

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

Ing. Aleš Skalický

České Budějovice
2014

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

Doktorand: Ing. Aleš Skalický

Studijní program: Fytotechnika

Studijní obor: Speciální produkce rostlinná

Pracoviště: Katedra rostlinné výroby a agroekologie
Zemědělská fakulta, JU v Českých Budějovicích

Název práce: Možnosti hodnocení účinnosti entomopatogenních hub na vybrané
cílové hostitele

Školitel: prof. Ing. Zdeněk Landa, CSc.
prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Katedra rostlinné výroby a agroekologie, Zemědělská fakulta JU
v Českých Budějovicích

Oponenti: doc. Ing. Ivan Mráz, CSc.
BC AV ČR ÚMBR České Budějovice

 RNDr. Alena Nováková, CSc.
BC AV ČR ÚPB České Budějovice

 RNDr. Zdeněk Mráček, DrSc.
BC AV ČR ENTÚ České Budějovice

Obhajoba disertační práce se koná dne 30. 6. 2014 v 10:30 hod v místnosti Vědecké rady ZF JU v Českých Budějovicích.

S disertační prací se lze seznámit na oddělení pro vědu a výzkum Zemědělské fakulty JU v Českých Budějovicích.

OBSAH

1. LITERÁRNÍ REŠERŠE	4
2. CÍLE PRÁCE.....	7
3. MATERIÁL A METODIKA.....	9
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY	12
4.1 Studie 1: Hodnocení účinnosti vybraných izolátů entomopatogenní houby <i>Beauveria bassiana</i> a <i>Beauveria caledonica</i>, získaných v rámci plošného monitoringu na území Národního parku Šumava, na larvách potemníka moučného (<i>Tenebrio molitor</i>)	12
4.2 Studie 2: Porovnání účinnosti dvou rozdílných typů spor entomopatogenní houby <i>Beauveria bassiana</i> na larvy <i>Tenebrio molitor</i>.....	14
4.3 Studie 3: Hodnocení účinnosti izolátů získaných z komerčních biopreparátů na bezkřídlé partenogenetické samičky <i>Myzus persicae</i>.....	17
4.4 Studie 4: Hodnocení účinnosti indigenních izolátů entomopatogenní houby <i>Metarhizium anisopliae</i> odizolovaných z půd konvenčně obhospodařovaných konvenčním způsobem	18
4.5 Studie 5: Posouzení účinnosti vybraných izolátů entomopatogenní houby <i>Isaria fumosorosea</i> a jejích pasáží přes různé živné substráty na larvy zavíječe voskového <i>Galleria mellonella</i>	19
5. ZÁVĚRY	21
6. SUMMARY	22
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	25
8. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA DISERTAČNÍ PRÁCE	28

Řešení tématu disertační práce bylo podporováno z výzkumného záměru MSM 6007665806.

1. LITERÁRNÍ REŠERŠE

1.1 Integrovaná ochrana rostlin (IOR)

Termín „integrovaná ochrana rostlin“ poprvé použili Smith a van den Bosh v roce 1967 a tento termín byl v roce 1969 oficiálně uznán Národní akademií věd Spojených států amerických. Za posledních padesát let byly vyvinuty nové prostředky a strategie konceptu IOR: (i) novější, více selektivní insekticidy, (ii) pokrok ve vývoji tzv. „biopesticidů“, (iii) postupy založené na využití semiochemikálií, (iv) koncept podpory a konzervace užitečných organismů, (v) využití strategie augmentativní biologické ochrany, (vii) nástup transgenních plodin schopných produkce specifických (cry) proteinů entomopatogenní bakterie *Bacillus thuringiensis* (Rajinder et al. 2009).

Koncept IOR je postaven především na porozumění ekologii a populační biologii škodlivých organismů (Norris et al. 2003) a předpokládá využití široké palety dostupných metod ochrany rostlin: biologické, agrotechnické, fyzikální a hostitelské rezistence rostlin, a v neposlední řadě metody chemické. Rozdílné metody mohou být kombinovány tak, aby vyhovovaly lokálním potřebám. Dlouhodobým cílem je vylepšit funkčnost autoregulačních mechanismů ekologických farených systémů, které omezují rozvoj škodlivých organismů tak, aby lidského zásahu bylo využito pouze tehdy, kdy populace škodlivého organismu dosáhne škodlivé úrovně (Bailey et al. 2010).

1.2 Biologická ochrana rostlin

Biologickou ochranou se obecně rozumí použití živých organismů (a virů) k potlačení populační hustoty či vlivu na specifické škodlivé organismy (Eilenberg et al. 2001).

Veškeré antagonistické organismy zaváděné v rámci biologické ochrany, představují určitý stupeň rizika pro necílové druhy organismů a rozdílnost mezi úspěšným biologickým kontrolním agens a invazivním druhem může být velice úzká (Roy, Wajnberg 2008). Využívání relativně specifických prostředků velmi snižuje riziko pro necílové organismy. Biologická ochrana byla praktikována po více než 130 let s minimálním negativním dopadem na necílové organismy (Delfosse 2005), i přesto je obvykle použití daného kontrolního agens posuzováno dle následujících čtyř oblastí: (i) charakterizace a identifikace, (ii) zdravotní rizikovost, (iii) rizikovost pro životní prostředí a (iv) účinnost (IOBC 2012).

1.3 Entomopatogenní houby v ochraně rostlin před škůdci (a patogeny)

Entomopatogenní houby mohou být použity v rámci všech čtyř strategií biologické ochrany rostlin (klasická, inokulativní a inundativní biologická ochrana a podpora a konzervace přirozených antagonistů) (Shah, Pell 2003). Nejvíce efektivní strategií je permanentní introdukce (známá také jako klasická biologická ochrana), která je postavena na vyvolání nákazy v populacích škůdců, ve kterých se obvykle nevyskytuje a poskytuje dlouhodobou či stálou ochranu (Charnley, Collins 2007). Největší důraz byl u entomopatogenních hub kladen na rozvoj inundativní biologické ochrany (Goettel, Hajek 2001), přičemž aplikace je obdobná jako u pesticidů. Nejlepšího využití „mykoinsekticidů“ je dosaženo preventivními aplikacemi, zaměřenými na počáteční příznaky a/nebo první výskyt škodlivých organismů (Jaronski 2010).

Pro budoucí zvýšené využití entomopatogenních hub v ochraně rostlin je třeba: (i) zvýšení virulence a rychlosti usmrcení hostitele, (ii) zlepšení účinnosti v náročných/nepříznivých podmínkách prostředí (nízká vlhkost a teplota), (iii) efektivní masová produkce, (iv) vhodné formulace zajišťující snadnou aplikaci, dlouhodobou životnost a perzistenci v prostředí, (v) včlenění do integrovaných systémů a lepší porozumění jejich interakcím s prostředím a ostatními komponenty IOR, (vi) zhodnocení přínosu pro životní prostředí a (vii) přijetí této koncepce ochrany rostlin, založené na entomopatogenních houbách, širokou veřejností a pěstiteli (Lacey et al. 2001).

Výhody a nevýhody využití entomopatogenních hub jako „mykoinsekticidů“ v ochraně rostlin (upraveno podle Khan et al. 2012)	
VÝHODY	1. „Mykoinsekticidy“ mají obecně vysokou specifčnost a obecně nevykazují (nebo jen v minimální míře) negativní dopady na přirozené antagonisty.
	2. Obecně nemají negativní dopad na životní prostředí a zdraví lidí.
	3. Žádné nebo velice nízké riziko vzniku rezistence díky specifickému mechanismu účinku entomopatogenních hub.
	4. Produkce sekundárních metabolitů předurčuje entomopatogenní houby k dalšímu biotechnologickému výzkumu.
	5. Některé entomopatogenní houby mají schopnost endofytického růstu, a mohou potencionálně sehrávat důležitou roli v aktivaci obranných reakcí rostlin.
	6. Perzistence entomopatogenních hub v prostředí může poskytovat dlouhodobý supresivní účinek vůči cílovým škodlivým organismům.
NEVÝHODY	1. Pomalejší účinnost a z toho plynoucí delší časový interval k usmrcení cílového organismu, ve srovnání s chemickou ochranou (řádově dny až týdny u „mykoinsekticidů“ oproti hodinám u chemické ochrany).
	2. Potřeba specifických podmínek pro úspěšnou infekci a rozvoj nákazy v populaci cílového organismu (tj. vlhkost, teplota, světelné podmínky).
	3. V některých případech nemusí „mykoinsekticidy“ pokrývat v rámci svého hostitelského spektra všechny dané cílové organismy, proto je potřeba dalších prostředků k docílení ochrany.
	4. „Mykoinsekticidy“ obecně mají oproti chemickým prostředkům na ochranu rostlin kratší trvanlivost a vyžadují specifické zacházení (např. uchovávání v chladu).
	5. Potřeba optimalizace aplikace „mykoinsekticidů“ k zajištění dlouhodobé ochrany před cílovými škodlivými organismy.
	6. Potenciální negativní dopady na životní prostředí a zdraví lidí (např. potenciální alergenita, toxicita k necílovým organismům, patogenita k necílovým organismům).

1.4 Životní cyklus entomopatogenních hub

Životní/infekční cyklus entomopatogenních hub lze rozdělit do fází: (i) přichycení spor na povrch kutikuly hostitele, (ii) klíčení spor, (iii) penetrace kutikuly, (iv) překonání imunitních obranných reakcí hostitele, (v) proliferace a formování blastospor a hyf uvnitř těla hostitele, (vi) externí růst na usmrceném hostiteli a tvorba nových spor (Zimmermann 2007a).

Přichycení spor na povrch hostitele je iniciální fází životního cyklu. Při kontaktu s hostitelem se spory přednostně váží na povrch kutikuly – specifické mechanismy (např. funkce glykoproteinu), nebo mechanismy pasivní a nespecifické (např. elektrostatické a hydrofobní síly) (Fragues 1984). Klíčení spor začíná tvorbou penetrující hyfy (Boucias,

Pendland 1991), nebo hyfy a apresoria, jenž vytváří „penetrující kolík“, jímž za pomoci mechanického tlaku/enzymatické aktivity proniká přes kutikulu (Zacharuk 1970a; Zacharuk 1970b). Klíčovým prvkem vzniku patogenního vztahu je u *M. anisopliae* a *B. bassiana* tvorba apresoria (Clarkson, Charnley 1996). Produkce kutikulu-degradujících enzymů lipáz, proteáz a chitináz dále usnadňuje penetraci a poskytuje snadný zdroj živin (Charnley 1984). Po uhynutí hostitele nastává saprofytická fáze životního cyklu, kdy houba roste houbou uvnitř těla usmrčeného hostitele, mumifikuje ho a za příznivých podmínek dochází k externímu růstu mycelia, které sporuluje a dochází tak k šíření nákazy do prostředí.

