

Dana Koubová



Využití hub v biologické ochraně rostlin proti škůdcům

Dana Koubová

V přírodě se vyskytuje relativně velký počet hub z různých taxonomických skupin, které jsou patogenní pro rostlinné škůdce (hmyz, roztoče, háďátka). Některé mají široký hostitelský okruh, jiné jsou specifické pro jednotlivý cílový druh škůdce nebo omezený počet druhů, ale jsou neškodné pro obratlovce a rostliny. Často vyvolávají přirozené epizootie v populacích škůdců, čímž se řadí mezi významné mikroorganismy regulující četnost těchto populací. Výzkumy zaměřené na využití hub v biologické ochraně polních plodin, ovoce a zeleniny, okrasných rostlin a lesních dřevin probíhají prakticky po celém světě. Na bázi některých druhů byly vyvinuty biologické přípravky.

Bližší informace podává předkládaný informační přehled.

OBSAH

1. Úvod	4
2. Entomopatogenní, akarifágní a nematofágní houby.....	5
2.1 Zygomycotina – houby spájjivé.....	8
2.1.1 <i>Entomophthora</i> spp.	9
2.2 Deuteromycotina – mitosporické houby (houby nedokonalé, <i>Fungi imperfecti</i>)	9
2.2.1 <i>Aschersonia</i> spp.....	11
2.2.2 <i>Beauveria</i> spp.	14
2.2.3 <i>Hirsutella</i> spp.	18
2.2.4 <i>Lecanicillium</i> spp.	23
2.2.5 <i>Metarhizium</i> spp.	26
2.2.6 <i>Nomuraea</i> spp.	27
2.2.7 <i>Paecilomyces</i> spp.....	30
2.2.8 <i>Tolypocladium</i> spp.	34
3. Závěr	37
4. Literatura	38
Obrázky v textu	42

Biologická ochrana rostlin proti škodlivým organismům se intenzivně rozvíjí až v posledních několika desetiletích, ačkoli první poznatky a pokusy o využití jsou známy již z druhé poloviny 19. století. Důvodem rozvoje biologické ochrany jsou především rostoucí snahy omezit používání chemických látek a chránit životní prostředí. V minulosti používané širokospektrální, pro savce toxické a velmi perzistentní pesticidy způsobovaly vysokou mortalitu necílových druhů. Po vyhubení přirozených nepřátel došlo v mnoha případech k explozi sekundárních škůdců. Navíc vysoká intenzita chemické ochrany a opakované pesticidní zásahy měly podstatný vliv na vznik populací škodlivých organismů rezistentních vůči účinným látkám chemických přípravků.

V současné době je situace taková, že vývoj nových účinných látek se orientuje na pesticidy selektivně působící na cílové škůdce a šetrnější k životnímu prostředí (např. regulátory růstu, analogy hormonů hmyzu apod). Intenzivně probíhá výzkum mikrobiálních preparátů a užitečných makroorganismů, velká pozornost je věnována bioregulátorům určeným k ochraně proti plevelům. Na studium a vyhledávání dalších vhodných bioagens jsou vynakládány nemalé finanční prostředky. Na celém světě se experimentuje s potenciálními kandidáty biologické ochrany, které lze teoreticky využít v ochraně rostlin a rostlinných produktů proti škodlivým organismům. Často však nadějný druh, který je účinný pouze v laboratorních podmínkách, se při aplikaci v praxi neuplatní. Přes značný rozvoj tak biologická ochrana naráží na četná úskalí a významnější roli hraje pouze v některých kulturách a proti některým škodlivým činitelům.

Biologické metody ochrany rostlin (v užším pojetí bez transgenních rostlin, použití extraktů z rostlin nebo metabolitů z mikroorganismů atd.) jsou založeny na antagonistických mezidruhových vztazích, které jsou ovlivněny celou řadou faktorů. Stejně bioagens může fungovat za stejných podmínek a v různých prostředích zcela odlišně. K biologické ochraně jsou využívány:

- 1. Mikroorganismy: bakterie, houby, chromista, viry, viroidy, řasy a prvoci.** Zcela postrádají aktivní schopnost vyhledávání a hostitele dosahují pasivními prostředky. Uplatňují se zejména při regulaci chorob, ale i živočišných škůdců rostlin, některé též při regulaci plevelů. Předpokladem pro úspěšné využití v provozních podmínkách je dostatečný bioregulační potenciál, možnost masové produkce v laboratoři a tolerance vůči pesticidům. Mezi faktory, které rozhodujícím způsobem ovlivňují účinnost, patří především teplota a relativní vzdušná vlhkost prostředí.
- 2. Makroorganismy:** predátoři, parazitoidi, paraziti z kmene **členovci** (*Arthropoda*): **hmyz, roztoči, pavouci** a dále parazitické **hlístice** z kmene *Nematoda*. Aktivně reagují na prostředí a přítomnost potenciálních hostitelů a regulují především živočišné škůdce, kteří poškozují rostliny nebo rostlinné produkty. K zajištění účinnosti v praxi je zapotřebí dostatečný bioregulační potenciál (vývojový cyklus kratší než u hostitele, dostatečně vysoká plodnost, schopnost zničit dostatečný počet jedinců škůdce), aktivní vyhledávací schopnost hostitele, tolerance vůči pesticidům. Musí jít o druhy relativně snadno (z hlediska technického i ekonomického) množitelné v umělých podmínkách.

Biologická regulace probíhá buď přirozeně působením volně žijících antagonistů (za předpokladu, že jsou vytvořeny vhodné podmínky pro jejich přežívání a rozmnožování), nebo uměle – při masovém použití uměle produkovaných antagonistů, která je efektivní v dlouhodobých kulturách (např. vinice, sady), ale především v uzavřených prostorech (skleníky), kde je možné zajistit optimální podmínky pro vývoj a působení mikroorganismů a zabránit makroorganismům v rozptýlení.

V rámci celé ochrany rostlin je výrazně lepší informovanost a širší využití u makroorganismů (především členovců). To je do jisté míry dáno tím, že výzkum se v tomto směru začal rozvíjet mnohem dříve než výzkum v jiných oblastech biologické ochrany.

Z mikroorganismů jsou nejvíce prozkoumány bakterie a houby. Bakterie se uplatňují především v ochraně rostlin proti houbovým a bakteriálním chorobám a proti hmyzím škůdcům. Houby nacházejí využití jak v regulaci houbových chorob rostlin (mykoparazitické houby), tak i v regulaci škůdců z říše hmyzu (entomopatogenní, akarifágní, nematofágní houby).

Předkládaná práce je vzhledem k významu a potenciálu entomopatogenních hub věnována především této skupině.

2. ENTOMOPATOGENNÍ, AKARIFÁGNÍ A NEMATOFÁGNÍ HOUBY

Vztahy mezi houbami a hmyzem jsou velmi rozmanité. Lze zde například nalézt vztahy saprofytické, symbiotické, mutualistické i parazitické. Zvláštní skupinu hub představují druhy, které mohou vyvolávat primární onemocnění různých vývojových stadií hmyzu (tzv. houby entomopatogenní) (37, 84).

V současné době je známo více než 750 druhů hub ze zhruba 90 rodů, které mohou působit jako obligátní nebo fakultativní původci onemocnění mnoha druhů hmyzu (37, 84, 114).

Bez nadsázky lze konstatovat, že v případě fytofágních druhů hmyzu neexistuje žádný významný druh škůdce, který by alespoň v některém z vývojových stadií nebyl napadán některým z druhů entomopatogenních hub (37, 84).

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*). Nejčastěji infikovaným stadiem hmyzu jsou larvy, případně kukly. Méně často jsou houbami infikováni dospělci a vajíčka hmyzu (37).

V přírodě jsou relativně běžné epizootie v populacích hmyzu vyvolané houbovými patogeny (84).

V systému hub jsou entomopatogenní druhy zastoupeny v mnoha řádech různých oddělení. Nejvýznamnější zastoupení mají entomopatogenní houby v oddělení *Chytridiomycota* (*Chytridiomycetes*: *Blastocladales*, *Chytridiales*) a *Eumycota*: pododdělení *Zygomycotina* (*Zygomycetes*: *Entomophthorales*, *Mucorales*), *Ascomycotina* (*Ascomycetes*: *Laboulbeniales*, *Pleosporales*) a *Deuteromycotina* (*Hyphomycetes*: *Moniliales*, *Coelomycetes*) (110).

