, C.J., Prior, C., (Eds.): Biological Control of Locusts and Grasshoppers. CAB International, Wallingford, UK, pp. 230-238.

GOTTEL, M.S., INGLIS, G.D., WRAIGHT, S.P., 2000: Fungi. In: Lacey L.A., Kaya H.K (Eds.), Field Manual of Techiques in Invertebrate Pathology, Chapter IV-4, Kluwer Academic Publishers, Printed in the Netherlands 2000, pp. 255-282.

GRANT, D., SHOEMAKER, R., 1997: Molecular hybridization. In: Caetano-Anollés, G., Gresshoff, P.M. (Eds.): DNA markers: a global overview. In: Caetano-Anolés, G., Gresshoff, P.M. (Eds.): DNA markers. Protocols, Applications, and Overviews. Wiley-Liss, Inc., New York, pp. 15-26.

HAJEK, A.E., ST. LEGER, R.J., 1994: Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Annual Review of Entomology., 39: 293-322.

HAJEK, A.E., ST. LEGER, R.J., 1994: Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Anu. Rev. Entomol., 39: 293-322.

HALL R.A. 1976: A bioassay of the pathogenicity of *Verticillium lecanii* on the aphid, *Macrosiphoniella sanborni*. Journal of Invertebrate Pathology, 27: 41-48.

HALL R.A. 1981: The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. In: Burges H.D. (Ed.): Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. Academic Press, London, 483-498.

HALL R.A. 1985: Whiteflie control with fungi. *In:* Hussey N.W., Scopes N. (Eds.): Biological test control – the greenhouse experience. Cornell University Press, Ithaca, New York, 116-118.

HALSWORTH, J.E., MAGAN, N., 1999: Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. Journal of Invertebrate Pathology, 74: 261 – 266.

HARAŠTOVÁ, M., 2003: Application of genetic markers in wild plant populations & their use for population genetics and biosystematics questions. University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Agriculture (PhD Thesis), České Budějovice, pp 108.

HEDGECOCK, S., MOORE, D., HIGGINS, P.M., PRIOR, C., 1995: Influence of moisture content on temperature tolerance and storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in an oil formulation. Biocontrol Science and Technology, 5: 371-377.

HODDLE M.S. 2004: Biological control of whiteflies ornamental crops. *In:* Heinz K.M., van Driesche R.G., Parrella P. (Eds.): Biocontrol in protected culture. Ball Publishing, Batavia, 149-170.

HOOG, G.S., GUARRO, J., GENÉ, J., FIGUERAS, M.J., 2000: Atlas of clinical fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, pp. 801-802.

HORŇÁK, P., 2004: Monitoring přirozeného výskytu entomopatogenních hub v půdních ekosystémech. Zemědělská fakulta, JU v Českých Budějovicích (disertační práce), České Budějovice, 25-37.

HRDÝ, I., BÍROVÁ, H., HAVELKA, J., MAREC, F., MRÁČEK, Z., LANDA, V., SEHNAL, F., SOLDÁN, T., WEISER, J., ZACHARDA, M., VRKOČ, J., PLÍVA, J., PULTAR, O., VESELÝ, D., 1991: Biopesticidy v zemědělství. Praha, květen 1991, s. 40 – 41.

HUMBER R.A. 1997: Fungi: Identification. *In:* Lacey L.A. (Ed.): Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, London, Chapter V-1: 153-185.

HUMBER, R.A., 1992: Collection of entomopathogenic fungal cultures: catalog of strains. Publ. No. ARS-110. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Beltsville, Md.

HUNT, D.W.A., BORDEN, J.H., RAHE, J.E., 1984: Nutrient-mediated germination of *Beauveria bassiana* conidia on the integument of the bark beetle *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae). Journal of Invertebrate Pathology, 44: 304-314.

HYWEL-JONES, N.L., GILESPIE, A.T., 1990: Effect of temperature on spore germination in *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. Mycological Research, 94: 389-392.

IGNOFFO, C.M., 1992: Environmental factors affecting persistance of entomopathogens. Florida Entomol., 75 (4): 516-524.

IGNOFFO, C.M., GARCIA, C., 1994: Antioxidant and oxidative enzyme effects on the inactivation of inclusion bodies of the *Heliothis baculovirus* by simulated sunlight-UV. Environmental Entomology, 23 (4): 1025-1029.

INCH, R., 1988:"Growth and Blastospore formation by Paecilomyces fumosoroseus and pathogen of brown planthopper". Trans. Br. Mycol. Soc., 87 (2): 215-222.

INGLIS, G.D., GOETTEL, M.S., BUTT, T.M., STRASSER, H., 2001: Use of Hyphomycetes fungi for maniging Insect Pests. In: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.): Fungi as Biocontrol Agents – Progres, Problems and Potential. CABI Publishing, pp. 23-69.

INGLIS, G.D., GOETTEL, M.S., JOHNSON, D.L., 1993: Persistence of the entomopathogenic fungus, beauveria bassiana, on phylloplanes of crested wheatgrass and alfalfa. Biological Control, 3: 258-270.

INGLIS, G.D., GOETTEL, M.S., JOHNSON, D.L., 1995: Influence of ultraviolet light protectants on persistance of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. Biological Control 5, 581-590.

INGLIS, G.D., JOHNSON, D.L., GOETTEL, M.S., 1997: Effects of temperature and sunlight on mycosis (*Beauveria bassiana*) (Hyphomycetes: Sympodulosporae) of grasshoppers under field conditions. Environmental Entoomology, 26: 400-409.

INNIS, M.A., GELFAND, D.H., 1990: Optimization of PCRs. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J (Eds.): PCR Protocols; Academic Press, New York.

JACOBS, H., GRAY, S.N., CRUMP, D.P., 2003: Interactions between nematophagous fungi and consequences for their potential as biological agents for the control of potato cyst nematodes. Mycol. Res., 107: 47-56.

JATALA, P., 1982: Biological control of nematodes. Universidad de lima, Perú.

JATALA, P., 1986: Biological control of plant-parasitic nematodes. Ann. Rev. Phytopathol. 24, 453-489.

JENKINS, N.E., HEVIEFO, G., LANGEWALD, J., CHERRY, A.J., LOMER, CH.J., 1998: Developement of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. BiocontrolNews and Information, 19 (1): 21-31.

JENKINS, N.E., PRIOR, C., 1993: Growth and formation of true conidia by *Metarhizium flavoviride* in a simple liquid medium. Mycological Research 97, 1489-1494.

KAMP, A.M., BIDOCHKA, M.J., 2002: Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. Letters in Applied Microbiology, 35: 74-77.

KARP, A., EDWARDS, K.J., 1997: DNA markers: a global overview. In: Caetano-Anolés, G., Gresshoff, P.M. (Eds.): DNA markers. Protocols, Applications, and Overviews. Wiley-Liss, Inc., New York, pp. 1-13.

KELLER, S., KESSLER, P., SCHWEIZER, C., 2003: Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metharhizium anisopliae*. *Biocontrol*, 48 (3): 307-319.

KELLER, S., ZIMMERMANN, G., 1989: Mycopathogens of soil insects. In: Wilding, N., Collins, N.M., Hammond, P.M., Webber, J.F. (Eds.), Insect-Fungus Interactions. Academic Press, London, pp. 239-270.

KERRY, B.R., KIRKWOOD, I.A., DELEIJ, F.A.A., BARBA, J., LEIJDENS, M.B., BROOKES, P.C., 1993: Growth and survival of *Verticillium chlamydosporium* Goddard, a parasite of nematodes, in soil. Biocontrol Science and Technology, 3: 355-365.

KESSLER, P., MATZKE, H., KELLER, S. 2003: The effect of application time and soil factors on the occurrence of *Beauveria brongniartii* applied as a biological control agent in soil. Journal of Invertebrate Pathology, 84: 15-23.

KIEWNICK, S., SIKORA, R.A., 2003: Efficacy of *Paecilomyces lilacinus* (strain 251) for the control of root-knot nematodes. Commun. Appl. Biol. Sci. 68: 123-128.

KLEESPIES, R., BATHON, H., ZIMERMANN, G., 1989: Untersuchungen zum natürlichen Vorkommen von entomopathogenen Pilzen und Nematoden in verschiedenen Böden in der Umgebung von Darmstadt. Gesunde Pflanzen, 41: 350 – 355.

KLEESPIES, R.G., ZIMMERMANN., G., 1992: Production of blastospores by three strains of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorok. in submerged culture. Biocontrol Science and Technology, 2: 127-135.

KLINGEN, I., EILENBERG, J., MEADOW, R., 2002: Effects of a farming system, field margins and bait insect on the occurrence of insect pathogenic fungi in soils. Agr. Ecosyst. Environ., 91 (1-3): 191-198.

KŘEN, J., NEUDERT, L., LUKAS, V., 2005: How to use information about soil characteristics. International Conference ISTRO „Soil – Agriculture, Environment, Landscape", 29th June – 1st July 2005, Section I, pp. 391-398.

KRUEGER, S.R., ROBERTS, D.W., 1997: Soil Treatment with Entomopathogenic Fungi for Corn Rootworm (Diabrotica spp.) Larva Control. Biological Control, 9: 67-74.

KUMAR V., SINGH G.P., BABU A.M., AHSAN M.M., DATTA R.K. 1999: Germination, penetration, and invasion of *Beauveria bassiana* on silkworm, *Bombyx mori*, causing white muscardine. Italian Journal of Zoology, 66 (1): 39-43.

LANDA Z., 2002: Biologická ochrana zahradních rostlin proti chorobám a škůdcům v polních podmínkách, ve sklenících a fóliovnících. In: Demo M., Hričovský I. (Eds.): Trvalo udržateľné technológie v záhradnictve. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 225-280.

LANDA, Z., 1994: Entomopatogenní houby v biologické ochraně rostlin (habilitační práce). ZF JU, České Budějovice, pp. 14 – 50.

LANDA, Z., 1998: Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub, ZF JU, České Budějovice, Agro, 4, 10: 7 – 12.

LANDA, Z., HORŇÁK, P., CHARVÁTOVÁ, H., OSBORNE, L.S., 2002: Distribution, occurrence and potential use of entomopathogenic fungi in arable soils in Czech Republic. In: Proceedings of International Conference ISTRO "Current Trends in the Research of Soil Environment", held in Brno, CR, October 2-5th 2002, pp. 195-201

LANDA, Z., JIRANOVÁ, R., 1988: A laboratory improvement of entomopathogenic fungi and use of selected strains in IPM programme for greenhouse cucumbers. Annual Report Agric. University, České Budějovice, pp. 95.