1.5 Epizoocie způsobené entomopatogenními houbami

Infekce (epizoocie) způsobené entomopatogenními houbami jsou jednou z pozorovaných příčin kolapsu přemnožených populací hmyzu. Patologie hmyzu definuje epizoocii jako neobvykle velký počet případů napadení v populaci hostitele, avšak epizoocie se vyskytují sporadicky, jsou v daném místě omezené časově a charakterizované náhlou změnou prevalence. Entomopatogenní houby jsou neustále přítomné v populacích hostitelského hmyzu, nicméně pokud se hustota hostitelské populace nachází v normálu, epizoocie se vyskytují jen zřídka (enzootická fáze nákazy). Nicméně v průběhu přemnožení hmyzu se mohou entomopatogenní houby namnožit ve velké míře a šířit se v prostředí, čímž mohou významně přispět ke snížení populace (Fuxa, Tanada 1987).

1.6 Biotesty

Využití biotestů za účelem posouzení účinnosti entomopatogenních hub na hmyzí hostitele má v podstatě neomezené možnosti. Ovšem obecně zde nejsou standardizované metody biotestů, co se entomopatogenních hub jako celku týče. Biotesty musejí být opakovatelné a spolehlivé a mohou být prováděny za účelem kvantifikace vztahu hostitel-patogen (přesné určení patogenity a/nebo virulence, především ale pak virulence) a vlivu biotických a abiotických faktorů na tento interakční komplex (Burges, Thompson 1971; Butt, Goettel 2000). Biotesty entomopatogenních hub se využívají ve velké míře k: (i) determinaci virulence, (ii) srovnání virulence mezi jednotlivými izoláty, (iii) determinaci spektra hostitelů, (iv) determinaci epizootického potenciálu a (v) studiím vlivu biotických a abiotických faktorů (vliv vývojového stádia, hostitelské rostliny, teploty, vlhkosti, formulace přípravku). Cíle biotestu musejí být jasně definovány ještě před přijetím samotného postupu a ačkoli tyto postupy musejí být navrženy s důrazem na co nejvyšší účinnost, musejí být navrženy také tak, aby poskytovaly smysluplné výstupy (Butt, Goettel 2000). Variabilita výsledků může být způsobena kumulativní změnou jednotlivých komponent testu a z tohoto důvodu je nutné detailně standardizovat každou jednotlivou složku testu, především pak pokud je test ve fázi vývoje (Burges, Thompson 1971).

1.7 Stručná charakteristika vybraných druhů entomopatogenních hub

Beauveria bassiana (Balsamo-Criv.) Vuillemin

B. bassiana je kosmopolitně rozšířený druh entomopatogenní houby, jejíž hostitelské spektrum zabírá více než 700 druhů hmyzu (Goettel et al. 1990; Inglis et al. 2001) z řádů Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Diptera, Hemiptera, Orthoptera,

Siphonaptera, Isoptera, Thysanoptera, Mantodea, Neuroptera, Dermaptera, Blattariae, Embioptera (Zimmermann 2007a). *B. bassiana* ve výskytu preferuje především lesní prostředí, ačkoli byla často zaznamenána i na jiných stanovištích (Medo, Cagáň 2011). Životní cyklus probíhá především v půdním prostředí, nezdávka také na infikovaných jedincích mimo půdní niku (Meyling et al. 2011).

Beauveria caledonica Bissett & Widden

Tento druh entomopatogenní houby byl původně izolován z půdy ve Skotsku (Glare et al. 2008). Mycelium se vyznačuje bílou až oranžovobílou barvou. Hyfy jsou hyalinní, hladké. Konidiofory jsou „subclavatozního“ (kyjovitého) až krátce cylindrického tvaru, konidie cylindrického, mírně zakřiveného tvaru (Anonym 2013; Rehner et al. 2006). *B. caledonica* je v laboratorních biotestech vysoce patogenní vůči dospělým *Hylurgus ligniperda* (Curculionidae: Scolytinae) a larvám *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) (Glare et al. 2008) a je obecně asociovaná s přirozeným prostředím kůrovcovitých brouků a mohla by potenciálně sehrávat důležitou roli v biologické ochraně proti nim (Reay et al. 2008).

Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorok.

Rod *Metarhizium* je definován na základě uspořádání válcovitých fialid, nesoucích řetízky úzce válcovitých hyalinních spor, které jsou obecně zelené a vytvářejí kompaktní sloupce (Mycobank 2013; Zimmermann 2007b). Životní cyklus *M. anisopliae* probíhá převážně v půdním prostředí (Meyling et al. 2011), kde se za vhodných podmínek mohou rozvíjet epizoozie vedoucí k rychlému poklesu četnosti jedinců hostitelských populací (Pell et al. 2010). Hostitelské spektrum *M. anisopliae* představuje více než 200 druhů hmyzu, přičemž se jedná o řády: Coleoptera, Dermaptera, Diptera, Isoptera, Heteroptera, Homoptera, Hymenoptera, Isoptera, Lepidoptera, Orthoptera, Siphonaptera a Symphyla (Roberts a St Ledger 2004; Zimmermann 2007b).

Isaria fumosorosea Wize

Entomopatogenní houba *I. fumosorosea* (dříve *Paecilomyces fumosoroseus*) je v dnešní době dobře známým druhem s celosvětovým rozšířením v různorodých klimatických podmínkách (od tropického přes subtropické až po mírné pásmo) a širokým spektrem hostitelů (Lacey et al. 1996; Zimmermann 2008). Byla izolována z mnoha druhů bezobratlých (převážně z řádu Lepidoptera), ze vzduchu, rostlin a dále také z půdy (Zimmermann 2008), přičemž nejčastěji je zjištěna v půdních vzorcích odebraných z tzv. „agrárních valů“ (Medo, Cagáň 2011; Meyling, Eilenberg 2006).

2. CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této práce bylo ověřit „univerzální“ uplatnitelnost hodnocení vývoje nákazy entomopatogenních hub na vybraném cílovém hostitelském druhu hmyzu za použití stupnice FDI (Fungus Development Index). Tato stupnice nám dává možnost podrobnějšího hodnocení nákazy ve smyslu rozlišení jednotlivých fází vývoje patogena (v tomto případě tedy entomopatogenní houby). V práci šlo o to, zda stupnice může nalézt své opodstatnitelné využití v hodnocení vývoje nákazy obecně a zároveň komplexně, tzn. u jednotlivých rodů entomopatogenních hub, v rámci hodnocení vývoje nákazy na různých druzích hostitelů,

a v neposlední řadě také při hodnocení vývoje nákazy vyvolané rozdílnými typy spor entomopatogenních hub. Tato myšlenka/hlavní cíl práce, byla ověřována v rámci pěti dílčích studií.

Studie 1: Hodnocení účinnosti vybraných izolátů entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* a *Beauveria caledonica*, získaných v rámci plošného monitoringu na území Národního parku Šumava, na larvách potemníka moučného (*Tenebrio molitor*)

Hlavním cílem této studie bylo prosté porovnání účinnosti izolátů entomopatogenní houby *B. bassiana* a *B. caledonica* získaných v rámci monitoringu na území Národního parku Šumava na typově zvoleném cílovém hostiteli, a sice na larvách potemníka moučného (*T. molitor*).

Studie 2: Porovnání účinnosti dvou rozdílných typů spor entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* na larvy *Tenebrio molitor*

Porovnání dvou rozdílných typů spor s cílem zjistit, zda je či není mezi morfologicky odlišnými typy spor rozdíl co do schopnosti vyvolat onemocnění a pokud ano, tak jaký. Snahou bylo tedy zjistit, zda není jeden z typů spor schopen vyvolat rychlejší rozvoj nákazy v daných podmínkách inkubace za dané koncentrace spor.

Studie 3: Hodnocení účinnosti izolátů vybraných druhů entomopatogenních hub získaných odizolováním z komerčních biopreparátů na bezkřídlé partenogenetické samičky *Myzus persicae*

Cílem této studie bylo ověření využití čistých izolátů, na jejichž základě jsou postaveny komerční preparáty Botanigard ES (*B. bassiana*), Mycotal (*L. muscarium*), PreFeRal®WG (*I. fumosorosea*), v účinnosti na samičky *M. persicae* v laboratorních podmínkách.

Studie 4: Hodnocení účinnosti indigenních izolátů entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae* odizolovaných z půd obhospodařovaných konvenčním způsobem zemědělství

Tato studie byla komplexně zaměřena na hodnocení vybraných vlastností testovaných izolátů entomopatogenní houby *M. anisopliae* (klíčivost, radiální růst na umělém živném mediu, hodnocení účinnosti na larvy *T. molitor*) v rozdílných teplotách. Výběr kmenů byl proveden na základě morfologických odlišností středových kultur na PDA. Primárním cílem bylo najít vhodný izolát pro budoucí potenciální užití v rámci biologické ochrany rostlin proti půdním škůdcům, resp. stádiím škůdců prodávajícím část svého vývoje v půdním prostředí.

Studie 5: Posouzení účinnosti vybraných izolátů entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* a jejích pasází přes různé živné substráty na larvy zavíječe voskového *Galleria mellonella*

V této studii bylo snahou zjistit, zda mnohonásobné pasážování (padesátinásobné) vybraných izolátů *I. fumosorosea* přes dva hostitele ze třídy *Insecta* (*Bemisia tabaci*, *Aphis gossypii*), jednoho zástupce třídy *Arachnoidea* (*Tetranychus urticae*), umělé živné medium – PDA a přirozený živný substrát – otruby, nějakým způsobem ovlivňuje účinnost ve srovnání s účinností původních izolátů. Konečná účinnost byla testována na larvách *G. mellonella*.

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1 Pěstování kultur a příprava suspenze

Pro získání konidií byly kultury všech izolátů testovaných v jednotlivých studiích kultivovány na umělém živném mediu PDA (Potatoe Dextrose Agar, 24 g/l PDB, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Indie a 16 g/l agaru, Dr. Kulich Pharma s. r. o., Hradec Králové) v podobě separačních čar (14 dnů) či plošné kultury (7 dnů) bez přístupu světla a v teplotě 20 °C. Příprava blastospor byla provedena submerzní kultivací v PDB (Potatoe Dextrose Broth, 24 g/l PDB, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Indie), po dobu 7 dnů bez přístupu světla v teplotě 20 °C.

3.2 Standardní test klíčivosti

Na mikroskopické podložní sklíčko se nanese slabá vrstva 2% agaru (pro rody *Beauveria*, *Isaria*, *Lecanicilium*) či PDA (pro rod *Metarhizium*). Po zaschnutí agaru se na jeho povrch nanese pomocí 1μl inokulační kličky několik kapek suspenze o koncentraci 1×10^6 spor/ml. Po zaschnutí kapek se sklíčko přeneso do Petriho misky (90mm) s filtračním papírem navlhčeným 0,5 ml sterilní destilované vody. Inkubace probíhá při teplotě 20 °C a hodnotí se po uplynutí zvolené časové periody. Hodnotí se 100 náhodně vybraných spor pomocí světelného mikroskopu při 400 násobném zvětšení.