Mezi rody se zastoupením entomopatogenních druhů patří:

- *Sporodiniella*, *Conidiobolus*, *Entomophaga*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Massospora*, *Meristacrum*, *Neozygites* (pododd. *Zygomycotina*);
- *Ascosphaera*, *Myriangiium*, *Podonectria*, *Filariomyces*, *Hesperomyces*, *Trenomycetes*, *Cordyceps*, *Torrubiella*, *Nectria*, *Hypocrella*, *Calonectria*, *Blastodendron*, *Metschnikowia*, *Mycoderma*, *Saccharomyces* (pododdělení *Ascomycotina*);
- *Aegerita*, *Akanthomyces*, *Aschersonia*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Culicinomyces*, *Engyodontium*, *Fusarium*, *Gibellula*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces*, *Paraisaria*, *Pleurodemosporea*, *Polycephalomyces*, *Pseudogibellula*, *Sorospora*, *Sporothrix*, *Stilbella*, *Tetranacrium*, *Tilachlidium*, *Tolypocladium* (pododdělení *Deuteromycotina*);
- *Filobasidiella*, *Septobasidium*, *Uredinella* (pododdělení *Basidiomycotina*) (71, 83, 110).

Nejnámější jsou entomopatogenní houby sdružované v rodech *Beauveria*, *Hirsutella*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces* a *Tolypocladium* (110).

Hostitelský potenciál entomopatogenních hub náležejících do nejvyšších taxonů (oddělení, pododdělení) se liší, protože mají odlišný mechanismus rozmnožování (114).

Některé houby jsou široce polyfágní (entomofágní, akarifágní a nematofágní) a iniciují nákazy nejen na zástupcích z mnoha řádů hmyzu v různých vývojových stadiích, ale i na fytofágních roztočích a některých druzích háďátek (např. *Paecilomyces fumosoroseus*) (37).

Široce polyfágní jsou např. také druhy *Beauveria bassiana* nebo *Lecanicillium lecanii*, které působí proti velkému počtu škodlivých organismů jako molice, mšice, ploštice, červci, třásněnky, smutnice, nosatci nebo švábi (102).

Jiné druhy entomopatogenních hub vykazují podstatně užší patogenicitu s účinností omezenou na úroveň hmyzích řádů (např. houba *Nomuraea rileyi* parazitující výhradně na larvách motýlů) (37), přičemž i různé izoláty v rámci jednoho druhu houby mohou vykazovat různou hostitelskou specifitu (114).

Takovýto potenciál nepředstavuje pro reálnou biologickou ochranu žádná jiná skupina entomopatogenních mikroorganismů (37).

Při hledání úspěšných houbových antagonistů živočišných škůdců ve skleníkových podmínkách bylo nalezeno 22 různých druhů, které jsou v mnoha zemích světa testovány za účelem využití k ochraně proti škůdcům (tab. 1). Často také jsou výzkumy zaměřeny pouze na účinky metabolitů nebo toxinů těchto hub.

Tab. 1: **Houbové mikroorganismy testované k ochraně proti živočišným škůdcům v zahradnictví**

Užitečný organismus	Hostitelský organismus
<i>Aschersonia aleyrodís</i>	molice, červci
<i>Beauveria bassiana</i>	– molice, mšice (<i>Myzus persicae</i> , <i>Rhodobium porosum</i> , <i>Aphis gossypii</i>), třásněnky (<i>Frankliniella occidentalis</i>), křísi, nosatci, ploštice, červci – ploštice <i>Lygus lineolaris</i> , smutnice, svilušky (<i>Tetranychus urticae</i>), <i>Delia antiqua</i> , <i>D. radicum</i> , <i>D. floralis</i> , švábi
<i>Erynia neoaphidis</i>	mšice kyjatka osenní (<i>Sitobion avenae</i>)
<i>Hirsutella thompsonii</i>	housenky motýlů
<i>Metarhizium anisopliae</i>	lalokonosec rýhovaný (<i>Otiorhynchus sulcatus</i>), molice, mšice, třásněnky (<i>Frankliniella occidentalis</i> , <i>Taeniothrips inconsequens</i>), <i>D. radicum</i> , <i>D. floralis</i> , rus domácí (<i>Blattella germanica</i>); celkem přes 200 hostitelských druhů
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	<i>Bemisia</i> spp., <i>Trialeurodes vaporariorum</i> , červci, brouci, motýli, housenky
<i>Lecanicillium lecanii</i>	<i>Bemisia</i> spp., <i>Trialeurodes vaporariorum</i> , mšice (<i>Myzus persicae</i> , <i>Aphis gossypii</i> , <i>Schizaphis germanium</i> , <i>Pemphigus bursarius</i>), ploštice (<i>Lygus</i> spp.), červci, <i>Frankliniella occidentalis</i>
<i>Lecanicillium chlamydosporium</i>	kořenová háďátka, <i>Meloidogyne javanica</i> , <i>Meloidogyne</i> spp., <i>Globodera pallida</i> , <i>G. rostochiensis</i> , <i>Heterodera</i> spp.
<i>Penicillium frequentans</i> , <i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Stachybotris chartarum</i> , <i>Trichocladium asperum</i>	háďátka <i>Globodera rostochiensis</i> , <i>Meloidogyne incognita</i>

Úspěchů bylo dosaženo také v biologické ochraně proti škůdcům okrasných rostlin (tab. 2).

Tab. 2: **Aplikace houbových mikroorganismů na okrasné rostliny** (102)

Užitečný organismus	Rostlina	Škůdce
<i>Aschersonia aleyrodís</i>	gerbera (dobrý účinek), poinsettie (špatný účinek)	molice <i>B. tabaci</i> / <i>B. argentifolii</i> , <i>T. vaporariorum</i> a červci
<i>Beauveria bassiana</i>	růže, (dobrý účinek), lilie (dobrý účinek)	<i>Frankliniella occidentalis</i> , <i>Aphis gossypii</i>
<i>Metarhizium anisopliae</i>	okrasné rostliny (dobrý účinek)	lalokonosec rýhovaný (<i>Otiorhynchus sulcatus</i>)
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	poinsettie (dobrý účinek)	molice <i>B. tabaci</i> / <i>B. argentifolii</i> , <i>T. vaporariorum</i>
<i>Lecanicillium lecanii</i>	chrysanémy (dobrý účinek)	mšice, <i>Frankliniella occidentalis</i>

Entomopatogenní houby vykazují ekologickou variabilitu ve schopnosti přežít za různých podmínek prostředí (114).

Jejich růst a vývoj je však velmi výrazně limitován abiotickými faktory, zejména relativní vzdušnou vlhkostí a teplotou (113).

Nástup účinku hub proti živočišným škůdcům může být při zajištění vysoké teploty a vysoké relativní vzdušné vlhkosti velmi rychlý (viz tab. 3).

Tab. 3: **Podmínky pro aplikaci některých entomopatogenních hub**

	Relativní vzdušná vlhkost	Účinná doba
<i>Lecanicillium lecanii</i>	>80, lépe >92 %	za 48 hodin
<i>Aschersonia aleyrodís</i>	>80, lépe >92 %	za 48 hodin
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	100 %	za 12 hodin

Zajímavé je srovnání mechanismu účinku a masové produkce mikroorganismů používaných v biologické ochraně.

Tab. 4: **Mechanismus účinku a masová produkce mikroorganismů**

	Houby	Bakterie	Viry	Prvoci
Způsob infekce	kutikulou a tělními otvory	přijímanou potravou	přijímanou potravou nebo přenosem vajíčky	přijímanou potravou nebo přenosem vajíčky
Rychlost infekce při stejné teplotě	rychlá, optimální teplota 20–30 °C	velmi rychlá	pomalá	velmi pomalá, často jen chronická choroba populace
Závislost na vzdušné vlhkosti	velmi vysoká	nízká	nízká	
Specifická	spíše nízká až velmi vysoká (široké hostitelské spektrum některých druhů)	vysoká (úzké hostitelské spektrum)	velmi vysoká (velmi úzké hostitelské spektrum)	vysoká (úzké hostitelské spektrum)
Masová produkce	nově možná u některých druhů	možná zpravidla velmi snadno ve velkém množství	produkce <i>in vivo</i> levnější než <i>in vitro</i> , obecně je produkce nákladná	na živém materiálu (<i>in vivo</i>)

Nedostatečné možnosti masové produkce mnoha antagonistů v minulosti totiž byly hlavní příčinou málo rozšířeného využívání mikroorganismů v biologické ochraně proti škůdcům. Dříve bylo možné rychle a ve velkém množství produkovat na levných živných půdách pouze bakterie. Cenově výhodná masová produkce hub byla umožněna díky novým technologiím teprve nedávno. Produkce blastospor (hyfových tělísek) a konidiospor mnoha hub probíhá ve fermentorech ve velkém množství a konstantní kvalitě (102).