LANDA, Z., KUBÍČEK, J., HORŇÁK, P., BOHATÁ, A., OSBORNE, L.S., 2005: Entomopathogenic fungi in soil – natural components of biointensive IPM. International Conference ISTRO „Soil – Agriculture, Environment, Landscape", 29th June – 1st July 2005, Section III, pp. 281-288.

LANDA, Z., OBORNÍK, M., 1997: Entomopatogenní houby. Sborník konference „Současný stav a perspektivy biologické ochrany rostlin – Praha 20. 11. 1997, Česká spol. rostlinolékařská, pp. 7-12.

LANDA,Z., BIELIKOVÁ L., OSBORNE L.S., BOBKOVÁ P., 2001: Assessment of isolates of entmogenous fungi collected from spruce bark beetle *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae) in the Bohemian Forest. Silva Gabreta, 6: 273-286.

LATCH, G.C.M., FALLON, R.E., 1976: Studies on the use of *Metarhizium anisopliae* to control *Oryctes rhinoceros*. Entomophaga, 21: 39-48.

LATGE, J.P., HALL, R.A., CABRERA, R.I., KERWIN, J.C., 1986: Liquid fermentation of entomopathogenic fungi. In: Samson, R.A., Vlak, J.M., Peters, D. (Eds.): Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology. Foundation of the Fourth International Colloquium of Invertebrate Pathology, Wageningen, the Netherlands, pp. 603-606.

LEITTGEB, S., VOŠTA, J., 1988: Mikrobiologie. Agronomická fakulta, Vysoká škola zemědělská, Praha, pp.125 – 189.

LELAND, J.E., 2001: Environmental-stess tolerant formulations of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* for control of African Desert Locust (*Schistocerca gregaria*). Ph.D. Thesis. Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University.

LI, D.P., HOLDOM, D.G., 1995: Effect of nutrients on colony formatin, growth, and sporulatin of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Journal of Invertebrate Pathology, 65: 253-260.

LINGG, A.J., DONALDSON, M.D., 1981: Biotic and abiotic factors affecting stability of *Beauveria bassiana* conidia in soil. Journal of Invertebrate Pathology., 38: 191-200.

LIU, H., SKINNER, M., BROWNBRIDGE, M., PARKER, B.L., 2003: Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). Journal of Invertebrate Pathology, 82: 139-147.

LIU, Y.T., SUI, M.J., JI, D.D., WU, I.H., CHOU, C.C., CHEN, C.C. 1993a: Protection from ultraviolet irradiation by melanin of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis. Journal of Invertebrate Pathology 62, 131-136.

LIU, Z.Y., MILNER, R.J., McRAE, C.F., LUTTON G.G., 1993b: The use of dodine in selective media for isolation of *Metarhizium* spp. From soil., Journal of Invertebrate Pathology., 62: 248-251.

LUZ, C., FARGUES, J., 1997: Temperature and moisture requirements for conidial germination of an isolate of *Beauveria bassiana*, pathogenic to *Rhodnius prolixus*. Mycopathologia, 138: 117-125.

LUZ, C., TIGANO, M.S., SILVA, I.G., CORDERIO, C.M., AIJANABI, S.M., 1998: Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 93: 839-846.

MALSAM, O., KILIAN, M., OERKE, E.C., DEHNE, H.W., 2002: Oils for Increased Efficacy of *Metarhizium anisopliae* to Control Whiteflies. Biocontrol Science and Technology, 12: 337-348.

McCOY, C.W., QUINTELA, E.D, FARIA, M.R., 2002: Environmental persistence of entomopathogenic fungi. In: Baur, M.E., Fuxa, J.R. (Eds.): Factors affecting the survival of entomopathogens. Southern Cooperative Series Bulletin 400.

McCOY, C.W., SAMSON, R.A., BOUCIAS, D.H., 1988: Entomogenous fungi, pp151-236. In: Ignoffo C. M., (Eds.) CRC Handbook of Natural Pesticides. CRC Press, Boca Raton, Vol. 5, A.

MEYLING, N.V., EILENBERG, J., 2006: Occurrence and distribution of soil borne entomoathogenic fungi within a single organic agroecosystem. Agriculture, Ecosystems and Environment, 113: 336-341.

MIETKIEWSKI, R., MIETKIEWSKA, Z., 1993: Occurrence of entomopathogenic fungi in arable soils. Acta Mycologica, 28, 1:77-82.

MIETKIEWSKI, R., TKACZUK, C., ZUREK, M., GEEST, L.P.S., 1994: Temperature requirements of four entmopathogenic fungi. Act. Mycol., 1: 109-120.

MIETKIEWSKI, R.T., PELL, J.K., CLARK, S.J., 1997: Invfluence of pesticide use on the natural occurrence of entomopathogenic fungi in arable soils in the UK: field and laboratory comparisons. Biocontrol Sci. Technol., 7: 655-575.

MILNER, R.J., HUPPATZ, R.J., SWARIS, S.C., 1991: A new method for assessment of germination of *Metarhzium* conidia. Journal of Invertebrate Pathology, 57: 121-123.

MILNER, R.J., LUTTON, G.G., 1976: *Metarhizium anisopliae*: Survival of conidia in soil. In:Proceedings of the 1st International colloquium on invertebrate pathology, pp. 428-429. Kingston, Canada.

MIRANPURI, G.S., KHACHATOURIANS, G.G., 1991: Infection sites of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the mosquito Aedes aegypti. Entomologia Experimentalis et Applicata, 59:19-27.

MITCHELL, D.J., KANNWISCHER-MITCHELL, M.E., DICKSON, D.W., 1987: A semi-selective medium for the isolation of *Paecilomyces lilacinus* from soil. Journal of Nematology, 19: 255-256.

MITJANS, M., VINARDELL, M.P., 1999: Hematological and biochemical parameters in the rat following subchronic oral administration of dodine (n-dodecylguanidine acetate). Pesticide Biochemistry and Physiology, 65: 151-159.

MOORE, D., BRIDGE, P.D., HIGGINS, P.M., BATEMAN, R.P., PRIOR, C., 1993: Ultra-violet radiation damege to *Metarhizium flavovididae* conidia and the protection given by vegetable and mineral oil and chemical sunsreens. Ann. Appl. Biol., 122: 605-616.

OBORNÍK, 1995: Molecular characterization and phylogeny of entomopathogenic fungi. Doctoral thesis. Jihočeská univerzita ZF, České Budějovice.

OGARKOVA, G.R., OGARKOV, B.N., 1986: Occurrence and distribution of entomogenous fungi in forest and agricultural biocoenoses. Mikol. Fitopatol., No. 20 pp. 170-175.

OLD, K.M., ROBERTSON, W.M., 1970: Growth of bacteria within lysing fungal conidia in soil. Trans. Brit. Mycol. Soc., 54: 337-341.

OSBORNE, L.S., LANDA, Z., 1992: Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. Florida Entomologist, Vol. 75, No. 4: 456-471.

OUEDRAOGO, A., FARGUES, J., GOETTEL, M.S., LOMER, C.J., 1997: Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. Mycopathologia, 137: 37-43.

OZINO, O.I., PIATTI, P., CRAVANZOLA, F., 1998: RAPD-PCR for the Molecular Characterization of *Beauveria brongniartii* Isolates Useful as Biocontrol Agents of the European Cockchafer *Melolontha melolontha*. In: Bridge, P., Couteaudier, Y., Clarkson, J. (Eds.): Molecular Variability of Fungal Pathogens. CAB International, pp. 220-232.

PAPIEROK, B., HAJEK, A.E., 1999: Fungi – Entomophthorales. In: Lacey L. A. (Eds.): Manual of techniques in insect pathology, Academic Press, Chapter V-2: 188-212.

PARKER, B.L., SKINNER, M., COSTA, S.D., GOULI, S., REID, W., BOUHSSINI, M.E., 2003: Entomopathogenic fungi of *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleriadae): collection and characterization for development. Biological Control, 27: 260-272.

PELL, J.K., EILENBER, G.J., HAJEK, A.E., STEINRAUS, D.C., 2001: Biology, ecology and pest management potential of Entomophthorales. In: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.): Fungi as Biocontrol Agents – Progres, Problems and Potential. CABI Publishing, pp. 71-153.

PEREIRA, R.M. & ROBERTS, D.W., 1991: Alginate and cornstarch mycelial formulations of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Journal of Economic Entomology, 84, (6): 1657-1661.

PIATTI, P., CRAVANZOLA, F., BRIDGE, P.D., OZINO, O.I., 1998: Molecular characterization of *Beauveria brongniartii* isolates obtained from *Melolontha melolontha* in Valle d'Aosta (Italy) by RAPD-PCR. Letters in Applied Microbiology, 26: 317-324.

POPRAWSKI, T.J., MARCHAL, M., ROBERT, P.H., 1985: Comparative susceptibility of *Otiorhynchus sulcatus* and *Sitona lineatus* (Coleoptera: Curculionidae) early stages to five entomopathogenic Hyphomycetes. Environmental Entomology, 14: 247-253.

RAMOSKA, W.A., 1984: The influence of relative humidity on *Beauveria bassiana* infectivity and replication in the chinch bug *Blissus leucopterus*. Journal of Invertebrate Pathology, 43: 389-394.

RATH, A.C., KOEN, T.B., YIP, H.Y., 1992: The influence of abiotic factors on the distribution and abundance of *Metarhizium anisopliae* in Tasmanian pasture soils. Mycol. Res., 96: 378-384.

ŘEPOVÁ, A., 1985: Půdní mikroskopické houby a jejich ovlivnění herbicidy (kandidátská disertační práce), Katedra botaniky nižších rostlin, Přírodovědecká fakulta UK Praha, pp. 12-7.

ROBERTS, D.W., CAMPBELL, A.S., 1977: Stability of entomopathogenic fungi. Miscellaneous Publications of the Entomological Society of america, 10: 19-76.

RODDAM, L.F., RATH, A.C., 1997: Isolation and characterization of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* from subantarctic Macquarie Island. Journal of Invertebrate Pathology, 69: 285-288.

ROMBACH, M.C., 1989: Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina, Hyphomycetes) sympoduloconidia in submerged culture. Entomophaga, 34: 45-52.

ROY, H.E., PELL, J.K. 2000: interactions between entomopathogenic fungi and other natural enemies: Implications for biological control. Biocontrol Science and Technology, 10: 737-752.

RUMBOS, CH.I., KIEWNICK, S., 2006: Effect of plant species on persistence of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 in soil and on root colonization by the fungus. Plant and Soil, 283: 25 – 31.

SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., ERICH, H.A., 1988: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerace. Science, 239: 487-491.

SAMEC, P., 1993: DNA polymorphism and RAPD Technology. Genetika a Šlechtění, 29: 291-320.