Součástí testu je index vývoje spor GI (Growth Index). Stupnice GI se skládá ze 7 indexů od 0 do 3 (hodnoceno po 0,5 stupních), kdy 0 se přiřazuje sporám bez známek vývoje, zatímco 3 sporám, na jejichž hyfálních vláknech jsou konidiofory s 3 a více viditelnými konidii.

3.3 Standardní laboratorní biotest vývoje nákazy na hostiteli

K hodnocení se používá stupnice FDI, která je postavena tak, že nákazu rozčlení do 7 fází vývoje, kde každé z těchto fází je přiřazen konkrétní index 0–3. Nula označuje stav, kde nejsou pozorovány změny ve vitalitě hostitele, naopak 3 označuje konečnou fázi nákazy, kde mycelium na povrch těla hostitelského druhu je plně vysporulováno. Stěžejním indexem je 1,5, který vyjadřuje prvotní příznak zjevné infekce v podobě jednotlivých hyf na povrchu těla hostitele.

3.4 Hodnocení mortality a infekce na cílovém hostiteli

Postup biotestu na larvách T. molitor a G. mellonella

Jako inkubační aréna slouží destička pro kultivaci tkáňových kultur o objemu jedné komůrky 6,5 ml, na jejíž dno se umístí sterilní filtrační papír (2×2 cm) navlhčený 0,150 ml sterilní destilované vody. Larvy o stejné velikosti (± 2 cm) se povrchově sterilují v 0,05% NaClO a následně okamžitě 3× opláchnou čistou sterilní destilovanou vodou a dají na sterilní filtrační

papír k oschnutí. Následně se larvy individuálně ponořují na 2–3 vteřiny do suspenze o dané koncentraci spor (viz jednotlivé studie). Ošetřené larvy se po jedné umístí do komůrek. Pro každou variantu (izolát) se připraví 25 larev ve 3 opakováních. U kontrolní varianty se larvy ponoří na 2–3 vteřiny do roztoku 0,05% Tweenu 80. Inkubační arény se vloží do igelitového sáčku a inkubace probíhá v teplotě 20 °C, bez přístupu světla. Účinnost se hodnotí každý den po dobu celého testu pomocí binokulárního mikroskopu, kdy se rozlišují živé, mrtvé (kumulovaná mortalita) a zjevně infikované larvy.

*Postup biotestu na bezkřídlých partenogenetických samičkách *M. persicae**

Při tomto hodnocení není používán index 0,5 z důvodu nemožné identifikace melanizačních skvrn na povrchu těla hostitele. Na spodní stranu vyzrálého listu papriky seté se den před ošetřením vloží cca 35 bezkřídlých partenogenetických samiček mšice broskvoňové, přednostně na středovou žílu listu. List se samičkami se položí svrchní stranou do Petriho misky (90 mm), která obsahuje vrstvu 2% agaru. Po 24 hodinách se list vyjme a ošetří suspenzí konidií daných izolátů pomocí ručního tlakového postřikovače a následně se uloží do flow boxu k oschnutí. Po oschnutí se zkoriguje koncový počet samiček na listu na 25 (připraví se 3 opakování). Kontrola se ošetřuje 0,05% roztokem TWEEN 80, opět se připraví 3 opakování po 25 jedincích. Inkubace probíhá v 25 °C bez přístupu světla. Účinnost se hodnotí ve vybrané dny v průběhu testu.

3.5 Studie 1

- V pokusech bylo použito 40 izolátů druhu *B. bassiana* a 23 izolátů druhu *B. caledonica*, které byly získány v rámci monitoringu v Národním parku Šumava.
- Konidie byly kultivované v podobě separačních čar na PDA.
- Suspenze konidií byla adjustována na konečnou koncentraci 1×10^6 konidií/ml.
- Hodnocení klíčivosti pomocí standardního testu
- Hodnocení účinnosti na larvách potěmníka moučného *T. molitor*, inkubace probíhala při 20 °C bez přístupu světla po dobu 10 dnů.

3.6 Studie 2

- Ve studii byl používán izolát *B. bassiana* I101 získaný v Národním parku Šumava.
- Konidie byly získány z plošné kultury na PDA.
- Suspenze konidií byla adjustována na koncentraci 1×10^5 , 1×10^6 a 1×10^7 konidií/ml.
- Blastospory byly získány ze submerzní kultivace v 1 litru PDB v 2000ml Erlenmeyerově baňce na orbitální třepačce při 100 otáčkách/min ve 20 °C bez přístupu světla po dobu 7 dnů. Do kultivačního media byly vneseny 2 terčíky (cca 2×2 cm) vyřízlé z 14denní plně vysporulované kultury.
- Následně byl obsah Erlenmeyerovy baňky rozdělen na 2 díly po 500 ml, kdy:
 - a) z prvního dílu byla opět připravena suspenze blastospor pomocí 0,05% roztoku TWEEN 80 a adjustována na koncentraci 1×10^5 , 1×10^6 a 1×10^7 konidií/ml.
 - b) druhý díl (500 ml) byl odstředěn a po odebrání natantu opět resuspendován v 1 litru sterilní destilované vody a znovu odstředěn. Postup byl zopakován celkem 3×. Následně byla připravena suspenze blastospor pomocí 0,05%

roztoku TWEEN 80 a adjustována na konečnou koncentraci 1×10^5 , 1×10^6 a 1×10^7 konidií/ml.

- Klíčivost byla hodnocena v intervalu 2 hodin po dobu 24 hodin od založení testu.
- Hodnocení účinnosti na larvách *T. molitor*, inkubace probíhala při 20 °C bez přístupu světla po dobu 10 dnů.

3.7 Studie 3

- Z komerčních preparátů Botanigard ES (*B. bassiana*), Mycotal (*L. lecanii*), PreFeRal[®]WG (*I. fumosorosea*) byly odizolovány čisté kultury daných izolátů na PDA.
- Kultivace v podobě separačních čar na PDA.
- Suspenze adjustována na koncentraci 1×10^6 konidií/ml.
- Hodnocení klíčivosti pomocí standardního testu
- Účinnost na bezkřídlé partenogenetické samičky mšice broskvoňové (*M. persicae*)
- Inkubace probíhala v 25 °C v podmínkách bez přístupu světla po dobu 10 dnů.
- Hodnocení probíhalo 2., 4., 7. a 10. den od založení testu.

3.8 Studie 4

- Izoláty *M. anisopliae* získané při monitoringu půd v konvenčním režimu zemědělství v letech 2010 a 2011. Odběr půdy byl proveden z hloubky cca 20 cm a izolace proběhla přes PDA+dodine. Celkem bylo hodnoceno 8 izolátů vykazujících různé morfologické znaky kultur.
- Konidie byly získány z plošné kultury na PDA.
- Suspenze konidií adjustována na koncentraci 1×10^6 konidií/ml.
- Hodnocení klíčivosti pomocí standardního testu
- Kultivace středových kultur na umělém živném mediu PDA ve 4 opakováních při teplotě 10; 15 a 20 °C po dobu 3 týdnů bez přístupu světla.
- Kultury byly vyhodnoceny: a) zjištěním průměru kultury (změření 2 na sebe kolmých rozměrů a vypočítání průměr kultury); b) kultura byla homogenizována ve sterilní destilované vodě se smáčedlem (0,05% Tween 80), a poté byla stanovena koncentrace spor a vypočítána výtěžnost konidií na kulturu.
- Hodnocení účinnosti na larvách potměníka moučného (*T. molitor*) v teplotě 10; 15 a 20 °C bez přístupu světla po dobu 10 dnů.

3.9 Studie 5

- Kmen *I. fumosorosea* izolovaný z komerčního produktu PFR97 – referenční kmen.
- Porovnání izolátů *I. fumosorosea* 172 a 173 vykazujících odlišnosti v morfologii.
- Porovnání 50. pasáží izolátů 172 a 173, získaných pasážováním přes živné substráty, resp. živná media (konidie po konidiogenezi byly přenášeny z jedinců předešlé pasáže dotykem s jedinci v následné pasáži, v případě otrub a PDA byly konidie přeneseny inokulační klíčkou na nový živný substrát/medium.
- Konidie ze separačních čar na PDA.
- Suspenze adjustována na koncentraci 1×10^6 konidií/ml.
- Klíčivost hodnocena podle standardního testu klíčivosti.

- Hodnocení účinnosti na larvách zavíječe voskového (*G. mellonella*)
- Inkubace probíhala v 20 °C v podmínkách bez přístupu světla po dobu 10 dnů.

Tabulka 1.1: Označení pasáží původních izolátů entomopatogenní houby *I. fumosorosea*

Substrát/živná půda	Kód pasáže	
	Původní izolát 172	Původní izolát 173
otruby	H ₅	H ₃₀
<i>B. tabaci</i>	H ₁₀	H ₃₅
<i>A. gossipi</i>	H ₁₅	H ₄₀
<i>T. urticae</i>	H ₂₀	H ₄₅
PDA	H ₂₅	H ₅₀

3.10 Statistické analýzy

Data vyjádřená v hodnotách procent byla normalizována pomocí arcsinové transformace, zatímco hodnoty sporulace středových kultur byly normalizovány za využití logaritmické transformace $\log_{10}(x+1)$. Údaje týkající se radiálního růstu normalizovány nebyly. Výše uvedené údaje byly následně podrobeny analýze rozptylu (ANOVA) pomocí softwaru pro statistickou analýzu (StatSoft Inc. 2007). Rozdíly mezi středními hodnotami byly porovnány pomocí Tukeyho testu ($P < 0,05$). Co se týká hodnot FDI a GI, byly tyto hodnoty podrobeny porovnání za využití neparametrického testu, a to sice Kruskal-Wallisově ANOVĚ ($P < 0,05$) s následným vícenásobným porovnáním průměrných hodnot ke zjištění rozdílů mezi jednotlivými testovanými variantami.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

4.1 Studie 1: Hodnocení účinnosti vybraných izolátů entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* a *Beauveria caledonica*, získaných v rámci plošného monitoringu na území Národního parku Šumava, na larvách potemníka moučného (*Tenebrio molitor*)

Hodnocení druhu B. bassiana

Klíčivost spor 40 izolátů houby *B. bassiana* se po 24 hodinách pohybovala v rozmezí 91,33–99,67 % a mezi variantami nebyly statisticky prokazatelné odlišnosti. Hodnoty vývoje spor stanovené pomocí stupnice GI byly v rozmezí 1,82–1,98, s výjimkou izolátů NP0083 a NP0097, které dosáhly hodnoty GI 1,04, resp. 1,18, které byly prokazatelně odlišné od ostatních izolátů ($H_{(39, N=11700)}=2617,580, P=0,000$).