Přednosti entomopatogenních hub spočívají v jejich neškodnosti vůči životnímu prostředí a většinou i vůči obratlovcům. Uvádí se však, že u člověka se v důsledku inhalace houbových spor mohou ojediněle vyskytovat alergie. Výhodou oproti chemickým širokospektrálním insekticidům je, že díky volbě vhodného izolátu se může uskutečnit cílená aplikace proti škodlivému hmyzu bez negativních účinků na jiný, užitečný hmyz. Polní pokusy ukázaly, že počet infikovaných jedinců škodlivého hmyzu díky paralelní aplikaci houbových přípravků a nízkých dávek chemických insekticidů se může výrazně zvýšit (114).

Další předností entomopatogenních hub je velmi malá pravděpodobnost vzniku rezistence hmyzu, na rozdíl od bakterií a virů, kde je možnost tvorby rezistence na základě mechanismu účinku mnohem vyšší (tab. 5). Obecně je ale riziko vzniku rezistence u hmyzu a roztočů vůči mikrobiálním antagonistům hodnoceno jako velmi nízké.

Tab. 5: **Možnosti vzniku rezistence hmyzu a roztočů vůči mikroorganismům** (102)

	Houby	Bakterie	Viry
Vznik rezistence	velice malá pravděpodobnost, protože průběh infekce je velmi komplexní a není vázán jen na jeden buněčný typ	musí existovat receptor, aby došlo k příjmu účinných krystalů toxinu; pokud receptor chybí, vzniká rezistence (rezistence se již ojediněle vyskytla)	možný, hostitel musí mít receptor; pokud receptor chybí, vzniká rezistence (u bakulovirů se předpokládá komplexní způsob infekce, takže je vytvoření rezistence téměř vyloučeno)

Nevýhodou je naopak závislost účinnosti bioagens na podmínkách prostředí, zvláště na teplotě a vzdušné vlhkosti. Tím se použitelnost v současné době známých izolátů omezuje na určité prostory jako skleníky a klimaticky příznivé areály. Aplikace entomopatogenních hub se v minulých desetiletích snížila, přesto se ale v posledních letech zájem soustřeďuje na několik málo hospodářsky využitelných druhů (*Beauveria* spp., *Metarhizium* spp., *Paecilomyces* spp., *Lecanicillium* spp. a další) (114).

2.1 Zygomycotina – houby spájkivé

Třída Zygomycetes

Řád *Entomophthorales*

Některé druhy jsou saprofytické a žijí v půdě, na výkalech a na rostlinném opadu. Některé z nich parazitují na řasách, jeden druh dokonce parazituje na gametofytu kapradin. Další zástupci jsou známí jako paraziti roztočů, hlístů a jiných bezobratlých. Několik druhů fakultativně parazituje v teplejších oblastech i na savcích – na koních, psech i na lidech. Nejvíce jsou ale prostudovány druhy, které parazitují na hmyzu (94).

Houby z řádu *Entomophthorales* představují velmi významnou a poměrně dobře známou skupinu entomopatogenních hub. Jejich přirozený výskyt lze zcela běžně zaznamenat v populacích mnoha druhů hmyzu (110).

Hostiteli těchto hub jsou zástupci více než 32 čeledí z řádů *Hemiptera*, *Homoptera*, *Diptera*, *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Orthoptera* a *Hymenoptera* (84).

Entomopatogenní houby zastoupené v řádu *Entomophthorales* (např. druhy hub patřící do rodů *Conidiobolus*, *Entomophaga*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Neozygites* a další) reprezentují převážně obligátně parazitické druhy, jejichž vývojový cyklus je vázán na živého hostitele (110).

Mnozí zástupci tohoto řádu mají velmi úzké spektrum hostitelů (i jeden druh) (94).

Některé druhy těchto úzce specializovaných patogenů hmyzu mohou způsobovat i úplný kolaps přemnožených populací některých druhů škůdců (např. pravidelné spontánní epizootie vyvolané houbou *Erynia neoaphidis* v populacích mšic na obilovinách) (110).

Epizootie v populacích členovců jsou schopné vyvolat také houby rodu *Entomophthora*, *Neozygites* a *Pandora*.

Využití této skupiny hub v biologické ochraně brání omezené přežívání konidií. Přesto testy prováděné v bývalém SSSR a v Austrálii k ochraně proti mšicím byly do jisté míry úspěšné (84).

Úspěchem je také introdukce houby *Entomophaga maimaiga* z Japonska do oblasti u Bostonu ve státě Massachusetts ve Spojených státech jako obrana proti můře bekyni velkohlavé (*Lymantria dispar*) v letech 1910 a 1911. V Japonsku houba působila jako velmi specifický patogen této můry. *E. maimaiga* přežila v nových podmínkách a působí rozsáhlé epizootie na bekyni velkohlavé v letech se zvýšenými srážkami (84, 94).

Statut obligátních parazitů však doposud znemožňuje využívat tuto skupinu entomopatogenních hub ve formě standardních biopreparátů. U většiny zástupců z řádu *Entomophthorales* je produkce potřebného množství biomasy formou *in vitro* kultivací na umělých živných půdách doposud buď zcela nemožná nebo je velmi složitá a nákladná. Nicméně z hlediska potenciálního využití v biologické ochraně rostlin představují entomofory velmi významnou skupinu přirozených nepřátel, jejichž zavedení do sortimentu prakticky využívaných bioagens odvisí pouze od pokroku v oblasti biotechnologií kultivací hub (110).

Životní cyklus

Mycelia některých druhů mají tendenci ke fragmentaci za vzniku hyfových tělísek. Pohlavní rozmnožování je známo velmi málo. Nepohlavní rozmnožování se děje sporama, které se též nazývají konidie. Odpočívající spory (tlustostěnné přezimující spory, které vznikají v těle hostitele nebo v kultuře) mají povahu zygospor nebo azygospor (94).

Konidiofory (sporogenní buňky) odstřelují konidie, které jsou pokryty mucilaginální lepkavou hmotou. Pokud konidie ulpí na vlhkém substrátu (ne na hostiteli), dochází k produkci sekundárních konidioforů a sekundárních konidií, které mohou dále produkovat terciární konidiofory a konidie. Tento proces může pokračovat, dokud není obsah protoplazmy vyčerpán nebo dokud není nalezen vhodný hostitel. Sekundární a terciární konidie mohou být přeměněny v odpočívající výtrusy. Povrch sekundárních konidií (kapillikonidií) je lepkavý a umožňuje ulpívání spor k předmětům, s nimiž se dostanou do kontaktu. Při klíčení vytváří konidie klíční vlákno, které penetruje kutikulu hmyzu a vstupuje do hemocelu (tělní dutiny). Uvnitř hemocelu houby vytvářejí protoplast, hyfová tělíska a hyfy. Doba, kterou tyto houby potřebují k usmrcení hmyzu, závisí na mnoha faktorech, jako např. na hostiteli, teplotě, vlhkosti, vývojovém stadiu hmyzu. V době, kdy hmyz hyne, jsou téměř všechny jeho vnitřní orgány utilizovány houbou. Doba od infekce do úhynu hmyzu se pohybuje od 3 do 12 dnů, přičemž nejčastěji úhyn nastává 5. až 8. den. Krátce po úhynu hostitele z hyfových tělísek vyrůstají konidiofory a prostupují méně rezistentní částí exoskeletu. Houby řádu *Entomophthorales* vytvářejí různé typy rezistentních nebo odpočívajících struktur: chlamydospory,

zygospory, tlustostěnné hyfy, azygospory. Gametangia vznikají bočním klíčením z hyfových tělísek. Zygosporangium obsahuje zygotu. Tlustostěnné zygospory jsou důležité pro přežívání v mírném podnebném pásu. Z klíčících odpočívajících zygospor vyrůstají klíčící vlákna, která produkují infekční primární (odštělované) konidie nebo sekundární (přilnavé) spory (84).

Zástupci

Zástupci jsou obligátními parazity na hmyzu a jiných členovcích. Zastoupené rody: *Entomophthora*, *Entomophaga*, *Strongwellsea*, *Massospora*, *Batkoa*, *Erynia*, *Eryopsis*, *Furia*, *Pandora*, *Tarichium*, *Zoophthora*, *Sporodiniella*, *Conidiobolus*, *Meristacrum*, *Neozygites* (84, 110).

2.1.1 *Entomophthora* spp.

Druhy rodu *Entomophthora* jsou rozšířeny po celém světě a vyskytují se na řadě hmyzích škůdců hospodářského významu. Častý je např. nález housenek černopásek (*Heliothis/Helicoverpa* spp.) porostlých sporulující entomoforou na polích s čirokem. Byly také pozorovány populace *H. zea* a *H. virescens* infikované *Entomophthora* sp. na bavlníku a *H. zea* na kukuřici (84).

Nejběžnější druh je *E. muscae* (Cohn) Fresen (94).