SAMŠIŇÁKOVÁ, A., KÁLALOVÁ, S., FASSATIOVÁ, O., 1983: Morfologické srovnání některých enotmofágních hub rodu Beauveria, Paecilomyces, Tolypocladium a Culicinomces. – Ochrana rostlin, 19: 195 – 204.

SAMSON, R.A., 1974: *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. Studies in Mycology, 6: 1-119.

SAMSON, R.A., EVANS, H.C., LATGÉ, J.P., 1988: Atlas of Entomopathogenic fungi. Springer Berlin Heidelberg, New York, 187 pp.

SAMSON, R.A., ROMBACH, M.C., 1985: Biology of the fungi *Verticillium* and *Aschersonia*, pp. 32-42. In: Hussey, N.W., Scopes, N. (Eds.), Biological pest control – the glasshouse experience. Cornell University Press, Ithaca, New York.

ŠANTRŮČKOVÁ, H., 1993: Mikrobiální biomasa jako ukazatel biologické aktivity půdy. Rostlinná výroba, 39: 779-788.

SHAW, F.R., 1959: The effects of field applications of some of the newer pesticides on honey bees. Journal of Economic Entomology, 54: 549.

SHI W.B., FENG M.G. 2004: Lethal effect of *Beauveria bassiana, Melarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces fumosoroseus* on the eggs of *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) with a description of a mite egg bioassay systém. Biological Control, 30 (2): 165-173.

SHIMAZU, M., SATO, H., 1996: Media for Selective Isolation of and Entomogenous Fungus, Beauveria bassiana (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Appl. Entomol. Zool., 31 (2): 291-298.

SIDDIQUI Z.A., MAHMOOD I. 1994: Culture of *Paecilomyces lilacinus* on leaf extracts and leaf residues for nematode control. Bioresource Technology, 49 (2): 187-189.

SIEBENEICHER, S.R., VINSON, S.B., KENERLEY, C.M., 1992: Infection of the red imported fire ant by *Beauveria bassiana* through various routes of exposure. Journal of Invertebrate Pathology, 59: 280-285.

SKUHRAVÝ, V., 1968: Metody chovu hmyzu. Československá akademie věd, Praha. 179-181.

SMITH, R.J., GRULA, E.A., 1981: Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology, 37: 222-230.

SNEH, B., 1991: Isolation of *Metarhizium anisopliae* from insects on and improved selective medium based on wheat germ. Journal of Invertebrate Pathology,58: 269 – 273.

SOPP, P.I., GILLESPIE, A.T., PALMER, A., 1990: Comparison of ultra-low-volume electrostatic and high-volume hydraulic appliacation of *Verticillium lecanii* for aphid control on chrysnthemums. Crop Protection 9, 177-184.

SOSA-GOMEZ, D.R., BOUCIAS, D.G., NATION, J.L., 1997: Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the Southern Green Stink Bug Nezera viridula Cuticle and Fungistatic Effect of Cuticular Lipids and Aldehydes. Journal of Invertebrate Pathology, 69: 31-39.

ST. LEGER R. J., STAPLES, R.C., ROBERTS D.W., 1993: Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae, Beauveria bassiana, and Aspergillus flavus* produce multiple extracelular chitinase isozymes. Journal of Invertebrate Pathology, 61: 81-84.

ST. LEGER, R.J., COOPER, R.M., CHARNLEY, A.K., 1988: The effect of melanization of *Manduca sexta* cuticle on growth and infection by *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology, 52: 459-470.

STOREY, G.K., GARDNER, W.A., 1987: Vertical movement of commercially formulated *Beauveria bassiana* conidia through four Georgia soil types. Environmental Entomology, 16: 178-181.

STOREY, G.K., GARDNER, W.A., TOLLNER, E.W., 1989: Penetration and persistence of commercially formulated *Beauveria bassiana* conidia in soil of two tillage systems. Environmental Entomology, 18 (5): 835-839.

STRASSER, H., FORER, A., SCHINNER, F., 1997: Development of media for the selective isolation and maintenance of virulence of *Beauveria brongniartii*. In: Jackson, T.A., Glare, T.R. (Eds.), Proc. 3rd Intern. Workshop Microbial Control of Soil Dwelling Pests, AgResearch Lincoln, New Zeland, pp. 125-130.

STUDDERT, J.P., KAYA, H.K., 1990: Water potential, temperature and soil type on the formation of *Beauveria bassiana* soil colonies, Journal of Invertebrate Pathology, 56: 380-386.

SVRČEK, M., 1997: Houby. Nakladatelství Adventinum, Praha, pp. 279 .

TANADA, Y., KAYA, H.K., 1993: Fungal infections, pp. 319-387, In: Tanada Y., Kaya H.K., (Eds.) Insect Pathology, Academic Press Inc. California & Academic Press Limited London.

TIGANO-MILANI, M.S., GOMES, A.C.M.M., SOBRAL, B.W.S., 1995: Genetic variability among isolates of the entompathogenic fungus Metarhizium anisopliae. Journal of Invertebrate Pathology, 65: 206-210.

TINGEY, S.V., DEL TUFO, J.P., 1993: Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. Plant Physiology, 101: 349-352.

VANDENBERG, J.D., CANTONE, F.A., 2004: Effect of serial transfer of three strains of *Paecilomyces fumosoroseus* on growth in vitro, virulence, and host specificity. Journal of Invertebrate Pathology, 85: 40-45.

VANDENBERG, J.D., JACKSON, M.A., LACEY, L.A. 1998: Relative efficacy of blastospores and aerial conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* against the russian wheat aphid. Journal of Invertebrate Pathology, 72 (2): 181-183.

VÄNNINEN, I., 1995: Distribution and occurence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type. Mycological Research 100 (1): 93-101.

VÄNNINEN, I., 1996: Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type. Mycol. Res., 100: 93-101.

VÄNNINEN, I., HUSBERG, G. B., HOKKANEN, H. M. T., 1989: Occurrence of entomopathogenic fungi and entomoparasitic nematodes in cultivated soils in Finland. Acta Entomol. Fenn., 53: 65 – 71.

VÄNNINEN, I., TYNI-JUSLIN, J., HOKKANEN, H., 2000: Persistence of augmented *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Finnish agricultural soils. BioControl, 45: 201-222.

VARELA, A., MORALES, E., 1996: Characterization of Some *Beauveria bassiana* Isolates and Their Virulence toward the Coffee Berry Borer *Hypothenemus hampei*. Journal of Invertebrate Pathology 67: 147-152.

VEEN, K. H., FERRON, P., 1966: A selective medium for the isolation of Beauveria tenella and *Metarhizium anisopliae*. J. Insect Pathol., 8: 268 – 269.

VESTERGAARD S., BUTT T.M., BRESCIANI J., GILLESPIE A.T., EILENBERG J., 1999: Light and Electron Microscopy Studies of the Infection of the Western Flower Thrips *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) by the Entomopathogenic Fungus Metarhizium anisopliae. Journal of Invertebrate Pathology, 7: 25-33.

VESTERGAARD, S., BUTT T.M., GILLESPIE, A.T., SCHREITER, G., EILENBERG, J. 1995: Pathogenicity of the hyphomycetes fungi *Verticillium lecani* and *Metarhizium anisopliae* to the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis.* Biocontrol Science and Technology, 5 (2): 185-192.

VEY, A., FARGUES, J., 1977: Histological and ultra-structural studies of *Beauveria bassiana* infection in *Leptinotarsa decemlineata* larvae during ecdysis. Journal of Invertebrate Pathology, 30 207-215.

VEY, A., HOAGLAND, R.E., BUTT, T.M., 2001: Toxic Metabolites of Fungal Biocontrol Agnets. In: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.): Fungi as Biocontrol Agents – Progres, Problems and Potential. CABI Publishing, pp. 311-346.

VIDAL, C., FARGUES, J., LACEY, L.A., 1997: Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: Efect of temperature on vegetative growth. Journal of Invertebrate Pathology., Vol. 70, Iss 1, pp. 18-26.

VILCINSKAS, A., GÖTZ, P., 1999: Parasitic fungi and their Interactions with the Insect Immune Systém. Institute of Zoology, Free University of Berlin, Königin-Luise, Germany, 270-274.

VILLANI, M.G., KRUEGER,S.R., SCHROEDER, P.C., CONSOLIE, F., CONSOLIE, N.H., PRESTON-WILSEY, L.M., ROBERTS, D.W., 1994: Soil applications effects of *Metarhizium anisopliae* on japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) behavior and survival in turfgrass microcosms. Environmental Entomology, 23 (2): 502-513.

VOGEL, J.M., SCOLNIK, P.A., 1997: Direct amplification from microsatellites: detection of simple sequence repeat-based polymorphisms without cloning. In: Caetano-Anolés, G., Gresshoff, P.M. (Eds.): DNA markers. Protocols, Applications, and Overviews. Wiley-Liss, Inc., New York, pp. 133-150.

WAGNER, B.L., LEWIS, L.C., 2000:Colonization of corn. *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Applied Environmental Microbiology, 66: 3468-3473.

WALSTAD, J. D., ANDERSON, R. F., STAMBAUGH, W. J., 1970: Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana and Metarrhizium anisopliae*). Journal of Invertebrate Pathology, 16: 221 – 226.

WANG, C., FAN, M., LI, Z., BUTT, T.M., 2004: Molecular monitoring and evaluation of the application of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* in southeast China. Journal of Applied Microbiology, 96: 861-870.

WANG, C., TYPAS, M.A., BUTT, T.M., 2002: Detection and characterisation of *pr1* virulent gene deficiencies inf the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. FEMS Microbiology Letters, 213: 251-255.

WARCUP, J. H., 1967: Fungi in soil. In: Burges, A., Raw, F., (Eds.): Soil Biology, London et New York, pp. 51 – 110.

WEISER, J., 1966: Nemoci hmyzu. ČSAV, 1966, Praha, pp. 232-324.

WEISER, J., 1977: An atlas of insect diseases. 2[a] ed. AW Junk Pulish, pp. 324.

WELSH, J., McCLELLAND, M., 1990: Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research, 18: 7213-7218.

WHIPPS, J.M., LUMSDEN, R.D., 2001: Commercial Use of Fungi as Plant Disease Biological Control Agents: Status and Prospects. In: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.): Fungi as Biocontrol Agents – Progres, Problems and Potential. CABI Publishing, pp. 9-22.

WIDDEN, P., PARKINSON, D., 1979: Populations of fungi in a high arctic ecosystem. Can. J. Bot., 57: 1324-1431.

WILLIAMS, J.G.K., KUBEIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V., 1990: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 20: 303-306.