Mortalita larev *T. molitor* se začala objevovat 3. den od zahájení biotestu u 7 izolátů. Od 4. do 6. dne byly mezi hodnotami statistické odlišnosti. V polovině testu (5. den) byla u 4 izolátů zjištěna 100% mortalita larev *T. molitor*, ostatní hodnoty se pohybovaly od 0 do 87,50 %. Průběh infekce kopíroval průběh mortality s o něco nižšími hodnotami, 100% infekce byla zjištěna po ošetření suspenzí konidií 3 izolátů. U ostatních izolátů se infekce projevila u 4,17–83,33 %. Osmý den hodnocení byla mortalita vyvolaná 22 izoláty *B. bassiana* 100%, u zbylých izolátů byla zjištěna hodnota v rozmezí 79,17–95,83 %. Devátý a 10. den pak hodnota mortality kolísala shodně v rozmezí 87,5–100 %. Hodnoty infekce byly 8. den

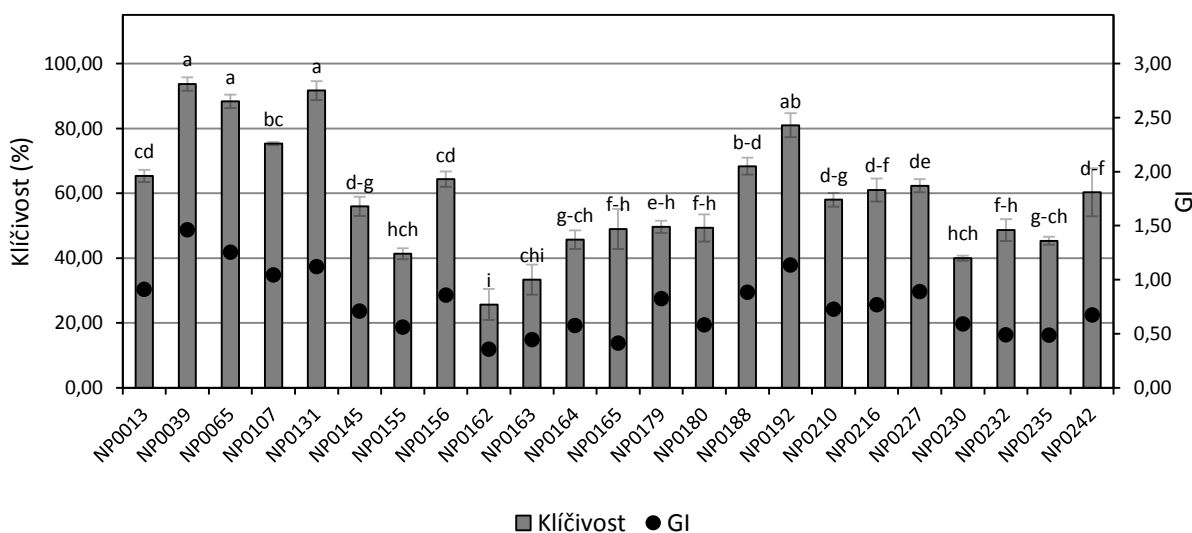
v rozmezí 62,5–100 %. Devátý a 10. den se infekce larev pohybovala v rozmezí 83,3–100 %, a mezi hodnotami nebyly statisticky prokazatelné odlišnosti.

V hodnocení FDI nebylo dosaženo průměrné hodnoty indexu 3,00, 17 z testovaných izolátů dosáhlo hodnoty indexu 2,50–2,69 (nejvyšší hodnota u larev ošetřených suspenzí konidií izolátu NP0008). U zbylých izolátů, s výjimkou izolátu NP0004 (hodnota indexu 1,94), byly hodnoty indexu v rozmezí 2,00–2,46.

„Kritické“ hodnoty 1,50 dosáhly první izoláty (I101, NP0027, NP00138 a NP0238) mezi 4. a 5. dnem, zatímco izolát NP0028 dosáhl této hodnoty nejpozději, a to mezi 8. a 9. dnem. Z ostatních izolátů jich 12 dosáhlo sledovanou hodnotu mezi 5. a 6. dnem, 6 izolátů pak mezi 6. a 7. dnem a zbylých 17 izolátů mezi 7. a 8. dnem.

Hodnocení druhu *B. caledonica*

Graf 4.1: Hodnoty klíčivosti a GI spor *B. caledonica* po inkubaci ve 20 °C po dobu 24 hodin



V klíčivosti konidií po 24 hodinách byly zjištěny prokazatelné rozdíly ($F=58,261$, df 22, 46, $P=0,0000$), stejně jako u GI ($H_{(22, N=6900)}=915,6265$, $P=0,000$), kde nejvyšší hodnoty indexu bylo dosaženo u konidií izolátu NP0039 (1,46) a nejnižší u konidií izolátu NP0162 (0,36). Pouze 5 z testovaných izolátů dosáhlo hodnoty GI vyšší než 1,00.

První příznaky mortality larev byly pozorovány 3. den po ošetření izoláty NP0131 (4,17 %), NP0192 (8,33 %) a NP00227 (4,17 %). V polovině testu (5. den) byla pozorována mortalita larev u 14 izolátů, kde prokazatelně nejvyšší hodnota byla způsobena izolátem NP0227 (37,50 %) ($F=1,8586$, $df=23,24$, $P=0,06934$). U zbylých izolátů se mortalita larev pohybovala v rozmezí 0–12,50 %. Příznaky zjevné infekce byly zjištěny pouze u izolátů NP0131 (4,17 %), NP 0191 (4,17 %) a NP0227 (20,88). Osmý den dosáhl jako první a současně jediný izolát NP0145 100% mortality larev, pro ostatní izoláty byla hodnota v rozmezí 20,83–95,83 %. Infekce larev byla pozorována pro všechny testované izoláty, nejvyšší hodnota byla po ošetření suspenzí izolátu NP0227 (62,50 %). Devátý den byla 100% mortalita larev u 3 izolátů, u ostatních mortalita pohybovala mezi 29,17–95,83 %, infekce pak v rozmezí 29,17–87,5 %. Desátý den další izolát 100% mortality nedosáhl, nejnižší hodnota pro izolát

NP0131 se nezměnila, interval u zbylých hodnot byla spodní hranice 70,83 %, u infekce byla hodnota 100 % pozorována u 2 izolátů.

Poslední den hodnocení byla průměrná hodnota FDI pro 14 z testovaných izolátů vyšší než 1,50, nejvyšší průměrné hodnoty dosáhl izolát NP0230 (1,88), pouze izolát NP0131 nepřekročil hodnotu indexu 1,00. U ostatních osmi izolátů se hodnota indexu pohybovala v rozmezí 1,13–1,46.

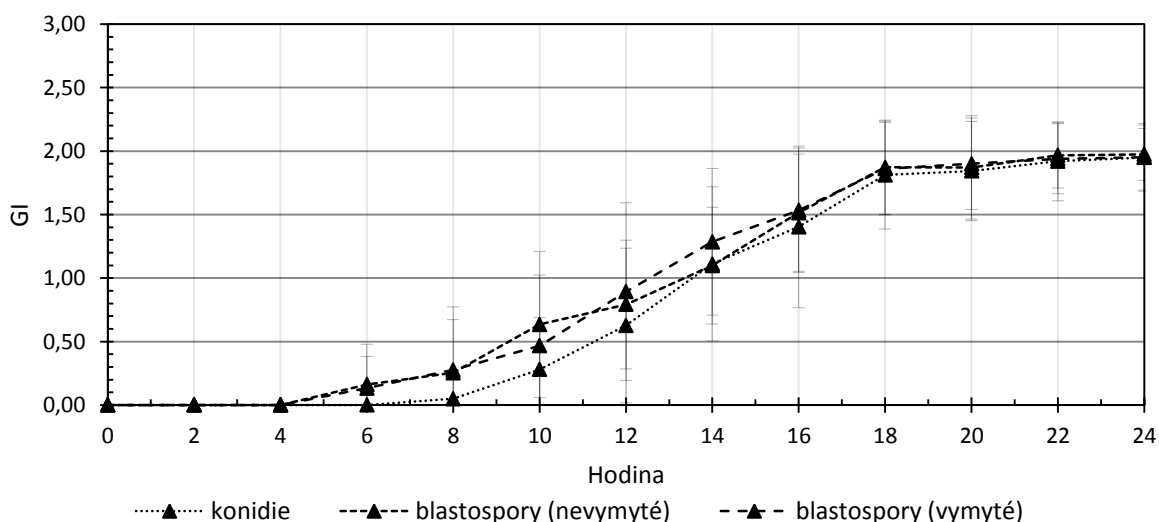
„Kritické“ hodnoty dle stupnice FDI, tj. indexu 1,50, bylo dosaženo pouze u 14 z celkem 23 testovaných izolátů, z toho pro izoláty NP0164, NP0227, NP0230 a NP0242 mezi 8. a 9. dnem, u zbylých 10 izolátů pak mezi 9. a 10. dnem.

4.2 Studie 2: Porovnání účinnosti dvou rozdílných typů spor entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* na larvy *Tenebrio molitor*

Nejpomalejší vývoj vykazovaly konidie získané z povrchové kultury *B. bassiana* (8 % po 8 hodinách), zatímco klíčivé blastospory byly zaznamenány již po 6 hodinách v obou variantách. Statisticky prokazatelná odlišnost byla v časovém rozmezí 6 až 12 hodin ($P < 0,05$). Nejrychleji klíčily blastospory z nevytřené submerzní kultury, po 12 hodinách byly hodnoty u vytřené a nevytřené blastospor srovnatelné ($F = 20\ 669$; $df = 2, 6$; $P = 0,00204$). Po 24 hodinách byla dosažena klíčivost 98,33–99 %.

U vývoje spor byly v rozmezí 6–14 hodin zjištěny prokazatelné rozdíly mezi konidiami a zbylými dvěma variantami, kdy GI konidií byl nižší než u obou variant blastospor. Po 16 hodinách již nebyly pozorovány prokazatelné rozdíly.

Graf 4.2: Průběh klíčivosti daného typu spor entomopatogenní houby *B. bassiana* (izolát Bba I 101) o koncentraci 1×10^6 spor/ml během 24hodinového testu



Koncentrace 1×10^5 spor/ml

Hodnoty mortality po ošetření suspenzí konidií byly 6. až 8. den prokazatelně nejvyšší, v posledních dvou dnech byly statisticky srovnatelné s hodnotami získanými ve variantě

s nevytými blastosporami. Stejně tak u procenta infikovaných jedinců nebyly prvních 5 dnů zjevné rozdíly mezi variantami, 6. až 9. den bylo nejvíce infikovaných jedinců u varianty ošetření suspenzí konidií, poslední den byly hodnoty infekce larev u varianty s konidiemi a varianty s nevytými blastosporami statisticky shodné ($F=278,12$; $df=3, 8$; $P=0,0000$).