2.2 Deuteromycotina – mitosporické houby (houby nedokonalé, *Fungi imperfecti*)

Třída *Hyphomycetes*

Řád *Moniliales*

Jejich společným znakem je, že se v přírodě vyskytují jen jako sterilní podhoubí nebo mycelia, stromata nebo sklerocia nesoucí rozličným způsobem vytvářené nepohlavní výtrusy – konidie.

Vyskytují se jako saprofyti především v půdě a na organickém materiálu, jako saproparaziti nebo paraziti na rostlinách, zvířatech i člověku. Produkují velké množství konidií, takže jejich výtrusy tvoří většinu spor vyskytujících se v ovzduší a podílejí se tak na vzniku alergií (73).

Do této skupiny patří většina entomopatogenních hub. Přibližně u 30 rodů je znám jeden nebo více druhů, které napadají hmyz (84).

Z hlediska praktické biologické ochrany mají dominantní význam zástupci několika klíčových rodů. K nejznámějším patří entomopatogenní houby sdružené v rodech *Beauveria*, *Hirsutella*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces* a *Tolypocladium* (110).

Řada těchto hub způsobuje muskardiny hmyzu, významné jsou především muskardiny housenek černopásek. Termín muskardina byl poprvé použit pro bílou muskardinu bource morušového způsobenou houbou *Beauveria bassiana*. K dalším muskardinám asociovaným s housenkami černopásek patří: zelená muskardina vyvolaná houbou *Metarhizium anisopliae*, červená muskardina (původce *Sorospora uvella*) a žlutá muskardina (původce *Aspergillus flavus*).

Deuteromycety jsou na rozdíl od entomofor fakultativní patogeni. Téměř všechny mohou být kultivovány na umělých živých půdách (84).

Parazitická valence deuteromycet je velmi rozmanitá. Některé druhy entomopatogenních deuteromycet mohou parazitovat na širokém sortimentu hostitelů patřících do zcela odlišných řádů hmyzu a mohou infikovat různá vývojová stadia. (např. široce polyfágní houba *Paecilomyces fumosoroseus*). Jiné druhy entomopatogenních deuteromycet vykazují podstatně užší patogenicitu s účinností omezenou na úroveň hmyzích řádů (např. houba *Nomuraea rileyi* parazitující výhradně na larvách motýlů). Takovýto potenciál nepředstavuje pro reálnou biologickou ochranu žádná jiná skupina entomopatogenních mikroorganismů (37).

Životní cyklus

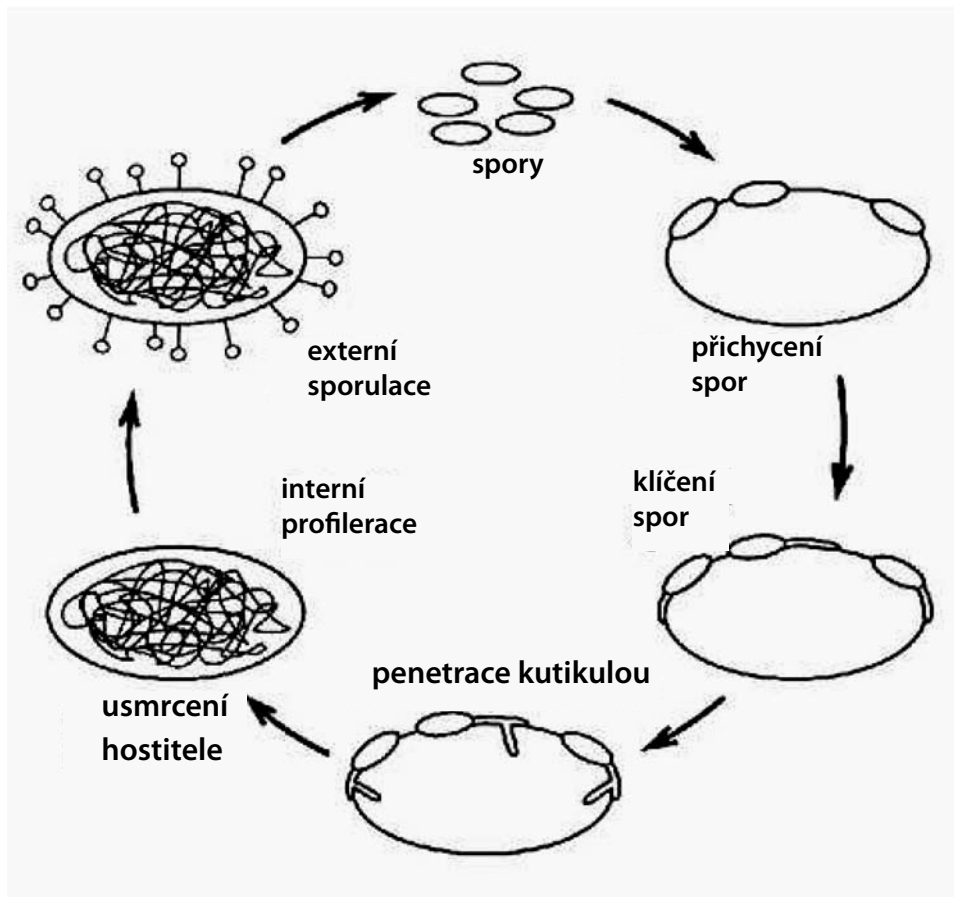
Houby nedokonalé jsou myceliální houby, jejichž rozmnožování probíhá prostřednictvím konidií, které se tvoří na volných nebo shluklých konidioforech na povrchu substrátu. Vzhledem k tomu, že u této skupiny hub chybí pohlavní nebo perfektní stadium, jsou označovány jako imperfektní. Mykologové se domnívají, že tyto houby ztratily schopnost sexuální reprodukce. Je však u nich vyvinuta parasexuální reprodukce, při které dochází ke splnutí jader, ne však k řádné meióze. Parasexuální proces představuje mechanismus pro genetickou výměnu mezi těmito houbami (84).

Hlavní fáze generalizovaného vývojového cyklu entomopatogenních hub (viz schéma) lze definovat následujícím způsobem:

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

Houbovou nákazu zpravidla iniciují vitální a virulentní konidie. Šíření konidií v prostředí a mechanismy zajišťující jejich primární kontakt s hostitelem jsou procesy převážně nahodilé, které jsou zprostředkovávány pomocí abiotických nebo biotických faktorů. Z abiotických faktorů se na šíření konidií v prostředí nejčastěji podílí vzduch a voda (vítr, déšť, pohyb vody v půdě, vodní páry). Běžným mechanismem šíření houbových nákaz v populacích hmyzu je kontakt zdravých jedinců s jedinci infikovanými nebo tzv. autodisseminace, při které dochází k šíření konidií uvnitř populace v souvislosti se specifickými vnitropopulačními procesy (migrace, kopulace, kladení vajíček). Doposud je známo jen málo případů šíření konidií entomopatogenních hub pomocí jiných biotických vektorů (např. roztoči, hádčátky, jinými druhy hmyzu), nicméně i tyto mechanismy se při šíření hub v některých případech významně uplatňují.

Přichycení konidií na povrch těla hostitele je základním předpokladem vzniku houbového onemocnění. Konidie některých druhů hub jsou pro fázi adheze vybaveny lepivým mucilagenním povrchem, pomocí kterého vytvářejí pevnou vazbu s kutikulou hostitele již při prvním kontaktu (např. houby *Lecanicillium lecanii*, *Aschersonia aleyrodis*, *Hirsutella thompsonii* aj.). Jiné druhy entomopatogenních hub (např. *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* aj.) produkují suché, silně hydrofobní konidie s rozmanitě strukturovaným povrchem. Primární adheze takovýchto konidií je zajištěna buď přímou interakcí mezi dvěma hydrofobními povrchy (konidie-kutikula hmyzu), nebo 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 a jiné).