WILSON, K., COTTER, S.C., REESON, A.F., PELL, J.K., 2001: Melanism and disease resistance in insect. Ecology Letters, 4: 637-649.

WOODRING, J.L, KAYA, H.K., 1988: Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes: A Handbook of Biology and Techniques. Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, Arkansas.

WOODS, S.P., GRULA, E.A., 1984: Utilisable surface nutrients on Heliothis zea available for growth of *Beauveria basssiana*. Journal of Invertebrate Pathology, 43: 259-269.

WRAIGHT, S.P., CARRUTHERS, R.I., BRADLEY, C.A., JARONSKI, S.T., LACEY, L.A., WOOD, P., GALAINI-WRAIGHT, S., 1998: Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. Journal of Invertebrate Pathology, 71: 217-226.

WRAIGHT, S.P., JACKSON, S.P., de KOCK S.L., 2001: Production, Stabilization and Formulation of Fungal Biocontrol Agents. In: Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.): Fungi as Biocontrol Agents – Progres, Problems and Potential. CABI Publishing, pp. 9-22.

ZACHARUK, R.Y., 1970a: Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera), I. Dormant and germinating conidia. Journal of Invertebrate Pathology, 15: 63-80.

ZACHARUK, R.Y., 1970b: Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera), II. Conidial germ tubes and appressoria. Journal of Invertebrate Pathology, 15: 81-91.

ZACHARUK, R.Y., 1970c: Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera), III. Penetration of the host integument. Journal of Invertebrate Pathology, 15: 372-396.

ZARE R; GAMS W. 2001: A revision of *Verticillium* section Prostrata. IV. The genera Lecanicillium and Simplicillium. Nova Hedwigia, 73: 1-50.

ZARE R; GAMS W. 2001: A revision of *Verticillium* section Prostrata. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium*. Nova Hedwigia, 73: 271-292.

ZIMMERMANN, G., 1986: Galleria bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. Zeitschrift für angewandte Entomologie, 2: 213-215.

9. SUMMARY

There is more than 700 species of mitosporic filamentous fungi recorded as a parasitic species associated with the insect. Some of them are currently used as a biological control agent, however the majority of this entomopathogenic fungi represent a resource for the future use. The thesis was focused on natural occurence, frequency of this occurence and species diversity of entomopathogenic fungi in soil ecosystem, polyfactorial evaluation of entomopathogenic fungi strain isolates and persistence of strains (*B. bassiana*) purposely introduced into the soil. The aim of this thesis was to amend the mycological collection kept by Department of the crop production, University of South Bohemia in České Budějovice with the new type culture of entomopathogenic fungi strains and their features and to contribute to use of this naturally regulating microorganisms in biological control.

There was collected in total 113 soil samples from 65 habitats in the region of South Bohemia (area of 10 000 km^2). Soil samples were collected from the arable land, namely from following crops: wheat (40,7 % from 113 soil samples), barley (17,7 %), malting barley (12,4 %), rye (13,0 %), oats (11,5 %). Soil samples from mixed crop cultures as underseeding represent only 4,4 %. Occurence of entomopathogenous fungi was proved by *Galleria* bait method (GBM) and dodine based selective medium (SM a.i. dodine) in 95,6 % of soil samples and the most frequent species was *P. lilacinus* (in 92,1 % soil samples), *M. anisopliae* (67,8 %) and *B. bassiana* (15,6 %). The least frequent species in analysed samples was *P. carneus* (6 strains, 5,6 % resp. 3,1 %) and *P. fumosoroseus* (4 strains, 3,8 % resp. 2,0 %). An average frequency of occurence in a value of $2{,}6.10^3$ CFU/ 1 ml of soil sample (*P. lilacinus*), $4{,}1.10^2$ CFU/ 1 ml of soil sample (*M. anisopliae*) and $1{,}4.10^2$ CFU/ 1 ml of soil sample (*B. bassiana*) was defined by means of dodine based medium as well as minimum frequency of occurence for *P. carneus* and *P. fumosoroseus*. Similar frequency of occurence for the most frequent species was recorded at three from four experimental habitats (Pencin, Smrzice, Troubsko, Zabcice) in Moravia. The most of isolated entomopathogenic fungi strains were stored in a form of alginate pellets in the mycological collection kept by Department of the crop production, University of South Bohemia in České Budějovice.

Chosen strains from the mycological collection kept by Department of the crop production, University of South Bohemia in České Budějovice were characterized by means of polyfactorial strains evaluation including growth features (radial growth, germination and conidia vitality), production features (conidia/ blastospores production on artificial or natural substrate) and biological features evaluated in biotest on greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) or wax moth (*Galleria mellonella*). In total 66 strains were evaluated, only a part of strains was evaluated at all polyfactorial features indeed.

Set of 21 strains of entomopathogenic fungi from region of South Bohemia proved the ability of completion of the whole development cycle while being cultivated on agar medium (PDA) and an the natural substrate (barley groats). Significant differences have been recorded by three *M. anisopliae* strains, whose germination rate was very low (average 70%) and its ability to produce blastospores in a submerged culture was minimal. The majority of strains have demonstrated in comparison to other strains (*P. fumosoroseus* and *M. anisopliae*) the best production ability including short development cycle.

A new set of strains (*B. bassiana*) representing 13 habitats of 6 regions in the South Bohemia amended by strains from the polyfactorial evaluation (for example strain M062), was evaluated in biotest using wax moth larvae (*G. mellonella*). According to the strain development index it was possible to divide the strains into groups: strains with high virulence (8 strains), middle virulence (6 strains) and low virulence (8 strains) to the wax moth larvae. Evaluated set of strains demonstrated low variability (7 – 18 %) comparing to

two comparative American strains (28 %). By means of RAPD analysis the compliance (similarity rate) within strains originating from the same region or habitats was not proven.

In the survey *"Bioformulations ond organomineral fertilizers for supporting degradation of organic matter and increasing soil supresivity"* were 21 strains from the habitat Troubsko evaluated for polyfactorial features. There was also evaluated the compatibility of these strains to organo-mineral fertilizer BETA-LIQ (REDAM SMRŽICE s.r.o.) based on beet molasses stillage, which supports degradation of the harvest residues and straw. All strains demonstrated good growth and production ability including high compatibility rate to the fertilizer BETA-LIQ at all concentrations (50, 70 and 90 %) of the fertilizer. Based on the evaluation of key features of the entomopathogenic fungi strains the organo-mineral fertilizer BETA-LIQ was recommended as a carrier for two strains of entomopathogenic fungi (strain M408, *B. bassiana* and strain M394, *M. anisopliae*) for their introduction into the soil. Positive influence of Beta-liq combined to chosen strains of entomopathogenic fungi was proven in laboratory and small-scale field experiments (data not included). Positive effect of entomopathogenic fungi on production of green mass by a testing crop was recorded as well as on CO_2 production intensity, soil structure and degradation of straw compared to experiment where Beta-liq was not used or compared to pure soil.

Final part of the thesis was a model study focused on persistence evaluation of purposely introduced strain M062 (*B. bassiana*) in the habitat Zabcice by Brno. Before the introduction was conducted, there was on 8 experimental fields a high species diversity of most frequent strains of entomopathogenic fungi (*M. anisopliae*, *P. lilacinus*, *B. bassiana*, *P. fumosoroseus*) recorded in the initial monitoring, with the highest abundance of *M. anisopliae*. The chosen strain was introduced together with Beta-liq formulation (2 t/ ha) on the surface of crushed wheat straw in concentration of 5.10^9 conidia/ blastospores / m^2 and immediately after application was the straw by a rotator brought into the soil.

After the introduction a follow-up monitoring (after 7 weeks) proved higher frequency of occurance of entomopathogenic fungi *B. bassiana* in all experimental fields with preservation of the specie diversity. The visual evaluation of the morphological structure of strain cultures indicated a significant similarity between introducted strains and re-isolated strains. However, not even an evaluation of one feature (radial growth) enabled definite proof of strain persistence in the habitat. Based on RAPD fingerprints spectrum, the highest similarity rate was determined between introduced strain M062 and all re-isolated strains. The second monitoring, 8 months after purposeful introduction of M062 strain, proved a dominant representation of this specie in all experimental fields. Over against previous RAPD analysis was a significantly higher variability recorded within re-isolated strains (*B. bassiana*). The similarity of 98 % to the introduced strain was proved by six re-isolated strains. On the basis of these results can be stated, that introduced strain has been able to co-exist with the domestic strains for minimum 8 months (from harvest to beginning of the growing season).

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

10. SEZNAM PŘÍLOH

Grafický list 1: Místa odběru půdních vzorků na území jihočeského regionu a na pokusných lokalitách na Moravě.

Grafický list 2: Izolace entomopatogenních hub z půdy pomocí „*Galleria* bait method".

Grafický list 3: Izolace entomopatogenních hub z půdy pomocí selektivního média s fungicidní složkou dodine s následnou purifikací kmene a uložení jeho biomasy ve formě Na-alginátových pelet.

Grafický list 4: Ukázka zpracování databázového formuláře typového kmene pro účely nově vytvořené centrální databáze mykologické sbírky kmenů entomopatogenních hub.

Grafický list 5: Standardní metoda přímého stanovení počtu jednotek.

Grafický list 6: Hodnotící stupnice standardního testu klíčivosti.

Grafický list 7: Fotodokumentace k založení „in vivo" (bio)testu na molici skleníkové (*Trialeurodes vaporariorum*) a nejvýznamnější fáze hodnocení vývoje kmenů entomopatogenní houby.