Tabulka 4.2: Vývoj nákazy dle stupnice FDI u larev *T. molitor* po ošetření suspenzí daného typu spor entomopatogenní houby *B. bassiana* (izolát Bba I 101) o koncentraci 1×10^5 spor/ml během 10denního biotestu (průměr \pm SD)

Den	Ošetření			
	kontrola	konidie	blastospor	
			nevytý	vytý
1.	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00
2.	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00
3.	0 \pm 0,00	0,04 \pm 0,14	0,12 \pm 0,21	0,05 \pm 0,15
4.	0 \pm 0,00	0,46 \pm 0,17	0,47 \pm 0,11	0,38 \pm 0,23
5.	0 \pm 0,00	0,53 \pm 0,16	0,50 \pm 0,00	0,49 \pm 0,10
6.	0 \pm 0,00	0,90 \pm 0,51	0,63 \pm 0,31	0,59 \pm 0,26
7.	0 \pm 0,00	1,35 \pm 0,57	0,98 \pm 0,58	0,80 \pm 0,53
8.	0 \pm 0,00	1,87 \pm 0,59	1,52 \pm 0,71	1,12 \pm 0,67
9.	0 \pm 0,00	2,07 \pm 0,53	1,75 \pm 0,64	1,36 \pm 0,72
10.	0 \pm 0,00	2,26 \pm 0,51	1,99 \pm 0,60	1,60 \pm 0,82

Hodnota indexu 1,50 byla u larev ošetřených suspenzí konidií dosažena mezi 7. a 8. dnem, u larev ošetřených suspenzí blastospor nevytých a vytých ze submerzního media pak 8. den, respektive mezi 9. a 10. dnem inkubace.

Koncentrace 1×10^6 spor/ml

Tabulka 4.3: Vývoj nákazy dle stupnice FDI u larev *T. molitor* po ošetření suspenzí daného typu spor entomopatogenní houby *B. bassiana* (izolát Bba I 101) o koncentraci 1×10^6 spor/ml během 10denního biotestu (průměr \pm SD)

Den	Ošetření			
	kontrola	konidie	blastospor	
			nevytý	vytý
1.	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00
2.	0 \pm 0,00	0,13 \pm 0,20	0,10 \pm 0,20	0,11 \pm 0,21
3.	0 \pm 0,00	0,45 \pm 0,18	0,36 \pm 0,23	0,36 \pm 0,23
4.	0 \pm 0,00	0,55 \pm 0,12	0,50 \pm 0,14	0,54 \pm 0,20
5.	0 \pm 0,00	0,89 \pm 0,39	0,94 \pm 0,51	0,67 \pm 0,38
6.	0 \pm 0,00	1,51 \pm 0,46	1,53 \pm 0,65	1,23 \pm 0,72
7.	0 \pm 0,00	2,04 \pm 0,45	2,07 \pm 0,58	1,87 \pm 0,70
8.	0 \pm 0,00	2,32 \pm 0,34	2,36 \pm 0,34	2,18 \pm 0,61
9.	0 \pm 0,00	2,51 \pm 0,30	2,56 \pm 0,26	2,39 \pm 0,50
10.	0 \pm 0,00	2,84 \pm 0,39	2,75 \pm 0,25	2,59 \pm 0,50

U této koncentrace 1×10^6 spor/ml již nebyly rozdíly tak markantní, nejnižších hodnot v obou ukazatelích bylo dosahováno u varianty ošetření suspenzí vymytých blastospor. Rozdíl mezi mortalitou vyvolanou konidiami a nevymytými blastosporami nebyl v průběhu hodnocení statisticky prokazatelný ($P < 0.05$) (s výjimkou 7. dne). U varianty se vzdušnými konidiami a nevymytými blastosporami byl počet infikovaných jedinců statisticky shodný v průběhu celého hodnocení, hodnoty u varianty s vymytými blastosporami se s předchozími dvěma statisticky vyrovnaly od 8. dne biotestu ($F=179,49$; $df=3, 8$; $P=0,0000$).

Šestý den bylo po ošetření suspenzí konidií a nevymytých blastospor dosaženo hodnoty 1,51, resp. 1,53, zatímco po ošetření suspenzí vymytých blastospor, bylo hodnoty 1,50 dosaženo mezi 6. a 7. dnem.

Koncentrace 1×10^7 spor/ml

U suspenze o koncentraci 1×10^7 spor/ml byly pozorované rozdíly mezi variantami minimální. Mírně nižších hodnot tentokrát dosahovala varianta, kde byly larvy ošetřené suspenzí konidií. Ovšem rozdíly byly velmi malé a statistická odlišnost byla zjištěna pouze 6. den biotestu ($F=478,69$; $df=3, 8$; $P=0,0000$).

Tabulka 4.4: Vývoj nákazy dle stupnice FDI u larev *T. molitor* po ošetření suspenzí daného typu spor entomopatogenní houby *B. bassiana* (izolát Bba I 101) o koncentraci 1×10^7 spor/ml během 10denního biotestu (průměr \pm SD)

Den	Ošetření			
	kontrola	konidie	blastospor	
			nevymyté	vymyté
1.	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00
2.	0 \pm 0,00	0,21 \pm 0,25	0,17 \pm 0,24	0,15 \pm 0,23
3.	0 \pm 0,00	0,50 \pm 0,14	0,49 \pm 0,08	0,49 \pm 0,18
4.	0 \pm 0,00	1,05 \pm 0,51	1,23 \pm 0,52	1,23 \pm 0,44
5.	0 \pm 0,00	1,77 \pm 0,60	2,06 \pm 0,50	1,87 \pm 0,54
6.	0 \pm 0,00	2,24 \pm 0,49	2,35 \pm 0,42	2,33 \pm 0,36
7.	0 \pm 0,00	2,40 \pm 0,25	2,46 \pm 0,20	2,47 \pm 0,15
8.	0 \pm 0,00	2,60 \pm 0,20	2,58 \pm 0,18	2,58 \pm 0,18
9.	0 \pm 0,00	2,79 \pm 0,25	2,79 \pm 0,25	2,81 \pm 0,24
10.	0 \pm 0,00	2,87 \pm 0,22	2,86 \pm 0,23	2,87 \pm 0,22

Statistické hodnocení neprokázalo v celém průběhu testu rozdíl ve vývoji nákazy dle stupnice FDI mezi variantami. Indexu 1,50 bylo u všech tří variant dosaženo mezi 4. a 5. dnem.

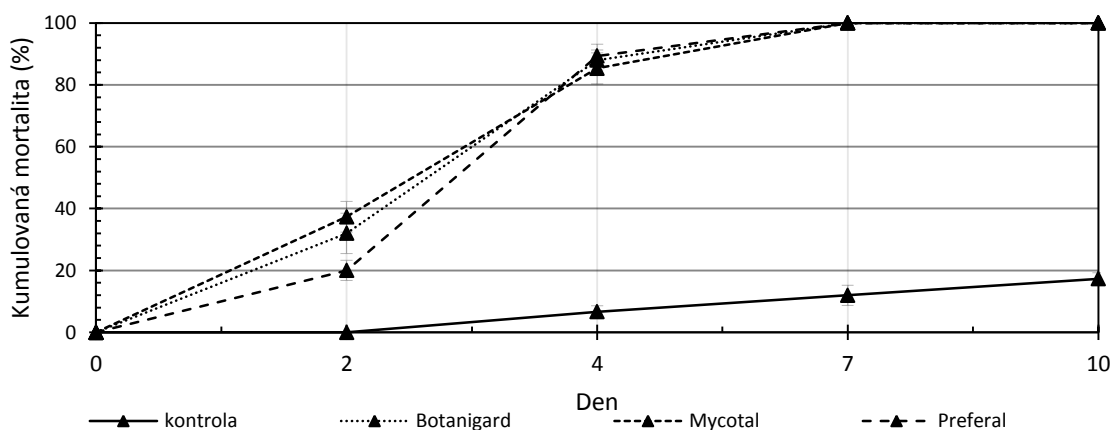
4.3 Studie 3: Hodnocení účinnosti izolátů získaných z komerčních biopreparátů na bezkřídlé partenogenetické samičky *Myzus persicae*

Tabulka 4.5: Hodnoty klíčivosti a GI testovaných izolátů komerčních přípravků stanovené po 24hodinové inkubaci v teplotě 25 °C

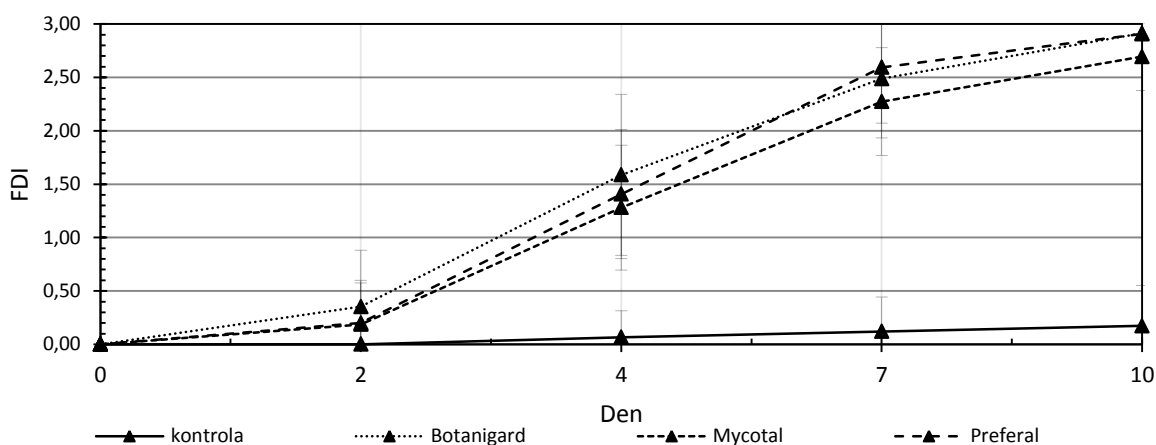
Izolát	Klíčivost (%)	GI
Izolát přípravku Botanigard ES	99,00±0,82	1,94±0,27
Izolát přípravku Mycototal	97,67±1,70	1,89±0,36
Izolát přípravku Preferal®WG	98,33±1,25	1,92±0,33

100% mortalita samiček *M. persicae* byla dosažena již 7. den hodnocení. Mortalita v kontrolní variantě byla 17,33 %. Infekce měla sice mírně pomalejší nástup, ale stejně jako u mortality byla hodnota 100 % zjištěna již 7. den u všech variant.