Interakce patogena s hostitelem

Klíčení konidií je první aktivní fází interakce patogena s hostitelem. Většina druhů entomopatogenních hub produkuje konidie, které jsou energeticky dostatečně vybaveny k vyklíčení, bez nutnosti absorbovat externí živiny. Klíčení konidií tak převážně závisí na abiotických faktorech, zejména pak na relativní vzdušné vlhkosti a teplotě. V první fázi dochází k výraznému zvětšení klíčící konidie (bobtnání), které je doprovázeno komplexní přestavbou stěny konidie a následnou tvorbou primárního klíčku. Od určité fáze naklíčení je další vývoj patogena závislý na externím příjmu živin. Houba začíná přijímat látky, které jsou zprvu součástí kutikuly, následně pak absorbuje živiny i z vnitřních orgánů a tkání hostitele. Za tímto účelem proniká přímou penetrací nebo prostřednictvím přirozených otvorů do tělní dutiny napadeného hostitele. Při přímé penetraci kutikulou uplatňují houby kombinaci biochemických a fyzikálně mechanických prvků. V první fázi penetrace jsou v oblasti apresoria pronikající hyfy produkovány kutikulu degradující enzymy (lipázy, chitinázy, proteázy). Koncová špička invazní hyfy tlakem proniká narušenou kutikulou hostitele a invaduje do tělní dutiny. Častým místem penetrace jsou méně sklerotizované části na povrchu těla. Kromě přímé penetrace kutikulou využívají entomopatogenní houby k pronikání do tělní dutiny i přirozené otvory. Běžným místem pronikání jsou dýchací otvory a řitní nebo ústní otvor. Po proniknutí patogena do těla dutiny dochází zpravidla k rychlé kolonizaci jednotlivých tělních tkání a orgánů. Pro tuto fázi vývojového cyklu je typický přechod vláknitých forem hub na rychle se dělicí a pomnožující tělíška – tzv. hyfová, resp. kvasničná tělíška, blastospory. Tato tělíška se rychle namnožují (dělení pučením, exponenciální růst titru v hemolymfě) a ve velmi krátké době zcela vyplňují a mumifikují hostitele, který je v této fázi vývoje mykózy již usmrčen. Mumifikací hostitele končí druhá, parazitická fáze vývojového cyklu a nastupuje finální fáze – tvorba povrchového mycelia a sporulace (saprofytický vývoj patogena na usmrčeném hostiteli). Pro tuto fázi vývoje jsou opět typické vláknité struktury. Patogen prorůstá na povrch usmrčeného hostitele a postupně vytváří hustou myceliální síť, která porůstá celý povrch těla. Na vzdušném myceliu se postupně vytváří konidiofory, na kterých se ve finální fázi vývojového cyklu formují nové konidie. Konidie si v přirozeně dormantním stavu udržují vitalitu po dobu několika týdnů až měsíců. Dočasná dormance konidií je ukončena šířením a adhezí konidií na povrchu těla nového vhodného hostitele. V optimálních podmínkách (např. teplé mikroklima skleníků a fóliových krytů) může být celý vývojový cyklus realizován v průběhu 3–5 dnů, v běžných podmínkách vegetačního období mírného pásma probíhá v rozmezí od 7–21 dnů. Kritické fáze vývojového cyklu představují adheze a klíčení konidií. Klíčovým faktorem prostředí je vlhkost. Klíčení konidií zpravidla vyžaduje relativní vlhkost vzduchu vyšší než 90 % a i ostatní fáze vývoje probíhají nejrychleji při vyšších vlhkostech. Pouze v období od proniknutí patogena do tělní dutiny do opětovného prorůstání mycelia na povrchu těla nejsou nároky na vysokou vlhkost v okolním prostředí tak vysoké. Teplotní tolerance entomopatogenních hub je poměrně vysoká. Délka vývojového cyklu probíhá v úzké korelaci s okolní teplotou. Optimální teploty charakterizuje rozmezí 20–30 °C, krátkodobě mohou entomopatogenní houby přežívat i vysoké teploty (40–45 °C). Většina druhů entomopatogenních hub je dokonale adaptována i na dlouhotrvající nízké teploty a přežívá i dlouhodobé zmrazení. Ostatní abiotické faktory svým významem nedosahují relevance vlhkosti a teploty. Na základě uvedených údajů je možné definovat charakter optimálních a potenciálních nik. V soustavě odlišných agroekosystémů se pro využití biopreparátů na bázi entomopatogenních hub jako nejvhodnější jeví skleníky (ochrana sazenic, rychlené zeleniny a okrasných květin), závlahové technologie pěstování různých plodin a kultur a aplikace do půdy (112).

Biopreparáty

V současné době je již přibližně 25 druhů z uvedených rodů využíváno ve formě standardních biopreparátů. Většina hub této skupiny může realizovat kompletní vývojový cyklus i v alternativních systémech, bez přímé vazby na živého hostitele (např. saprofytický cyklus na odumírající organické hmotě různého původu). Statut fakultativních parazitů umožňuje produkci biomasy infekčních jednotek (konidií, resp. blastospor) pomocí velkokapacitních biotechnologií, což je základní technologický předpoklad pro vývoj a tržní realizaci standardního biopreparátu (110).

2.2.1 *Aschersonia* spp.

Říše: *Fungi*

Oddělení: *Eumycota*

Pomocné pododdělení: *Deuteromycotina*

Pomocná třída: *Coleomycetes*

Řád: *Sphaeropsidales*

Rod *Aschersonia* popsal v roce 1848 Montagne, který považoval druhy za patogeny listů rostlin, na nichž se však vyskytovali i zástupci hmyzu. Teprve v roce 1894 Webber uznal druh *A. aleyrodis* jako entomopatogenní. Sutton ve své práci z roku 1980 uvádí, že přibližně 50 druhů popsaných a zahrnutých do tohoto rodu je výhradně entomopatogenních. Infikovány jsou především mladé larvy, mohou být však napadeny i larvy dospělé nebo kukly. Larvy v počátečních fázích infekce zduřují a v době, kdy hyfy vyrůstají z okrajů infikovaného hostitele, je hostitel již uhynulý (12).

Zástupci rodu *Aschersonia* jsou vysoce specifictí k molicím (96).

***Aschersonia aleyrodis* Webber**

Hostitelé *Aschersonia aleyrodis*: puklice (*Coccidae*) a molice (*Aleyrodidae*) (12, 45).

Geografické rozšíření: Kostarika, Kuba, Indie, Jamajka, Dominikánská republika, Šalamounovy ostrovy, USA. Podle Mainse (1959) se *A. aleyrodis* vyskytuje velmi často na západní polokouli, zatímco *A. placenta* je běžná na východní polokouli (12).

A. aleyrodis je běžnou součástí entomopatogenní mykoflóry v agroekosystémech citrusových sadů. Byla zjištěna a popsána na počátku minulého století (r. 1908) po izolaci z molice citrusové *Dialeurodes citri* v průběhu přirozené epizootie v citrusových sadech na Floridě. Kromě molice citrusové byla následně zjištěna i na dalších druzích molic, z nichž mezi nejvýznamnější patří *Trialeurodes vaporariorum*, *T. abutiloneus*, *Bemisia tabaci*, *B. giffardi*, *Dialeurodes citrifolii*, *Aleurocanthus woglumi* a *Tetraleurodes acaciae*.

V přirozených agroekosystémech je nákaza iniciována a šířena v populacích molic prostřednictvím pyknospor. Běžnou součástí mucilagenní masy pyknospor je β -karoten, který způsobuje nejen typické zbarvení samotné masy pyknospor, ale je i příčinou načervenalého zbarvení infikovaných larev. Význam přítomnosti β -karotenu v mucilagenní mase pyknospor není doposud uspokojivě vysvětlen. Pravděpodobná úloha β -karotenu je v ochraně pyknospor proti negativním účinkům slunečního záření, případně by mohl β -karoten působit i jako atraktantní složka ve vazbě na mykofágní roztoče. Larvy molice citrusové infikované tímto patogenem jsou v podobě tzv. pustul (usmrčená, mumifikovaná larva v myceliovém stromatu s kapkami masy pyknospor na povrchu) přítomny na listech i řadu týdnů a jsou dlouhodobě exponovány intenzivnímu slunečnímu záření. Dále pak bylo zjištěno, že na pustulách na listech citrusu na Floridě se živí a vyvíjejí roztoči z rodu *Acalvolia*, kteří jsou specializovaní mykofágové. Roztoči z rodu *Acalvolia* jsou schopni prodělavat celý vývojový cyklus na laboratorní monodietě představované kulturou houby *A. aleyrodis* kultivované na PDA (potato-dextrose agar). Toto zjištění může přispět k pochopení mechanismů šíření patogena v přirozených agroekosystémech. Doposud byly za hlavní formy šíření považovány abiotické faktory (voda, vítr), nicméně takto definované způsoby šíření nevysvětlují případy totálních epizootií, které se v citrusových výsadbách v oblasti Floridy každoročně objevují. Z charakteru epizootií se dá usuzovat podstatně cílenější forma šíření včetně účasti biotického článku, který v systému „molice-patogen“ sehrává klíčovou úlohu. Zjištění, že roztoči z rodu *Acalvolia* prodělávají celý vývoj a reprodukují na monodietě *A. aleyrodis* a jejich četnost na listech citrusu kladně koreluje s počtem pustul, tuto hypotézu podporuje.

Průběh infekce molice houbou *A. aleyrodis* probíhá podle klasického schématu. Po kontaktu pyknospor s povrchem těla hostitele se pyknospora přichytí na povrch těla pomocí povrchové mucilagenní hmoty a během 24 hodin klíčí (85).