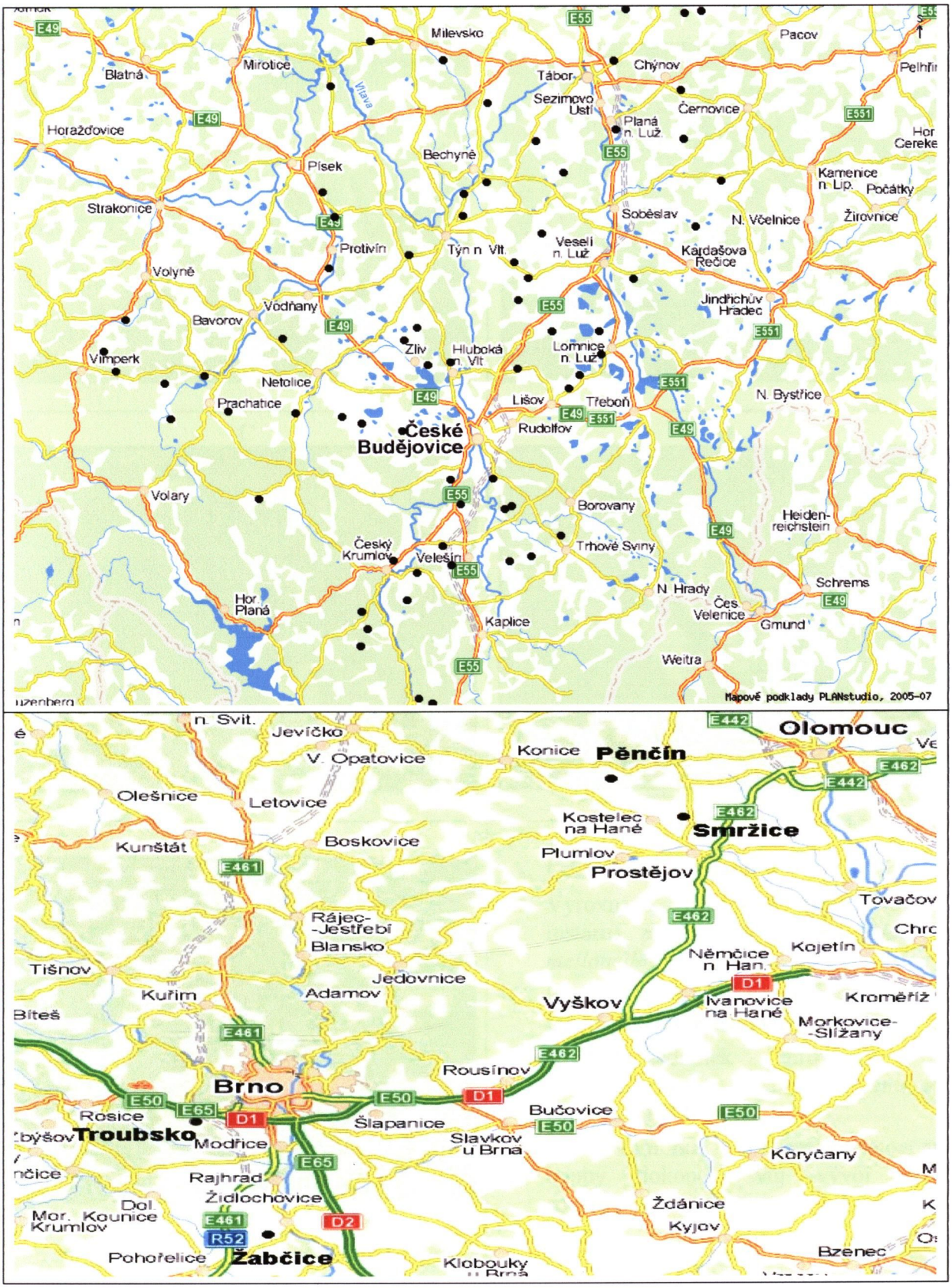
Grafický list 8: Schéma modelového interakčního systému – znázorňuje interakce mezi konidií, povrchem těla vhodného hostitele a následný vývoj patogena (doplněno o fotodokumentaci)

Grafický list 9: Porovnání morfologické charakteristiky (středových kultur) původních kmenů a aplikovaného kmene M062 entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* na pokusné lokalitě v Žabčicích u Brna

Grafický list 10: Porovnání morfologické charakteristiky (středových kultur) re-izolovaných kmenů a aplikovaného kmene M062 entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* na pokusné lokalitě v Žabčicích u Brna

GRAFICKÝ LIST 1:

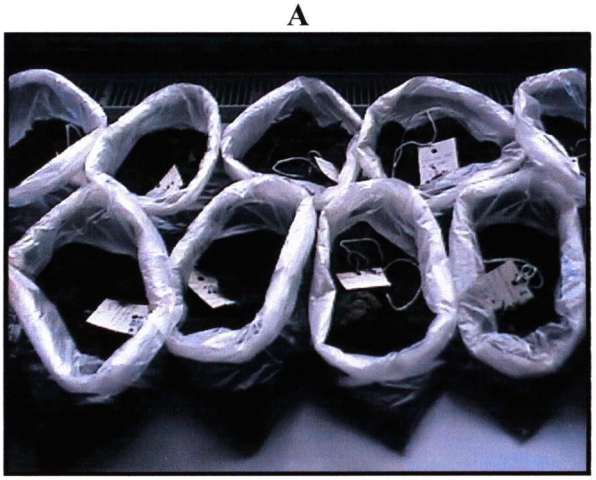
MÍSTA ODBĚRU PŮDNÍCH VZORKŮ NA ÚZEMÍ JIHOČESKÉHO REGIONU A NA POKUSNÝCH LOKALITÁCH NA MORAVĚ



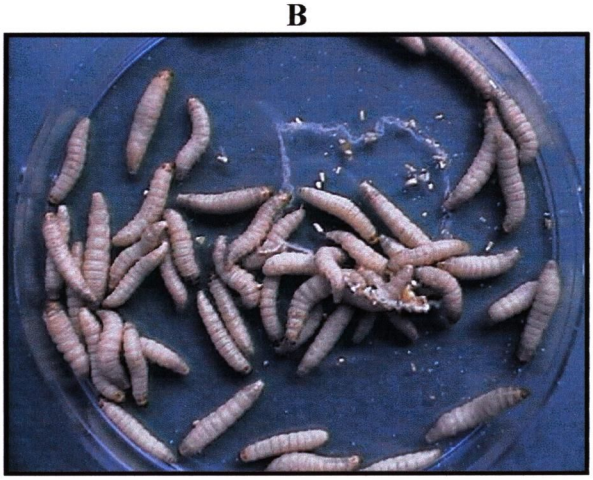
GRAFICKÝ LIST 2:

IZOLACE ENTOMOPATOGENNÍCH HUB Z PŮDY POMOCÍ „*GALLERIA* BAIT METHOD“

A



B



C



D



E



A. Odebrané půdní vzorky

B. Vyrovnaná populace larev (3. – 4. instaru) zavíječe voskového (*Galleria mellonella*)

C. Pokusná jednotky – larvy exponovány do infekčního prostředí půdy

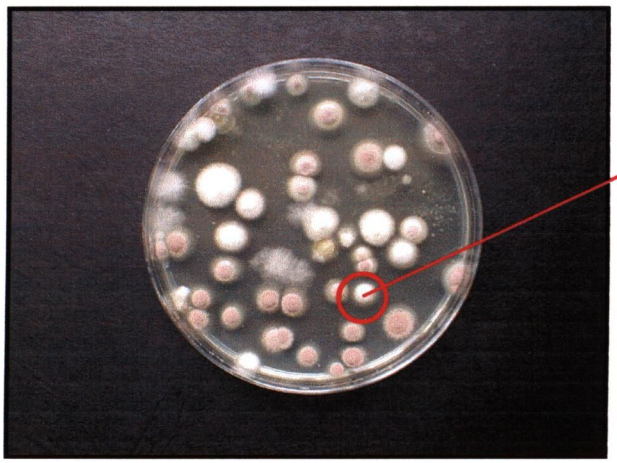
D. Kontrola jednotek – infikované a již porostlé larvy myceliem entomopatogenní houby

E. Vlhká komůrka – kde entomopatogenní houby dokončí svůj vývoj (plná sporulace)

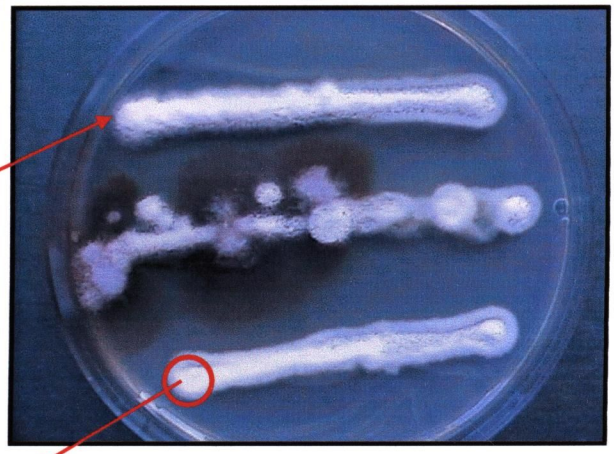
GRAFICKÝ LIST 3:

IZOLACE ENTOMOPATOGENNÍCH HUB Z PŮDY POMOCÍ SELEKTIVNÍHO MÉDIA S FUNGICIDNÍ SLOŽKOU DODINE S NÁSLEDNOU PURIFIKACÍ KMENE A ULOŽENÍ JEHO BIOMASY VE FORMĚ Na-ALGINÁTOVÝCH PELET

A



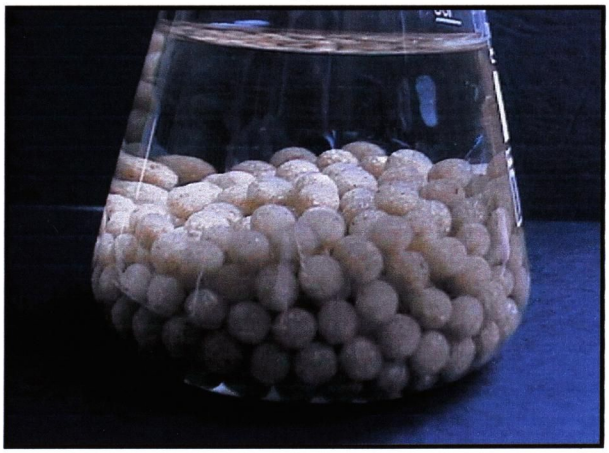
B



C



D



E



A. Izolace entomopatogenních hub při použití selektivního média s fungicidní složkou dodine (50µg/ 1ml selek. média)

B. Přečištění izolovaného kmene pomocí „separačních čar“

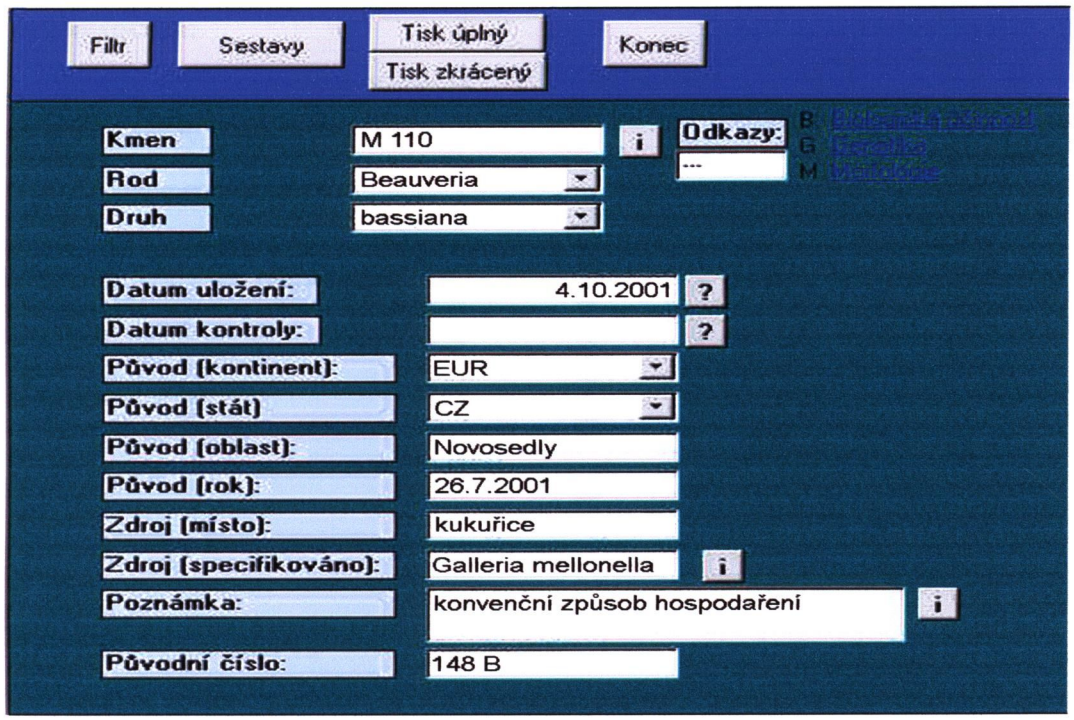
C. Kontaminace prostá biomasa entomopatogenní houby určená k enkapsulaci do Na-alginátových pelet