Graf 5.38: Průběh mortality samiček *M. persicae* po ošetření suspenzí izolátů komerčních preparátů Botanigard, Mycototal a Preferal o koncentraci 1×10^6 konidií/ml; inkubace v 25 °C, po dobu 10 dnů



Graf 5.40: Vývoj nákazy (FDI) u samiček *M. persicae* po ošetření suspenzí izolátů získaných z komerčních preparátů Botanigard, Mycototal a Preferal o koncentraci 1×10^6 konidií/ml



Na začátku biotestu byl zjištěn prokazatelně rychlejší vývoj spor *B. bassiana* (Botanigard). Sedmý den pak nejpomalejšího vývoje dosáhly spory *L. lecanii* (Mycotal) a hodnoty byly prokazatelně odlišné od přípravku Preferal. Na konci hodnocení pak byly výsledky získané s konidii izolovanými z přípravků Botanigard a Preferal shodné.

4.4 Studie 4: Hodnocení účinnosti indigenních izolátů entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae* odizolovaných z půd konvenčně obhospodařovaných konvenčním způsobem

Klíčivost a vývoj spor *M. anisopliae* byli závislé na použité teplotě a zároveň na konkrétním izolátu. Prokazatelně nejnižší hodnoty byly ve všech teplotách zjištěny u izolátů 110108 a 110111. GI vykazoval nejvyšší statistické odlišnosti mezi jednotlivými izoláty při odnocení v 15 °C po 24 i 48 hodinách, naopak nejvyrovnanější vývoj byl zaznamenán ve 20 °C.

Stejně jako u klíčivosti i u hodnocení radiálního růstu byly mezi izoláty prokazatelné odlišnosti, nejmenší kultury vytvořily opět spory izolátů 110108 a 110111.

Tabulka 5.9: Radiální růst a sporulace jednotlivých izolátů po 3týdenní kultivaci na živné půdě PDA (průměr %±SD)

Kód izolátu	10 °C		15 °C		20 °C	
	Počet spor na kulturu	Velikost kultury (mm)	Počet spor na kulturu	Velikost kultury (mm)	Počet spor na kulturu	Velikost kultury (mm)
F 52	5,23±0,33×10 ⁶ a	11,63±0,48 a	2,66±0,11×10 ⁸ c	31,13±0,78 a	1,24±0,09×10 ⁹ b	49,63±1,49 a
110102	2,16±0,23×10 ⁵ b	10,88±0,33 b	2,63±0,10×10 ⁸ c	24,88±0,78 b	1,16±0,10×10 ⁹ b	44,25±1,79 d
110105	0±0,00 d	9,50±0,50 c	3,36±0,14×10 ⁸ b	22,50±0,50 c	3,89±0,45×10 ⁸ d	46,25±0,66 bc
110106	0±0,00 d	9,13±0,33 cd	3,53±0,16×10 ⁸ b	25,00±1,00 b	1,58±0,02×10 ⁹ a	50,00±0,50 a
110108	0±0,00 d	3,25±0,43 e	6,63±0,27×10 ⁷ d	15,88±0,60 e	3,01±0,21×10 ⁸ e	37,00±1,12 e
110110	0±0,00 d	11,00±0,00 ab	4,23±0,10×10 ⁷ f	22,63±0,48 c	1,28±0,09×10 ⁸ f	44,75±1,30 cd
110111	0±0,00 d	3,25±0,43 e	4,28±0,16×10 ⁷ f	14,75±0,66 e	1,20±0,06×10 ⁸ f	32,38±0,48 f
110112	6,00±1,54×10 ⁴ c	8,75±0,43 d	4,43±0,18×10 ⁸ a	30,38±0,48 a	1,88±0,09×10 ⁹ a	47,00±0,50 bc
110113	0±0,00 d	9,75±0,43 c	5,47±0,18×10 ⁷ e	19,13±0,78 d	6,60±0,58×10 ⁸ c	37,88±1,62 e

* Hodnoty ve stejném sloupci označené stejným písmenem nejsou statisticky významně odlišné, P<0,05 (ANOVA, Tukeyho test).

Mortalita i rozvoj infekce v 10 °C probíhali nejpomaleji po aplikaci spor izolátů 110108 a 110111. První příznaky infekce na larvách *T. molitor* se pojevíly již 4. den v podobě melanizačních skvrn. Po ukončení biotestu byly hodnoty FDI v rozmezí 1,1–1,27, pouze u izolátů 110108 a 110111 byly hodnoty FDI 0,27 a 0,29.

V 15 °C byl průběh mortality rychlejší, začala se objevovat 6. den a po 11 dnech izolát 110102 vyvolal 100% mortalitu, po 12 dnech byla mortalita 100 % téměř u všech izolátů s výjimkou izolátů 110108 a 110111, které vykazovaly nejnižší hodnoty. Obdobný trend byl pozorován i u infekce. První známky infekce se objevily již 4. den. „Kritická“ hodnota 1,50 ve vývoji nákazy byla dosažena 12. den u larev ošetřených suspenzí konidií izolátů 110102, 110112 a 110113. Ostatní izoláty dosáhly FDI 1,50 v následujících dnech, nejpozději se tak stalo u izolátu 110111, který ji dosáhl až mezi 18. a 19. dnem.

V teplotě 20 °C byl průběh hodnocených ukazatelů nejrychlejší. Již osmý den bylo u všech variant (s výjimkou izolátu 110108 a 110111) dosaženo hodnoty mortality téměř 100 %. Kritická hodnota FDI 1,50 byla dosažena u izolátů F 52 a 110102 mezi 6. a 7. dnem, u izolátů 110105 a 110112 pak 7. den (izolát 110105 dosáhl hodnoty FDI „pouze“ 1,49), u izolátů 110110 a 110113 mezi 7. a 8. dnem, izolát 110106 pak mezi 8. a 9. dnem a izoláty 110108 a 110111 pak 9–10. den.

4.5 Studie 5: Posouzení účinnosti vybraných izolátů entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* a jejich pasáží přes různé živné substráty na larvy zavíječe voskového *Galleria mellonella*

Klíčivost spor se po 24 hodinách pohybovala v rozmezí 97–100 %. Hodnoty GI se pohybovaly v intervalu 1,89–1,99.

Průběh mortality a infekce byl prakticky shodný. Mortalita byla závislá na médiu, přes které probíhalo pasážování. Po pasážování přes umělé živné média byla mortalita 100 % zjištěna po 5 dnech. Vysoké hodnoty mortality byly zjištěny i při pasážování přes otruby, kdy vývoj mortality larev byl rychlejší než při pasážování přes *B. tabaci* a *A. gossypii* a v začátcích hodnocení pasáže izolátu 172 výrazně převýšily hodnoty mortality dosažené s oběma původními izoláty.

Spory *I. fumosorosea* pasážované přes tři živé hostitelské organismy vykazovaly pomalejší průběh mortality než většina ostatních substrátů, zejména pak při pasážování přes *B. tabaci* a *A. gossypii*. Pasážováním přes *T. urticae* nedošlo k výraznějšímu ovlivnění virulence spor *I. fumosorosea* na larvy *G. mellonella*.

Index 1,5 byl u referenčního kmene PFR97 dosažen 3. den hodnocení a již 8. den dosáhl vývoj posledního stádia (index 3,00). U ostatních variant bylo kritické hodnoty v případě původních izolátů 172 a 173 dosaženo mezi 4. a 5., resp. 3. a 4. dnem hodnocení. V případě pasáží přes *B. tabaci* (H₁₀, H₃₅), *A. gossypii* (H₁₅, H₄₀) a *T. urticae* (H₂₀, H₄₅), bylo dosažení hodnoty 1,50 zjištěno mezi 6. a 7. dnem v případě pasáže H₁₀, mezi 5. a 6. dnem v případě pasáže H₁₅ a mezi 4. a 5. dnem v případě pasáže H₂₀. U pasáží původního izolátu 173 bylo dosažení kritické hodnoty 1,50 pozorováno mezi 4. a 5. dnem v případě pasáže H₃₅, mezi 3. a 4. dnem v případě pasáže H₄₀ a mezi 3. a 4. dnem v případě pasáže H₅₀. U pasáží H₅ a H₃₀ byla hodnota indexu vývoje nákazy 1,50 dosažena mezi 3. a 4. dnem, resp. mezi 5. a 6. dnem. V případě pasáží H₂₅ a H₅₀, bylo hodnoty indexu vývoje 1,50 dosaženo shodně v obou případech mezi 3. a 4. dnem. Z výsledků je patrné, že k dosažení hodnoty 1,5 došlo v průběhu 3 dnů u všech testovaných variant.

Tabulka 5.16: Vývoj nákazy na larvách *G. mellonella* v průběhu 10denního biotestu vyjádřený pomocí stupnice FDI po ošetření suspenzí konidií houby *I. fumosorosea* o koncentraci 1×10^6 spor/ml v 20 °C, které byly pasážovány přes různé hostitele a média

Testovaná varianta	Den									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Kontrola	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,01±0,08	0,03±0,12	0,09±0,21	0,16±0,31	0,20±0,34	0,21±0,35	0,25±0,38
PFR-97	0,50±0,00	0,50±0,00	1,45±0,22	1,95±0,20	2,56±0,26	2,95±0,15	2,99±0,08	3,00±0,00	3,00±0,00	3,00±0,00
172	0,50±0,00	0,50±0,00	0,56±0,20	1,19±0,58	1,73±0,48	2,01±0,19	2,27±0,27	2,66±0,26	2,81±0,24	2,92±0,18
173	0,50±0,00	0,50±0,00	0,71±0,39	1,58±0,57	2,12±0,30	2,59±0,32	2,84±0,23	2,95±0,15	3,00±0,00	3,00±0,00
H5	0,45±0,15	0,50±0,00	1,25±0,46	1,87±0,32	2,41±0,21	2,83±0,24	3,00±0,00	3,00±0,00	3,00±0,00	3,00±0,00
H10	0,19±0,24	0,50±0,00	0,54±0,20	0,62±0,32	0,90±0,57	1,30±0,74	1,69±0,71	2,07±0,86	2,41±0,84	2,43±0,83
H15	0,27±0,25	0,50±0,00	0,51±0,11	0,83±0,47	1,15±0,68	1,72±0,68	2,07±0,76	2,58±0,74	2,63±0,72	2,65±0,71
H20	0,11±0,20	0,50±0,00	0,59±0,28	1,12±0,53	1,64±0,57	2,11±0,61	2,63±0,41	2,96±0,14	3,00±0,00	3,00±0,00
H25	0,43±0,17	0,50±0,00	0,77±0,44	1,77±0,35	2,35±0,27	2,75±0,25	2,97±0,12	3,00±0,00	3,00±0,00	3,00±0,00
H30	0,05±0,15	0,50±0,00	0,59±0,29	0,88±0,52	1,39±0,66	1,88±0,34	2,33±0,30	2,67±0,31	2,95±0,15	2,99±0,08
H35	0,37±0,22	0,50±0,00	0,57±0,25	1,21±0,56	1,73±0,65	1,95±0,69	2,34±0,69	2,69±0,51	2,81±0,47	2,89±0,30
H40	0,35±0,12	0,50±0,00	0,64±0,36	0,87±0,41	1,25±0,52	1,46±0,56	2,31±0,46	2,73±0,51	3,00±0,00	3,00±0,00
H45	0,21±0,25	0,50±0,00	0,65±0,35	1,75±0,33	2,25±0,37	2,69±0,34	2,83±0,27	2,98±0,10	3,00±0,00	3,00±0,00
H50	0,44±0,16	0,50±0,00	0,57±0,25	1,57±0,44	2,07±0,23	2,31±0,35	2,69±0,28	2,88±0,21	3,00±0,00	3,00±0,00

5. ZÁVĚRY

Hlavní cíl této práce, tedy ověření využitelnosti hodnocení vývoje nákazy entomopatogenních hub na cílovém hostitelském organismu za využití stupnice FDI, se podařilo úspěšně ověřit v rámci všech pěti studií, které byly za tímto účelem prováděny a jsou popsány v předkládané práci. Stupnice FDI se ukázala být využitelnou bez problémů pro všechny testované druhy entomopatogenních hub v jednotlivých studiích a dá se tedy téměř s jistotou předpokládat, že aplikovatelnost této stupnice bude reálná i pro další druhy a rody entomopatogenních hub. (Stupnice FDI by byla jistě využitelná pro hodnocení vývoje nákazy také u zástupců řádu Entomophthorales, např. pro nejznámější druh rodu *Entomophthora* – *Entomophthora muscae*).