Klíční vlákno penetruje do exoskeletu přímo nebo prostřednictvím apresoria, přičemž preferuje intersegmentální membránu (vazivová membrána, která umožňuje vzájemnou pohyblivost článků hmyzu) (29).

Primární hyfa proniká do tělní dutiny, kde jsou v následné fázi vývoje produkována heterogenní hyfová tělíska, která postupně vyplňují tělní dutinu. V té fázi vývojového cyklu patogena je již larva hostitele usmrčená, zcela mumifikovaná a zároveň končí parazitická fáze vývoje patogena a vývojový cyklus přechází do konečné, saprofytické fáze vývojového cyklu. V této fázi se již dají infikované larvy snadno odlišit od larev zdravých. Původně průhledný povrch těla larvy dostává mléčné, mírně načervenalé zbarvení. Saprofytická fáze vývojového cyklu začíná momentem prorůstání mycelia na povrch těla usmrčené larvy a vytvářením fialid v pyknidách, které se ve formě přesně lokalizovaných okrouhlých zón objevují na povrchu stromatu. V období maximální produkce masy pyknospor se již infikovaná larva zřetelně odlišuje od larvy zdravé. Masa pyknospor je zřetelně vybarvena (červená, oranžová, žlutá) a infekce larvy je vizuálně zřejmá a zřetelná. V praktické determinaci kmenů/druhů hub z rodu *Aschersonia* je vzhledem k barvě pyknidiální masy užívána i praktická terminologie, v rámci které je pro označení používán (v kombinaci s informací o areálu výskytu) převažující typ zbarvení (85).

Nejnámější druhy rodu *Aschersonia* jsou označovány jako červená *Aschersonia* – *A. aleyrodis* a žlutá *Aschersonia* – *A. goldiana*.

Červená *Aschersonia* je ve skutečnosti růžová s červenými sporama. Žlutá *Aschersonia* má krémovou až bílou barvu s žlutými sporama (17).

V literatuře je dále možné narazit na označení typu „kubánská červená“, „kubánská žlutá“, „vietnamská oranžová“, „čínská červená“ a pod.

A. aleyrodis infikuje téměř výhradně larvální stadium molic (85, 96).

Může však infikovat také kukly (96).

Infekce dospělců tímto patogenem jsou zjišťovány jen výjimečně. Infekce hostitele ve stadiu vajíčka nebyla doposud prokázána (85, 96).

Nejcitlivější vůči infekci jsou larvy 1. až 2. instaru (85).

Výzkumy zaměřené na schopnost houby infikovat hostitele – molici *Bemisia tabaci* ukázaly, že larvy 1. až 3. instaru jsou nejnámavější a míra infekce larev 2. instaru může dosahovat 98 %. Stupeň infekce roste s delší dobou ošetření nebo s vyšší koncentrací spor (29).

Citlivost larev vyšších instarů mírně klesá, nicméně i na synchronizovaných populacích larev 4. instaru lze vyvolat vysokou frekvenci nákazy. Perzistence pykno spor na listech však může rezultovat v infikaci larev v okamžiku líhnutí z vajíček, po kontaktu s pykno sporami. Všechny parametry průběhu infekce jsou výrazně ovlivněny abiotickými faktory, zejména pak relativní vzdušnou vlhkostí a teplotou. Pykno spory klíčí pouze při vlhkostech nad 75 % a obdobně i celý další vývoj patogena probíhá pouze při vlhkostech nad 75 %. Výjimku tvoří pouze fáze tvorby hyfových tělísek, kdy se patogen vyvíjí uvnitř tělní dutiny hostitele a jeho závislost na vnější vlhkosti je podstatně nižší. Relativní vzdušná vlhkost ovlivňuje i závěrečnou fázi vývojového cyklu – prorůstání mycelia na povrch těla usmrčené larvy a sporulaci. Při nižších vlhkostech mycelium patogena na povrch hostitele neprorůstá a patogen vykazuje stav „dormance“, který se však rychle mění v následnou aktivitu (růst mycelia a sporulace), nastanou-li vhodné vlhkostní podmínky. Z hlediska účinnosti *A. aleyrodis* je za kritické označováno období 24–48 po aplikaci (fáze bobtnání, klíčení a penetrace patogena do hostitele). V tomto období je nutné v cílovém agroekosystému zajistit relativní vzdušnou vlhkost na hodnotách nad 75 %. Teploty mají na vývoj patogena také značný vliv, nicméně podstatně menší než vlhkost.

Optimální teploty pro vývoj *A. aleyrodis* se pohybují v rozmezí 25–28 °C. Při nižších teplotách se vývojový cyklus výrazně prodlužuje a prakticky se zastavuje při teplotách pod 12 °C. Obdobně i při vyšších teplotách dochází ke zpomalení vývoje a při teplotách nad 32 °C se patogen již nevyvíjí (85).

Spory vyžadují ke klíčení rozmezí teplot 15 až 30 °C (96).

V optimálních podmínkách může být celý vývojový cyklus realizován v průběhu 5–7 dnů. Prvé příznaky infekce se na hostitelích objevují 3.–4. den po iniciaci nákazy pykno sporami a plně sporulace patogena na hostiteli může být dosaženo 6.–7. den.

Autekologická charakteristika predeterminuje využití entomopatogenní houby *A. aleyrodis* v rámci biologické ochrany proti molícím ve dvou podobných typech agroekosystému – jednak v polních agroekosystémech v tropických a subtropických oblastech a jednak v agroekosystémech skleníku (85).

Bylo prokázáno, že *A. aleyrodis* infikuje a usmrcuje larvy a kukly (nikoliv však vajíčka) molice skleníkové (*Trialeurodes vaporariorum*) a larvy *Bemisia tabaci* na poinsettiiích a okurkách. Pokusy na zelenině ukázaly, že postřik suspenzí konidií může způsobit 75% mortalitu *T. vaporariorum* za různých klimatických podmínek. V ochraně proti *T. vaporariorum* lze *A. aleyrodis* kombinovat s parazitickou vosičkou *Encarsia formosa*. Parazitované larvy molice s nedospělými, více než 4 dny starými parazitoidy jsou imunní k infekci *A. aleyroides*. Vývoj larvy vosičky vyvolává fyzikální a fyziologické změny v hostiteli, které snižují jeho náchylnost vůči houbové infekci. Naopak *E. formosa* je schopná rozeznat a odmítnout molici infikovanou *A. aleyrodis* minimálně sedm dní. Jestliže hostitelé jsou parazitováni ještě před těmito sedmi dny, *A. aleyrodis* inhibuje vývoj parazitoida. *A. aleyroidis* a *E. formosa* se proto zdají být vysoce kompatibilním přirozeným nebezpečím pro kombinované užití proti *T. vaporariorum* ve sklenicích (96).

V dalších pokusech byla hodnocena patogenita 31 izolátů *A. aleyroides* pro larvy 3. instaru molice *Bemisia argentifolii* a *Trialeurodes vaporariorum* na poinsettii (*Euphorbia pulcherrima*). Úroveň infekce molice se pohybovala mezi 2 a 70 % a u obou druhů byla přibližně stejná. Mortalita *T. vaporariorum* však byla vyšší než u *B. argentifolii*. Některé izoláty, mezi nimi také neidentifikovaného druhu *Aschersonia* pocházejícího z Thajska a Malajsie, *A. aleyrodis* z Kolumbie a *A. placenta* z Indie vykazovaly vysokou produkci spor a vysokou úroveň infekce jak u *T. vaporariorum*, tak i u *B. argentifolii* (45).

Mezi houby napadající larvy molice patří také *Aschersonia goldiana* Sacc. et Ellis označovaná jako žlutá *Aschersonia*. Je účinná proti molici citrusové (*Dialeurodes citrifolii*), která je nejběžnější molicí ve střední a jižní části floridské citrusové oblasti. Společně s *A. aleyrodis* se zde běžně vyskytuje během vlhkého léta a na podzim.

Z dalších hub parazitujících molice v citrusových sadech na Floridě lze jen okrajově jmenovat *Aegerita webberi* (napadá obě citrusové molice *Dialeurodes citri* a *D. citrifolii*, objevuje se obvykle za suchého počasí); *Fusarium aleyrodis* (vytváří jemné bílé „třásně“ na larvách molice, běžně se vyskytuje na obou citrusových molících *Dialeurodes citri* a *D. citrifolii*); skořicová houba *Verticillium cinnamoneum* (vytváří hnědé pustule s práškovým skořicově zbarveným povrchem, napadá larvy molice, nedosahuje však takového významu v ochraně proti molícím jako jiné entomopatogenní houby) (17).