D. Primární pelety tzv. „gelové kuličky“, po vysušení lze pelety dlouhodobě skladovat

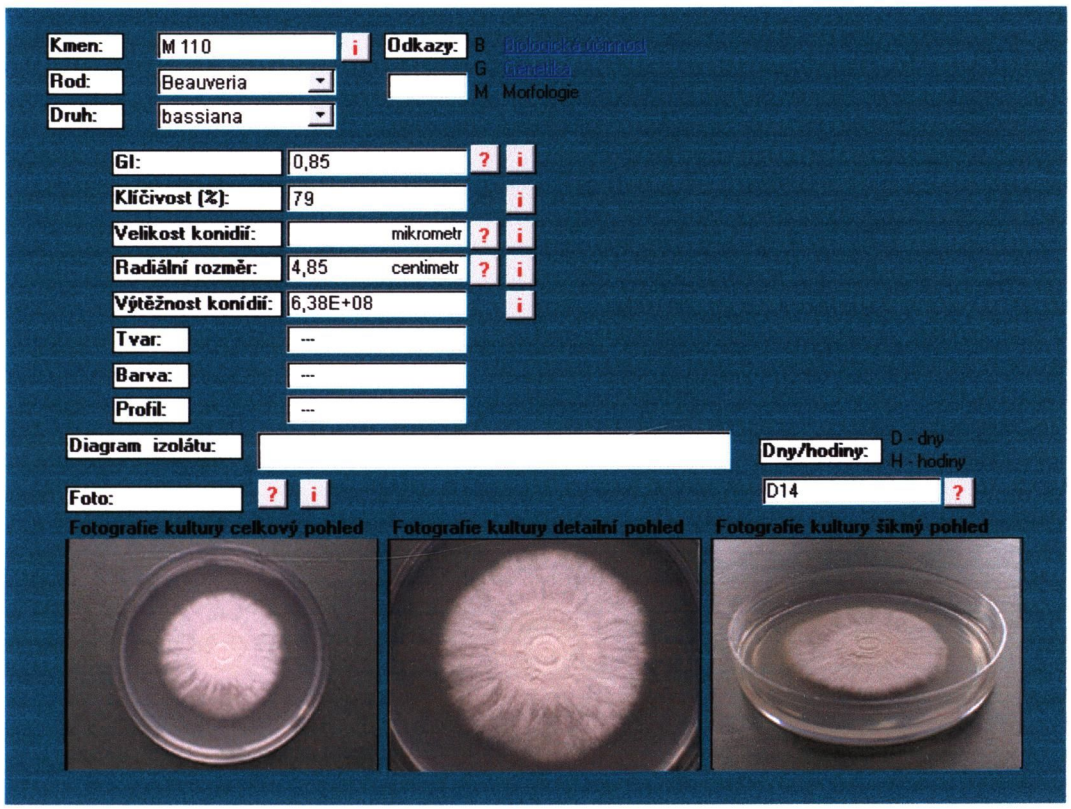
E. Skladování alginátových pelet v plastikových kontejnerech při - 20 °C

GRAFICKÝ LIST 4:

UKÁZKA ZPRACOVÁNÍ DATABÁZOVÉHO FORMULÁŘE TYPOVÉHO KMENE PRO ÚČELY CENTRÁLNÍ DATABÁZE MYKOLOGICKÉ SBÍRKY KMENŮ ENTOMOPATOGENNÍCH HUB



Databázový formulář: Základní informační záznam o uložené položce (druh, kmen)



Příklad doprovodné dokumentace: Morfologická charakteristika středové kultury uloženého kmene

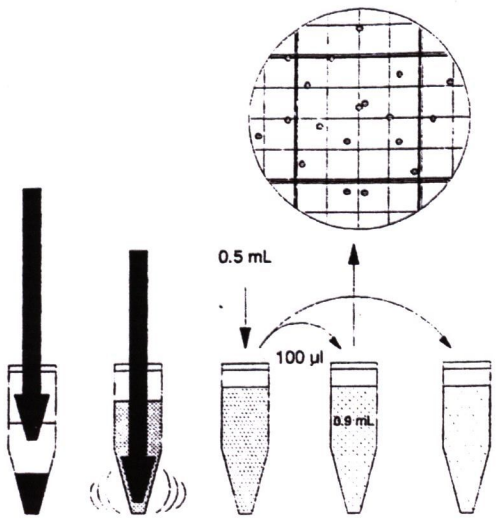


GRAFICKÝ LIST 5:

STANDARDNÍ METODA PŘÍMÉHO STANOVENÍ POČTU JEDNOTEK

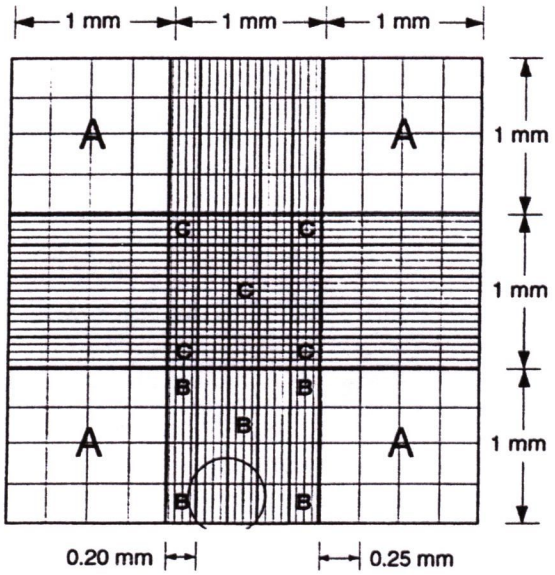
Příprava suspenze:

- Převedení biomasy kmene do destilované vody se smáčedlem
- Homogenizace suspenze
- Naředění (1 ml suspenze do 9 ml destilované vody se smáčedlem)
- Orientační ověření titru



Stanovení počtu jednotek ve specifickém poli hemocytometru:

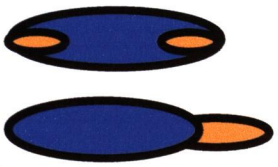
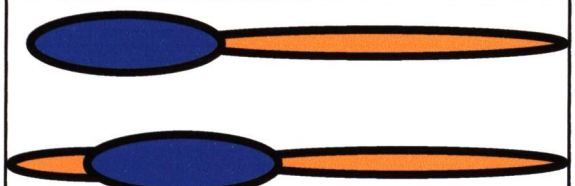
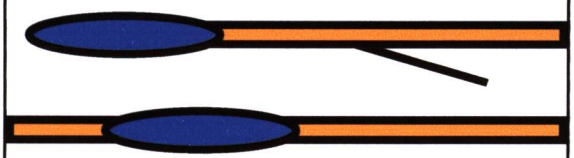
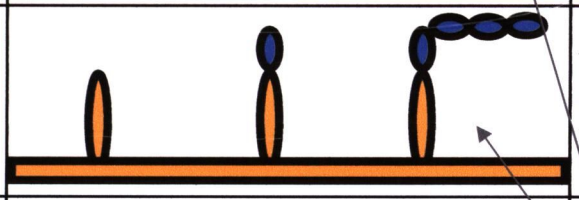
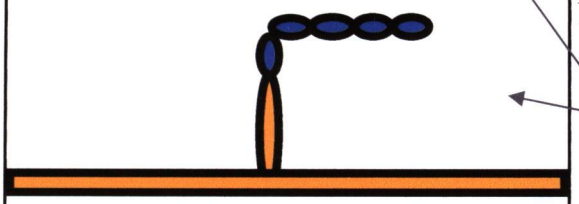
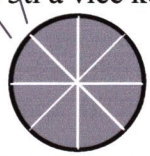
- Kompletace počítací komůrky
- Nanesení suspenze
- Sedimentace
- Vybrání vhodného pole (upřednostněna pole „C“)
- Vhodné max. 50 jednotek v jenom počítaném poli
- Tolerován rozdíl mezi poli (STDV souboru) max. 15 %
- Průměr ze dvou opakování (z horního a dolního počítacího pole komůrky)



Přepočet údajů získaných odpočtem	**A**	**B**	**C**
	průměr 1 pole x **1,0.10^4**	průměr 1 pole x **2,0.10^5**	průměr 1 pole x **2,5.10^5**
	x **ředění**	x **ředění**	x **ředění**

GRAFICKÝ LIST 6:

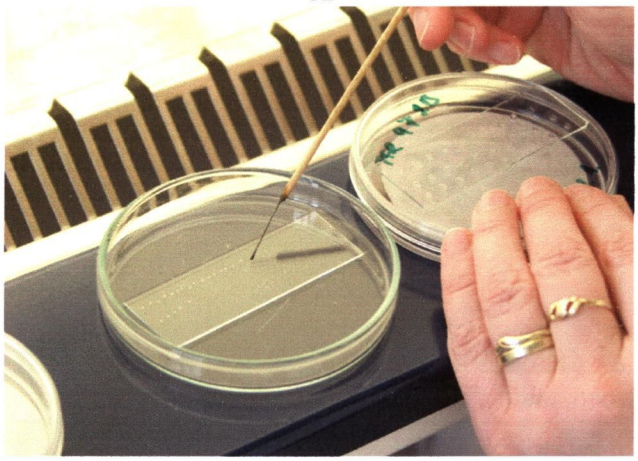
HODNOTÍCÍ STUPNICE STANDARDNÍHO TESTU KLÍČIVOSTI

GI	Morfologické symptomy	Stručný popis
0	 konidie hodnoceny individuelně	1. Na konidii nejsou zřejmé žádné morfologické změny 2. Konidie ve vzorku mají uniformní tvar
0.50	 konidie hodnoceny individuelně	1. Konidie jsou zřetelně protáhlejší, nabobtnalé 2. Na konidii je zřetelný jednostranný klíček, v poměru přibližně 1 : 0,5
1.00	konidie : klíček = 1:1  konidie hodnoceny individuelně	Velikost klíčku na hodnocené konidii je v poměru 1 : 1 k velikosti matečné konidie
1.50	 konidie hodnoceny individuálně	1. Klíček je 2-3 x delší než matečná konidie 2. Na matečné konidii jsou zřejmé 2 kratší klíčky
2.00		1. Klíček je více než 3 x tak dlouhý jako matečná konidie 2. Sekundární větvení 3. Dva dlouhé klíčky
2.50		Na hyfách jsou přítomny konidiofory s maximálně čtyřmi konidiemi (0 – 4 konidie na konidioforu)
3.00		Na hyfách jsou přítomny konidiofory s 5ti a více konidiemi  **Hodnoceno v 8 zónách zorného pole mikroskopu**

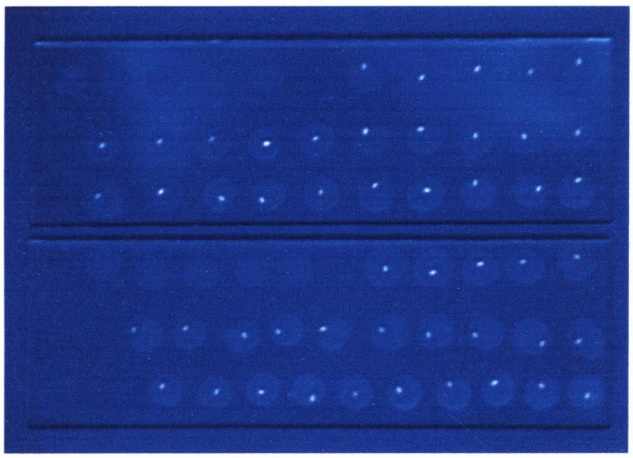
GRAFICKÝ LIST 7:

FOTODOKUMENTACE K ZALOŽENÍ „IN VIVO“ (BIO)TESTU NA MOLICI SKLENÍKOVÉ (*TRIALEURODES VAPORARIORUM*) A NEJVÝZNAMNĚJŠÍ FÁZE HODNOCENÍ VÝVOJE KMENŮ ENTOMOPATOGENNÍ HOUBY

A



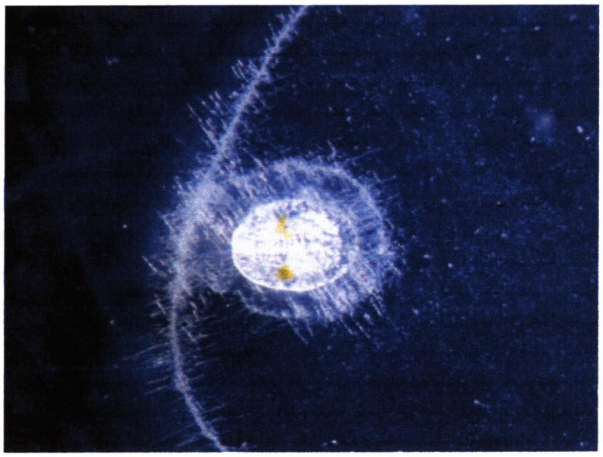
B



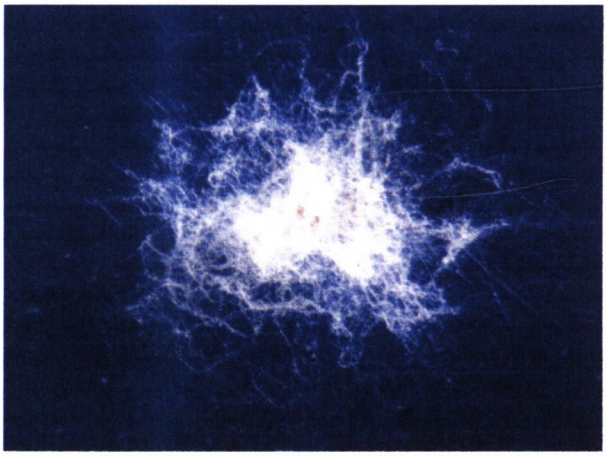
C



D



E



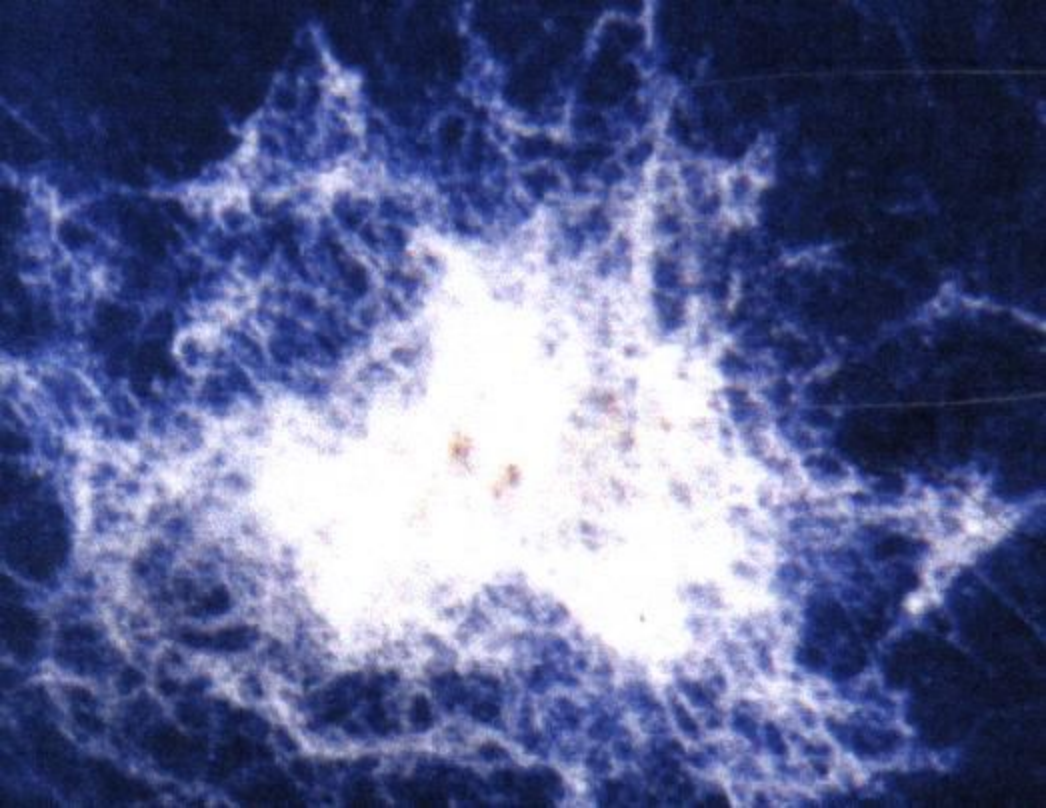
A. Nanesení kapek adjustované suspenze kmene a následné vložení puparií molice skleníkové (*T. vaporariorum*) pomocí inokulačního očka

B. Ukázka rozmístění 5 kontrolních kapek a 25 kapek s pupárii molice skleníkové (ve 3 řadách na 1 sterilním sklíčku)

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

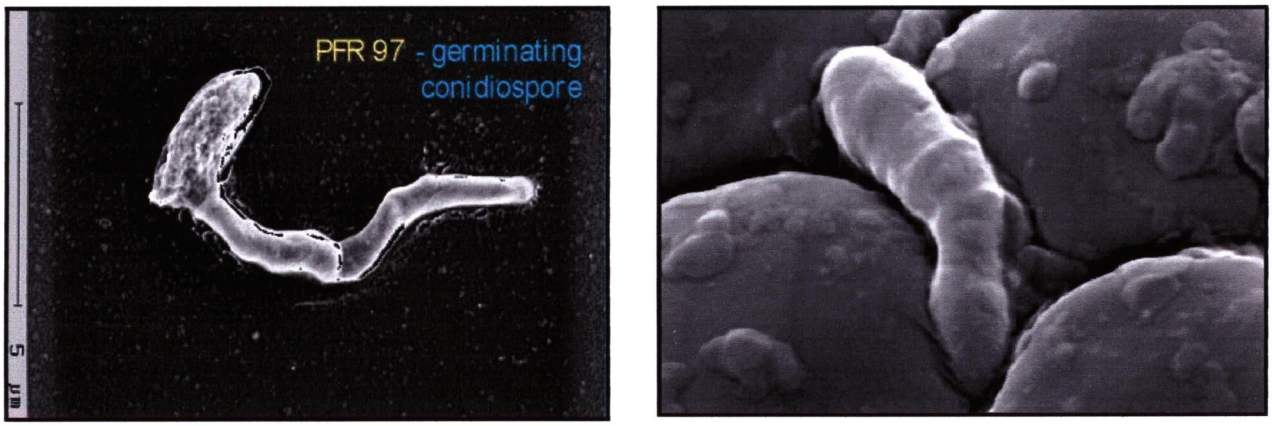
D. Masivní růst mycelia (FDGI 2,0): Okolí a povrch puparia porostlý hustým myceliem (stereoskopický mikroskop)

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

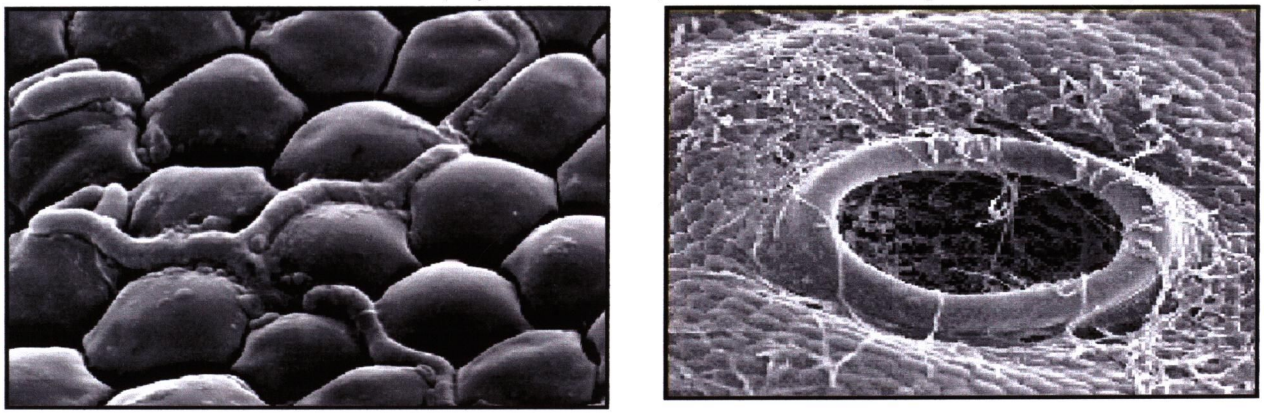


GRAFICKÝ LIST 8:

SCHÉMA MODELOVÉHO INTERAKČNÍHO SYSTÉMU – ZNÁZORŇUJE INTERAKCE MEZI KONIDIÍ, POVRCHEM TĚLA VHODNÉHO HOSTITELE A NÁSLEDNÝ VÝVOJ PATOGENA (DOPLNĚNO O FOTODOKUMENTACI)



Ukázka samotné klíčící konidie (*P. fumosoroseus*) a klíčící konidie na povrchu kutikuly hostitele



Ukázka růstu mycelia na povrchu kutikuly hostitele a penetrace do hostitele přes kutikulu nebo tělní otvory

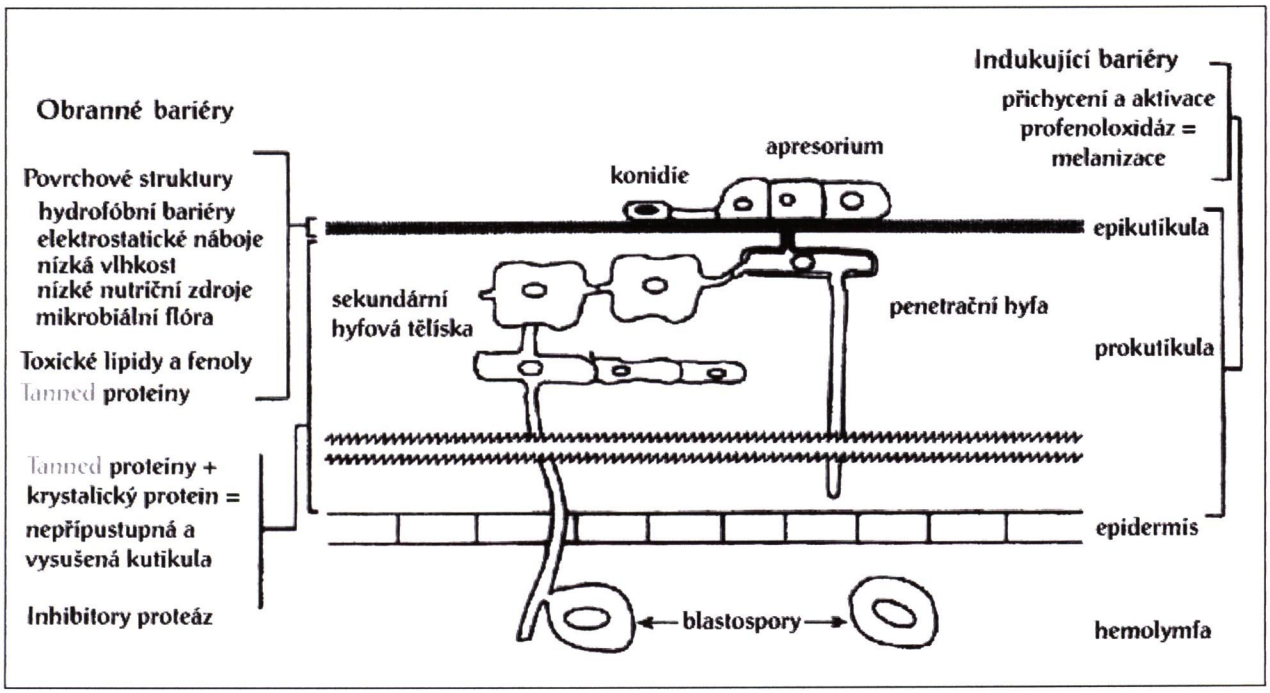
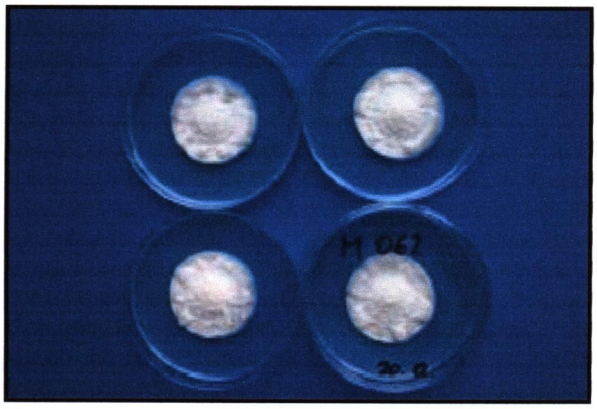


Schéma parazitické části vývojového cyklu entomopatogenních hub (Hajek, St. Lager 1994)

GRAFICKÝ LIST 9:

POROVNÁNÍ MORFOLOGICKÉ CHARAKTERISTIKY (STŘEDOVÝCH KULTUR) PŮVODNÍCH KMENŮ A APLIKOVANÉHO KMENE M062 ENTOMOPATOGENNÍ HOUBY *BEAUVERIA BASSIANA* NA POKUSNÉ LOKALITĚ V ŽABČICÍCH U BRNA

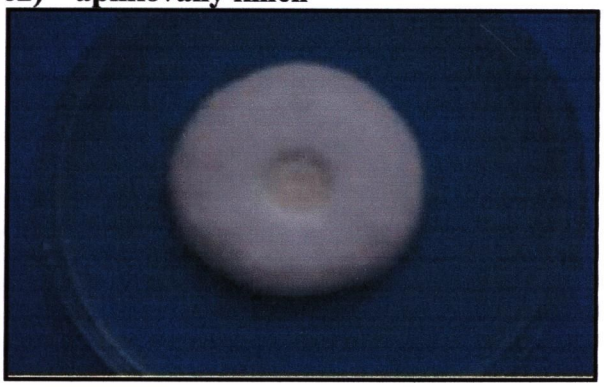




***Beauveria bassiana* (M062) – aplikovaný kmen**



***B. bassiana* (BBA01) – referenční kmen**



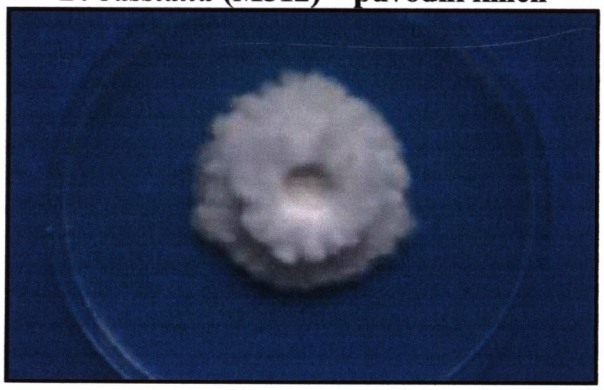
***B. bassiana* (M510) – původní kmen**

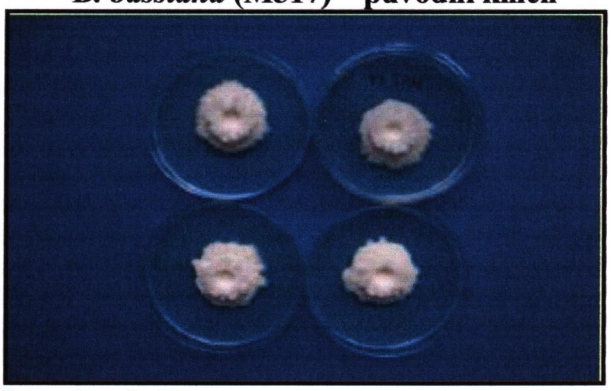


***B. bassiana* (M512) – původní kmen**



***B. bassiana* (M517) – původní kmen**





***B. bassiana* (M514) – původní kmen**

GRAFICKÝ LIST 10:

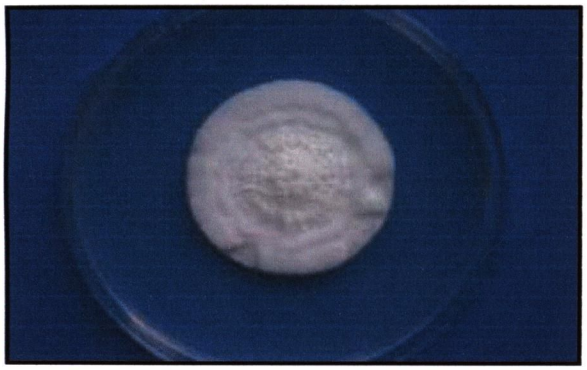
POROVNÁNÍ MORFOLOGICKÉ CHARAKTERISTIKY (STŘEDOVÝCH KULTUR) RE-IZOLOVANÝCH KMENŮ A APLIKOVANÉHO KMENE M062 ENTOMOPATOGENNÍ HOUBY *BEAUVERIA BASSIANA* NA POKUSNÉ LOKALITĚ V ŽABČICÍCH U BRNA



B. bassiana **(M062) – aplikovaný kmen**



B. bassiana **(M519) – re-izolovaný (GBM)**



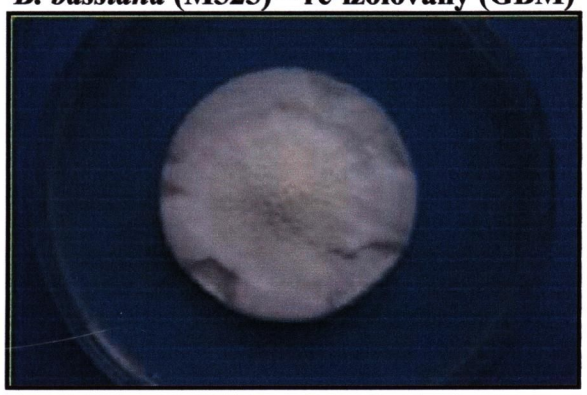
B. bassiana **(M521) – re-izolovaný (GBM)**



B. bassiana **(M525) – re-izolovaný (GBM)**



B. bassiana **(M530) – re-izolovaný (GBM)**



B. bassiana **(M563) – re-izolovaný (SM-dod)**



B. bassiana **(M565) – re-izolovaný (SM-dod)**



B. bassiana **(M574) – re-izolovaný (SM-dod)**