Co se hostitelských organismů týče, byly v této práci využity tři modelové organismy, a to larvy *T. molitor* a *G. mellonella* a dále dospělci *M. persicae*. I z tohoto úhlu pohledu, tedy z pohledu aplikovatelnosti stupnice FDI na výše zmíněné hostitelské organismy, nalezla stupnice očekávané uplatnění, nicméně v případě studie, kdy byla zjišťována účinnost získaných čistých izolátů z komerčních biopreparátů na bezkřídlé partenogenetické samičky *M. persicae*, musela být provedena korekce stupnice FDI, která spočívala v zúžení stupnice FDI ze 7indexové na stupnici s 6 indexy, kdy byl z hodnocení vyňat index 0,5, který vyjadřoval vývoj nákazy projevující se typickými melanizačními skvrnami na povrchu těla hostitelského organismu. Tento index byl v tomto konkrétním případě vynechán z hodnocení z důvodu nemožnosti relevantně tento projev nákazy na daném cílovém hostitelském organismu vyhodnotit, nicméně ani tato úprava neznamená výraznější limitaci ve využití dané stupnice pro hodnocení vývoje nákazy daného rodu/druhu/kmene entomopatogenní houby pro daný hostitelský organismus. Předkládaná práce si klade za cíl představit další možnost hodnocení účinnosti entomopatogenních hub, kterou představuje stupnice FDI.

Studie 1: Hodnocení účinnosti vybraných izolátů entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* a *Beauveria caledonica*, získaných v rámci plošného monitoringu na území Národního parku Šumava, na larvách potemníka moučného (*Tenebrio molitor*)

V rámci této studie byla zjištěna variabilita průběhu nákazy v 10denním biotestu, a to jak mezi izoláty entomopatogenní houby *B. bassiana*, tak druhu *B. caledonica*, nicméně pokud pomineme nepoměr v počtu testovaných izolátů pro jednotlivé druhy testovaných entomopatogenních hub (40 izolátů u *B. bassiana* a 23 izolátů u *B. caledonica*), pak můžeme na základě dosažených výsledků jasně říci, že obecně výrazně pomalejší průběh nákazy byl pozorován u larev ošetřených suspenzí spor izolátů *B. caledonica* ve srovnání s průběhem nákazy na larvách po inokulaci suspenzí spor izolátů *B. bassiana*.

Studie 2: Porovnání účinnosti dvou rozdílných typů spor entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* na larvy *Tenebrio molitor*

Z výsledků získaných v této studii jasně vyplývá, že účinnost dvou testovaných typů spor se liší v závislosti na použité koncentraci. Zatímco při koncentraci 1×10^5 spor/ml se ukázal průběh nákazy dle stupnice FDI rychlejší po inokulaci larev suspenzí konidií oproti larvám

inokulovaným suspenzí blastospor (ať již vymytých či nevymytých). V případě koncentrace 1×10^6 spor/ml byl trend vývoje nákazy obdobný jako v předchozím případě, nicméně rozdíly mezi jednotlivými variantami se snížily. V případě koncentrace 1×10^7 spor/ml byl vývoj nákazy po inokulaci larev obdobný pro všechny testované varianty.

Studie 3: Hodnocení účinnosti izolátů vybraných druhů entomopatogenních hub získaných odizolováním z komerčních biopreparátů na bezkřídlé partenogenetické samičky *Myzus persicae*

V optimálních podmínkách laboratorního testu výsledky jasně prokázaly obdobnou účinnost všech testovaných čistých izolátů komerčních přípravků na bázi entomopatogenních hub na bezkřídlé partenogenetické samičky *M. persicae* a jejich potenciálně vhodné využití pro praxi.

Studie 4: Hodnocení účinnosti indigenních izolátů entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae* odizolovaných z půd obhospodařovaných konvenčním způsobem zemědělství

Na základě kritérií, která byla sledována v laboratorních podmínkách (hodnocení klíčivosti, radiálního růstu, hodnocení účinnosti na larvy *T. molitor*) u testovaných izolátů v této studii, byl izolát 110102 a izolát 110112 s ohledem na dosažené hodnoty v jednotlivých kritériích vybrán jako nejvhodnější z dané skupiny testovaných izolátů k potenciálnímu využití v biologické ochraně rostlin před půdními škůdci, resp. před stádii, která svůj vývoj prodělávají právě v půdním prostředí.

Studie 5: Posouzení účinnosti vybraných izolátů entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* a jejich pasáží přes různé živné substráty na larvy zavíječe voskového *Galleria mellonella*

Výsledné hodnoty v průběhu této studie vykazovaly velkou variabilitu, nicméně pokud vezmeme v potaz konečné hodnoty, jež byly získány poslední den hodnocení, pak, pokud zobecníme získané výsledky, zjistíme, že pouze pasáže H₁₀ a H₁₅ (pasáže přes *B. tabaci* a *A. gossypii*) vykazovaly pomalejší vývoj nákazy dle stupnice FDI oproti hodnotám, jež byly získány po inokulaci larev konidii původního izolátu, v tomto případě tedy izolátu 172. Dále pak již jen pasáž H₃₅ (pasáž přes *B. tabaci*) vykazovala mírně pomalejší vývoj nákazy oproti hodnotám dosaženým u původního izolátu 173. V ostatních případech, i přes značně variabilní průběh, bylo dosaženo obdobných hodnot jak v případě jednotlivých pasáží, tak současně i v případě původních izolátů.

6. SUMMARY

The main objective of the presented study was to verify the “universal“ application of the FDI (fungus development index) scale for evaluation of entomopathogenic fungi infection development on chosen target host insect. With this scale that distinguishes different phases of fungal development, we have a unique opportunity to observe the infection in the host

organism in different phases starting from initial symptoms called melanization spots, through mortality, to the visible formation of morphological structures typical for one concrete species of entomopathogenic fungi. The task was to find legitimate use of the scale in assessment of development of the infection generally and comprehensively, i.e. for individual genera of entomopathogenic fungi in the frame of fungal development assessment on different host organisms, and not least also for assessment the evolution of the disease caused by different types of spores of entomopathogenic fungi. The FDI scale divides the infection process into 7 phases defined by indexes specific for each phase of disease on special host and its development stage (e.g. larva). The lowest index (0) describes the stage where no changes in host vitality are visible, on the other hand the highest index (3) expresses the final stage of the infection when mycelium on the host cadaver is fully sporulated. The crucial index observed during the fungal disease development is 1.5 which represents the first symptoms provably connected with the visible infection in form of single hyphae on the surface of the host body. This was also the main idea of the theses verified in five sub-studies described in this work.

Study no. 1: Evaluation of the efficacy of selected isolates of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria caledonica* isolated during areal monitoring in the Šumava National Park on *Tenebrio molitor* larvae

The main objective of this study was to compare the efficacy of isolates of entomopathogenic fungi *B. bassiana* and *B. caledonica* obtained during the monitoring in the Šumava National Park. The assessment proceeded on chosen target host that were *T. molitor* larvae. The task was to compare individual isolates within one species of entomopathogenic fungi and together to compare isolates between both of the above mentioned species. Big differences are apparent when looking at the results from individual isolates evaluation of the two tested species of entomopathogenic fungi (if we ignore the disparity in the number of isolates assessed within *B. bassiana* – 40 isolates and within *B. caledonica* – 24 isolates) we can find out, that *B. bassiana* isolates showed more rapid onset of mortality as well as its course. The same also applies to infection on larvae and development of fungal pathogen on their surface.

Study no. 2: Comparison of efficacy of two different types of spores of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on *Tenebrio molitor* larvae

Two considerably different types of spores of *B. bassiana* were compared to determine whether or not there is any variation in ability to cause disease between them and, if so, how. The aim was to find out whether one of these two types is able to cause faster development of the infection under set incubation conditions after application of concrete concentration of spores.

The results obtained in this study show that the efficacy of different types of spores is connected to applied concentration. When used concentration of 1×10^5 spores/ml it showed faster development of infection assessed according to FDI scale on *T. molitor* larvae induced by suspension of aerial conidia instead of suspension of blastospores (washed or not). In case of concentration 1×10^6 spores/ml the course of disease was similar to that one described previously, however the differences between varieties were reduced. The highest

concentration of 1×10^7 spor/ml does not show significant differences between all used variants, all gained results were of similar values.

Study no. 3: Evaluation of efficacy of selected isolates of entomopathogenic fungi species isolated from commercial biopreparations on apterous parthenogenetic *Myzus persicae* females

The study was conducted in order to verify the use of pure isolates, on which basis commercial preparations Botanigard (*B. bassiana*), Mycotal (*L. muscarium*) and Preferal (*I. fumosorosea*) are produced, on *M. persicae* females under laboratory conditions.

Under optimal conditions of the laboratory bioassay the results clearly demonstrated similar efficacy of all tested pure isolates of commercial products based on entomopathogenic fungi on apterous parthenogenetic *M. persicae* female and their potentially suitable practical use.