V roce 1998 byla epizootie *A. goldiana* zaznamenána v Brazílii v oblasti Guaira-Miguelópolis v porostech sóji napadených molicí *Bemisia tabaci* biotypu B. Ve stejné době na dvou jiných sójových polích v této oblasti byl výskyt této entomopatogenní houby nízký, v následujících dvou týdnech se však zvyšoval a houba poskytovala vysokou ochranu listů proti hmyzu. Ukázalo se tak, že *A. goldiana* by mohla být účinným agens v biologické ochraně proti *B. tabaci* biotypu B (40).

Význam *A. aleyrodis* (ale i jiných zástupců z rodu *Aschersonia*) jako stabilizujícího prvku agrobiocenóz citrusových výsadeb v subtropických a tropických oblastech je znám již od počátku století, a i v současnosti patří k nejnámějším příkladům samovolné účinnosti bioagens, nevyžadujícího umělé introdukce inokulativního nebo inundativního charakteru. Z tohoto pohledu jsou nejdůležitější studie, které téměř kontinuálně již od roku 1908 probíhají v citrusových výsadbách na Floridě. Fawcett (1908) definoval status houby *A. aleyrodis* jako „přátelské houby“ (friendly fungus of citrus), vycházející z poznání, že tato houba nevykazuje žádný negativní vliv na hostitelskou rostlinu, naopak, je přísně vázána na klíčové druhy škůdců (*Dialeurodes citri*, *D. citrifolii*) a zajišťuje přirozenou regulaci četnosti jejich populací. V letech 1906–1920 byla *A. aleyrodis* i uměle introdukována do citrusových výsadeb. V té době byla používána metoda aplikace suspenzí pykno spor získaných smytím z listů, na kterých byla *A. aleyrodis* přítomna v důsledku přirozené epizootie. Později byly použity i pykno sporové suspenze získané po kultivaci patogena na umělých živných substrátech. Od roku 1920 byly umělé introdukce používány jen výjimečně, vzhledem k tomu, že pravidelné propukání spontánních epizootií zcela postačovalo k udržení četnosti populací uvedených druhů molic na tolerovatelné úrovni. Tuto účinnost vykazuje *A. aleyrodis* v citrusových výsadbách i v současnosti a chemická ochrana proti molicím na citrusech v oblasti Floridy je pojem téměř neznámý. Obdobná situace je známá i z jiných oblastí pěstování citrusů (85).

Biopreparáty

Zkušenosti s *A. aleyrodis* v agroekosystémech citrusových sadů se následně odrazily i v zájmu o tohoto patogena jako potenciálního bioagens v ochraně rychlené zeleniny a okrasných květin proti molicí *T. vaporariorum*. Prvé pokusy zaměřené na záměrné introdukce tohoto bioagens do agroekosystému skleníků byly úspěšně realizovány v SSSR a následně i řadě dalších zemí. V ČR byla *A. aleyrodis* poprvé testována již v roce 1976 a v provozních pokusech byla odzkoušena v letech 1981–1982. V Evropě byl tento patogen testován ve sklenících v Nizozemsku, Švédsku, Velké Británii a Bulharsku. Přes řadu velmi pozitivních zkušeností s účinností tohoto patogena není doposud jeho používání běžnou záležitostí a stále má víceméně pokusný charakter (85).

2.2.2 *Beauveria* spp.

Říše: *Fungi*

Oddělení: *Eumycota*

Pomocné pododdělení: *Deuteromycotina*

Pomocná třída: *Hyphomycetes*

Řád: *Moniliales*

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

***Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch**

Houba *Beauveria bassiana* je prvním mikroorganismem, u něhož byla prokázána patogenita (Bassi, 1835). Monografii rodu sestavil Mac Leod (1954), který ustanovil dva druhy – *B. bassiana* a *B. brongniartii* parazitující všechna stadia různých skupin hmyzu. Sporadicky jsou také nalézány v plicích divoče žijících hlodavců a v nosním sekretu koní, člověka a želvy obrovské (84).

B. bassiana je typickým představitelem entomopatogenní mykoflóry půdy (86).

Je rozšířena kosmopolitně, mezi mitosporickými houbami má jedno z největších hostitelských spekter a vyskytuje se jako ubikvitární saprofyt v půdě (84), kde přetrvává na organických zbytcích. V půdě se nachází také v podobě mycelia v uhynulých jedincích infikovaného hmyzu (86).

Parazituje na stadiích hmyzu, která se vyskytují v půdě (např. při přezimování). V sortimentu hostitelů jsou zástupci z řádů rovnokřídlí (např. krtonožky), brouci (např. larva a kukly chroustů a chroustků, mandelinky bramborové, lalokonosců a mnoho dalších druhů), larvy a kukly motýlů a dvoukřídlého hmyzu. V poslední době byly izolovány i kmeny *B. bassiana*, které vykazují vysokou virulenci na různých druzích stejno křídlého hmyzu (např. na molicích a mšicích) (37).

B. bassiana infikuje také další hospodářsky významné škůdce: např. zavíječe kukuřičného (*Ostrinia nubilalis*), obaleče jablečného (*Laspeyresia pomonella*), *Popillia japonica*, *Blissus leucopterus*, *Pieris brassicae*. Na jihu USA je častým patogenem druhu *Curculio caryae* (84).

B. bassiana vytváří na povrchu infikovaného hostitele husté bílé mycelium. Proto nákazy vyvolané těmito houbami jsou označovány jako „bílé muskardiny“ (91).

B. bassiana je šířena pomocí konidií, které ulpívají na povrchu hostitele, rostlin a v půdě (84, 86).

Konidie uchycené na povrchu hostitele za vhodných podmínek klíčí. Po krátkém růstu na povrchu kutikuly dochází k proniknutí vláken kolmo do chitového povrchu kutikuly a dále do tělní dutiny. V místě, kde větší svazek pronikl do kutikuly, se pozvolna vytváří černý nepravidelný terčík, reakce fenoloxidázy na přístup vzduchu zvenčí. Hyfová tělíska oddělená od houbového vlákna, které odumírá, jsou pomocí hemolymfy rozváděna po celém těle. Jsou napadány lymfocyty, které je fagocytují a přitom samy hynou. Hyfy při své růstu spotřebovávají živiny v hemolymfě. Hmyz hyne, jsou-li zničeny všechny lymfocyty. Uvnitř těla se vytvářejí fruktifikační vlákna, na nichž vznikají endokonidie (blastospory). Z těch poté vyrůstají nové hyfy, které po určitém růstu opět fruktifikují. Tímto dochází k nárůstu myceliární hmoty a úplnému vyplnění těla hmyzu. Při dostatku vlhkosti (92 a více procent) prorůstají hyfy na povrch těla. Na povrchu mumifikovaného těla se zdvíhají vlákna, na kterých se vyvíjejí vzdušné konidie (86).

Uhynulý hmyz je po jednom až dvou dnech zcela porostlý myceliem a bílými konidii (84).



Obr. 1. Housenky a kukla *Heliothis virescens* zcela pokryté bílými konidioforami a konidii houby *Beauveria bassiana*



Obr. 2. Dospělec *Heliothis virescens* porostlý houbou *Beauveria bassiana*

Další cesta infekce je možná přijímáním potravy, na které ulpěly konidie. Infekce probíhá ve své podstatě stejně, s tím rozdílem, že začátek infekce je prorůstáním zažívacího traktu hmyzu a následuje šíření v organismu.

K velice důležitým primárním metabolitům patří enzymy, které houba produkuje při penetraci hostitele kutikulou. Aby mohlo dojít k penetraci a následné infekci, musí *B. bassiana* produkovat nejméně dva druhy enzymů v určitém pořadí (86).

Po proniknutí houby dovnitř hostitele produkuje houba sekundární metabolit beauvericin, který oslabuje imunitní systém hostitele (84, 86).

Po smrti hostitele umožňuje houbě produkované antibiotikum oosperin konkurovat intestinálním bakteriím.

B. bassiana může též kolonizovat rostliny jako endofyt, čehož je možno využít při redukci zavíječe kukuřičného (*Ostrinia nubilalis*) (86).

Bylo zjištěno, že endofytický vztah (schopnost kolonizovat rostlinu kukuřice, aniž by ji nějak poškozovala) poskytuje dlouhodobou ochranu proti housenkám zavíječe. Možná ochrana by pak spočívala v inokulaci rostlin touto houbou v dostatečném předstihu před kladením vajíček zavíječe. Jako efektivní se také jeví postřik roztokem obsahujícím spory této houby, kdy v laboratorních podmínkách došlo k prvnímu úhynu po 48 hodinách a po 72 hodinách bylo dosaženo 50% mortality housenek. Bylo také prokázáno, že efektivita takového roztoku vzrůstá s koncentrací spor. Problémem v případě této houby by mohla být její polyfágnost a využití by pak mohlo představovat nebezpečí i pro necílové organismy včetně užitečných. Některé výzkumy se již touto problematikou zabývají. Například bylo zjištěno, že v laboratorních podmínkách docházelo k vysoké mortalitě larev slunéček poté, co byly vystaveny roztoku spor houby *B. bassiana*, avšak v přírodních podmínkách se slunéčka infekci touto houbou vyhýbají. Řešení by mohlo spočívat v nalezení selektivněji působícího kmene této houby (54).