Study no. 4: Evaluation of efficacy of indigenous isolates of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* achieved from soil in conventional farming system

This study completely focuses on assessment of selected characteristics of evaluated isolates of entomopathogenic fungus *M. anisopliae* (germiantion, radial growth on artificial nutrient medium, evaluation of efficacy on *T. molitor* larvae) at different temperatures. The selection of the strains was based on morphological differences among central cultures incubated on PDA (Potato dextrose agar). The primary objective was to find the most suitable isolate for further potential use in biological control of plants against soil pests or pests realizing part of their lifecycle in the soil environment. Based on the results obtain at temperatures close to the average year temperature of the environment where the isolate originates from, this temperatures could be used as key indicator for the primary selection. Our results show, that the pathogenicity is connected to the spore vitality, but good germination does not necessarily mean good efficacy on the target host. It is important to combine all the presented evaluations in order to find the most suitable isolate. The declared evaluations are very important for the determination of economic efficiency, which is dependent on the amount of spore production and radial growth. On the base of realized evaluations two isolates 110102 and 110112 were chosen, because they seem to be the most suitable for potential use in biological protection applied in their original habitat.

Study no. 5: Assessment of the effectiveness of selected isolates of entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* and its passages through the various nutrient substrates on wax moth larvae *Galleria mellonella*

The effort in this study was to determine, whether the multiple passaging (fifty times) of selected isolates of *I. fumosorosea* through two insect hosts (*Bemisia tabaci* and *Aphis gossypii*), one host from the class Arachnoidea (*Tetranychus urticae*), artificial nutrient medium – PDA and natural nutrient substrate – bran, somehow affects the efficacy in comparison with the original isolates. Final efficacy was evaluated on *G. mellonella* larvae.

The running values showed great variability during the evaluation, however, if the final results are taken into account, it is apparent, that only passages marked H₁₀ and H₁₅ (passages through *B. tabaci* a *A. gossypii*) showed slower infection development according to the FDI scale when compared to the values gained after original isolate application, in this case it was isolate 172. Furthermore only the H₃₅ passage (through *B. tabaci*) demonstrated slower disease development in comparison to the values of original isolate 173. In other cases, despite the highly variable course, the finally achieved values were similar in the case of individual passages as well as in the initial isolates.

The main objective of the presented work was to verify usability of the FDI scale for evaluation of the development of infection caused by entomopathogenic fungi on target organism, which was successfully declared in all 5 studies that have been carried out for this purpose in this work. The FDI scale proved to be usable without problems for all species of entomopathogenic fungi in the individual studies and it can be almost safely assume that the applicability of this scale will be suitable even for the species of entomopathogenic fungi that were not assessed in this work.

In individual studies were used three model host organisms that were *T. molitor* larvae, *G. mellonella* larvae and adults of *M. persicae*. Even from this point of view the FDI scale found expected application, however for assessment of efficacy of pure isolates obtained from commercial products on apterous parthenogenetic *M. persicae* female the scale had to be modified, because index 0.5 describing the very beginning of the infection in form of melanization spots is impossible to be relevantly applied on such a small organism. For this purpose only 6 indexes were used for this concrete assessment when 0.5 was excluded. It is expected that the scale could be further modified this way according to the special host organism, but the main indexes in range 1–2.5 remain stable and just the marginal indexes (0.5 and 3) could be excluded.

We can conclude, that the utility of the FDI scale was proved and its universal application among all entomopathogenic fungi is expected, although in certain circumstances we could be made to narrow it. Nevertheless this modification is not limiting for fully use of this scale for evaluation of the infection caused by concrete genus/species/strain of entomopathogenic fungi on concrete host organism.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Anonym (2013) http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802230003.
Dostupné 16. dubna 2013
- Bailey A, Chandler D, Grant WP, Greaves J, Prince G, Tatchell M (2010) Biopesticides: pest management and regulation. CABI, Wallingford, Oxon, UK
- Boucias DG, Pendland JC (1991) Attachment of mycopathogens to cuticle: the initial event of mycoses in arthropod hosts. In: Cole GT, Hoch HC (eds) The Fungal spore and disease initiation in plants and animals. Plenum Press, New York, pp 101–127
- Burges HD, Thompson EM (1971) Standardization and assay of microbial insecticides. In: Burges HD, Hussey NW (eds) Microbial Control of Insects and Mites. Academic Press, London & New York, pp 591–622

- Butt TM, Goettel MS (2000) Bioassays of Entomopathogenous Fungi. In: Navon A, Asher KRS (eds) Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes. CABI, Wallingford, Oxon, UK, pp 95–140
- Clarkson JM, Charnley AK (1996) New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiol* 4:197–203
- Delfosse ES (2005) Risk and ethics in biological control. *Biol Control* 35:319–329
- Eilenberg J, Hajek A, Lomer C, (2001) Suggestions for unifying the terminology in biological control. *Biocontrol* 46:387–400
- Fargues J (1984) Adhesion of the fungal spore to the insect cuticle in relation to pathogenicity. In: Aist J, Roberts DW (eds) Infection processes of fungi. Rockefeller Foundation Study Center, Bellagio, Italy, pp 90–110
- Fuxa JR, Tanada Y (1987) Epizootiology of insect diseases. Wiley-Interscience, New York
- Glare TR, Reay SD, Nelson TL, Moore R (2008) *Beauveria caledonica* is a naturally occurring pathogen of forest beetles. *Mycol Res* 112:352–360
- Goettel MS, Hajek AE (2001) Evaluation of non-target effects of pathogens used for management of arthropods. In: Wajnberg E, Scott JK, Quimby PC (eds) Evaluating indirect ecological effects of biological control. CABI, Wallingford, Oxon, UK, pp 81–97
- Goettel MS, Poprawski TJ, Vandenberg JD, Li Z, Roberts DW (1990) Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents. In: Laird M, Lacey L, Davidson EW (eds) Safety of microbial insecticides. Boca Raton, FL: CRC Press, pp 209–231
- Charnley AK (1984) Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: a speculative review. *Br Mycol Soc Symp* 6:229–270
- Charnley AK, Collins SA (2007) Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In: Kubicek CP, Druzhinina IS (eds) *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships* (2nd edition). Springer-Verlag, Berlin, pp 159–187
- Inglis GD, Goettel MS, Butt TM, Strasser H (2001) Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: Butt TM, Jackson C, Magan N (eds) *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*, CABI, Wallingford, Oxon, UK, pp 23–69
- IOBC (2012) Internet book of biological control. Version 6. <http://www.iobc-global.org/download/IOBC%20InternetBookBiCoVersion6Spring2012.pdf>. Dostupné 12. dubna 2013
- Jaronski ST (2010) Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *Biocontrol* 55:159–185
- Khan S, Guo L, Maimaiti Y, Mijit M, Qiu D (2012) Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent. *Molecular Plant Breeding* 3:63–79
- Lacey LA, Fransen JJ, Carruthers R (1996) Global distribution of naturally occurring fungi of *Bemisia*, their biologies and use as biological control agents. In: Gerling D, Mayer R (eds) *Bemisia 1995: Taxonomy, biology, damage, and management*. Intercept, Andover, pp 401–433
- Lacey LA, Frutos R, Kaya HK, Vail P (2001) Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? *Biol Control* 21:230–248
- Medo J, Cagaň L (2011) Factors affecting the occurrence of entomopathogenic fungi in soils of Slovakia as revealed using two methods. *Biol Control* 59:200–208
- Meyling NV, Eilenberg J (2006) Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. *Agr Ecosyst Environ* 113: 336–341
- Meyling NV, Thorup-Kristensen K, Eilenberg J (2011) Below- and aboveground abundance and distribution of fungal entomopathogens in experimental conventional and organic cropping systems. *Biol Control* 59:180–186

- Mycobank (2013)
<http://www.mycobank.org/BioLomics.aspx?Link=T&TableKey=14682616000000063&Rec=14955&Fields=All>. Dostupné 15. dubna 2013
- Norris RF, Caswell-Chen EP, Kogan M (2003) Concepts in Integrated Pest Management. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall
- Pell JK, Hannam JJ, Steinkraus DC (2010) Conservation biological control using fungal entomopathogens. *BioControl* 55:187–198
- Rajinder P, Bandral RS, Zhang WJ, Wilson L, Dhawan AK (2009) Integrated pest management: a global overview of history, programs and adoption. In: Rajinder P, Dhawan A (eds) Integrated pest management: innovation-development process (Vol. 1). Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 1–50
- Reay SD, Brownbridge M, Cummings NJ, Nelson TL, Souffre B, Lignon C, Glare TR (2008) Isolation and characterization of *Beauveria* spp. associated with exotic bark beetles in New Zealand *Pinus radiata* plantation forests. *Biol Control* 46:484–494
- Rehner SA, Aquino de Muro M, Bischoff JF (2006) Description and phylogenetic placement of *Beauveria malawiensis* sp. nov. (Clavicipitaceae, Hypocreales). *Mycotaxon* 98:137–145
- Roberts DW, St Leger RJ (2004) *Metarhizium* spp. cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Adv Appl Microbiol* 54:1–70
- Roy H, Wajnberg E (2008) From biological control to invasion: the ladybird *Harmonia axyridis* as a model species. *BioControl* 53:1–4
- Shah PA, Pell JK (2003) Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl Microbiol Biotech* 61:413–423
- Zacharuk RY (1970a) Fine structure of the fungus *Metarrhizium anisopliae* infecting three species of larval *Elateridae* (Coleoptera) II. Conidial germ tubes and appressoria. *J Invertebr Pathol* 15:81–91
- Zacharuk RY (1970b) Fine structure of the fungus *Metarrhizium anisopliae* infecting three species of larval *Elateridae* (Coleoptera) III. Penetration of the host integument. *J Invertebr Pathol* 15:372–396
- Zimmermann G (2007a) Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci Techn* 17:553–596
- Zimmermann G (2007b) Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Sci Techn* 17:879–920
- Zimmermann G (2008) The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. *Biocont Sci Techn* 18:865–901

8. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA DISERTAČNÍ PRÁCE

Odborné publikace:

Impaktivá publikace:

- SKALICKÝ A., BOHATÁ A., ŠIMKOVÁ J., OSBORNE L.S., LANDA Z., 2013. Selection of indigenous isolates of entomopathogenic soil fungus *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. *Folia Microbiologica*. 58(6). DOI 10.1007/s12223-013-0293-z

Recenzovaná publikace:

- LANDA Z., ŠIMKOVÁ J., BOHATÁ A., SKALICKÝ A., KALISTA M., 2013. Entomopatogenní houby v kontextu strategie biologické ochrany rostlin – zhodnocení jejich výskytu v konvenčním a ekologickém zemědělství. *Rostlinolékař. Ročník 2013*, číslo 5.

Příspěvek na konferenci ve sborníku:

- LANDA Z., BOHATÁ A., ŠIMKOVÁ J., SKALICKÝ A., DOUL L., KALISTA M., 2010. Potential of local strains of entomopathogenic fungi as components of ecologically based program of protective treatments against spruce bark beetle *Ips typographus*. *Aktuality Šumavského Výzkumu IV – Research Actualities in Bohemian/Bavarian Forest*, Srní, October 19–20, 2010.