Potenciál entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* poprvé přitáhl v polovině 90. let pozornost Dr. Roba Jacobsona, tehdy vědce HRI (Horticulture Research International), nyní nezávislého konzultanta IPM. Objevy využil nejdříve k ochraně proti molici *Bemisia* u bavlníku v Arizoně a poté se podrobně zabýval prozkoumáváním jejího potenciálu pro používání u plodin pěstovaných ve Velké Británii.

Počáteční práce ukázala schopnost houby regulovat klíčové škůdce včetně molic, svlušek, třásněnky západní (*Frankliniella occidentalis*). Následující projekty ukázaly jasný potenciál *B. bassiana* v regulaci třásněnky západní (*Frankliniella occidentalis*) u okurek a svlušky chmelové (*Tetranychus urticae*) u rajčat.

Dr. Jacobson dosáhl 50–60% regulace cílových škůdců a tvrdí, že potenciál této houby spočívá v zajišťování druhé linie obrany jako podpory primární regulace. Například v případě programu integrované ochrany proti škůdcům by predátor (*Ambyseius cucumeris*) poskytl primární ochranu a houba *B. bassiana* by upravila rovnováhu, jestliže by se škůdce vymkl kontrole (27).

Bylo prokázáno, že pokud je *B. bassiana* používána ve spojení s tímto predátorským roztočem, je vysoce účinná proti třásněnce západní (*Frankliniella occidentalis*) na okurkách. Výzkum prováděný dvěma ústavu také nedávno ukázal, že tato houba v kombinaci s roztočem poskytuje vynikající výsledky i na rajčatech (57, 70).

Houba *B. bassiana* se používá také v ochraně proti svlušce chmelové (*Tetranychus urticae*). Spory klíčí na těle hmyzu, hyfy pronikají kutikulou a spotřebovávají obsah těla svlušky. Organizace Horticultural Development Council se zabývala výzkumem potenciálu *B. bassiana* proti dalším druhům svlušek jako například *Tetranychus cinnabarinus* u plodin pěstovaných pod krytem. Výhodou je možnost začlenění do managementu integrované ochrany rostlin (58).

Jako perspektivní se jeví možnost využití *B. bassiana* v ochraně řepky proti blýskáčku řepkovému (*Meligethes aeneus*). V pokusech prováděných ve Švýcarsku byla z odchycených jedinců kromě *B. bassiana* izolována pravděpodobně také *B. brongniartii*. Výskyt *B. brongniartii* byl překvapením. Tato houba je považována za specifického patogena chroustů a od r. 1991 se ve Švýcarsku používá v ochraně proti ponravám. Nález je proto přijímán s opatrností a musí být ještě potvrzen pomocí genetických markerů (52).

V Německu je již několik let zkoumán dlouhodobý účinek entomopatogenní houby *Beauveria brongniartii* v ochraně révy vinné proti ponravám chroustů v přirozených podmínkách.

B. brongniartii se zde pokusně aplikuje také v jabloňových sadech. Důvodem je vysoký výskyt ponrav v mnoha ovocnářských oblastech v posledních letech (95).

V ekologickém ovocnářství ve Švýcarsku je v současné době velkým problémem vrtule třešňová, která způsobuje červivost plodů. Jako nejvhodnější ochrana se zatím jeví používání houby *B. bassiana*, a to zapravené zhruba tři centimetry pod povrch půdy, kde její spory nezničí sluneční záření (11).

Entomopatogenní houby jsou rovněž efektivními antagonisty lýkožroutů, kteří patří k nejvýznamnějším škůdcům lesních dřevin (zejména jehličnatých). Na základě uspokojivých laboratorních testů s houbami *Beauveria bassiana* a *Metarhizium anisopliae* byla ze tří německých výzkumných ústavů sestavena pracovní skupina vědců, která prováděla několik let praktické testy proti lýkožroutu smrkovému (*Ips typographus*). Nová strategie, spočívající v kombinaci komerčních feromonových lapáků s *B. bassiana* k infikování populace lýkožrouta, byla zatím testována pouze v laboratorních podmínkách a v malé míře také v pokusech v praxi (95).

V ČR byl v rámci rozsáhlého projektu ve spolupráci Zemědělské fakulty JU a Správy NP a CHKO Šumava v NP Šumava realizován rozsáhlý monitoring přirozeného výskytu entomopatogenních hub asociovaných s lýkožroutem smrkovým (*Ips typographus*). V populacích dospělců odchycených feromonovými lapači byla kromě *B. bassiana* zaznamenána také houba *Lecanicillium lecanii*; z dospělců a larev lýkožrouta byly izolovány prakticky všechny významné entomopatogenní druhy, včetně *B. bassiana*, a i ve vzorcích půd odebraných na lokalitách napadených lýkožroutem byla zaznamenána přítomnost řady významných druhů entomopatogenních hub. V populaci lýkožrouta na jedné lokalitě byla zaznamenána velmi vysoká mortalita vyvolaná nativním kmenem entomopatogenní houby *B. bassiana*. Výsledky této studie prokázaly, že výskyt entomopatogenních hub v populacích kůrovce je zcela běžný, a že za určitých okolností mohou některé kmeny spontánně indukovat epizootii (hromadnou nákazu) v rozsahu blízkém lokální likvidaci populace tohoto škůdce. Největší potenciál ze sledovaných hub vykazovala *B. bassiana* (39).

Biopreparáty

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 blastospor a konidií. Konidie vznikají téměř stejně rychle jako blastospory, jsou však stálejší (86).

V zahraničí je k dispozici řada biopreparátů formulovaných na bázi konidií nebo blastospor *B. bassiana* a *B. brongniartii* a využívaných v praktické biologické ochraně proti různým škůdcům polních plodin a v ochraně rychlené zeleniny a okrasných květin. Biopreparáty jsou využívány i v ochraně lesních porostů proti některým druhům škůdců, včetně lýkožrouta smrkového (39, 111).

Firma Mycotech Corporation (USA) vyvinula na bázi entomopatogenní houby *B. bassiana* systémem dvoufázové produkční technologie biopreparát **Mycotrol**. Mycotrol obsahuje jako aktivní část konidie *B. bassiana* kmen GHA. Je určen pro redukci populací fytofágního hmyzu, molic, třásněnek, svilušek aj. škodících na polních plodinách, zelenině i ovoci. Aplikaci Mycotrolu není možno sloučit s fungicidy, přípravek je však kompatibilní s mnohými insekticidy. Optimální teplota růstu je 23–26 °C při relativní vlhkosti vzduchu nebo vlhkosti substrátu 80–100 %. Minimální teplota pro růst mycelia je 5–8 °C, maximální teplota pro růst mycelia je 28–31 °C (86).

B. bassiana jako bioagens, užívané v biologické ochraně proti mandelince bramborové, je uváděna jako velmi proměnlivý činitel v různých polních studiích. Tato proměnlivost je dána formulačními problémy v biopreparátech, citlivostí k UV záření a k vlhkosti. V pokusech provedených ve třech lokalitách v roce 1996 byla *B. bassiana* účinná proti mandelince bramborové v Polsku a v České republice, ale neúčinná v Marylandu v USA. Účinnost ochrany byla hodnocena podle redukce larev v populaci škůdce. Jedním z hlavních rozdílů mezi pokusnými místy byla teplota. V Polsku se průměrné teploty pohybovaly v rozmezí od 5 °C do 23 °C, v České republice od 6,7 °C do 18,7 °C a v Marylandu teploty v období aplikace přesáhly 45 °C v úrovni bramborové natě. Proto byl sledován růst *B. bassiana* *in vitro*. Zatímco *B. bassiana* roste v laboratoři v rozmezí teplot 16–30 °C, *B. bassiana* z komerčního biopesticidu (Mycotrol™) nekličila při teplotách nad 37 °C. Klíčení a následující vývoj této entomopatogenní houby jsou kritickými faktory při infekci a ochraně proti mandelince bramborové. V důsledku neschopnosti *B. bassiana* klíčit při vysokých teplotách nelze očekávat, že ochrana proti škodlivému hmyzu tímto bioagens bude účinná v klimatu s vysokými letními teplotami. Houba však může být vhodná pro ochranu proti hmyzu brzy na jaře nebo v chladném klimatu v průběhu vegetace (42).

Polsko-česko-americké pokusy zaměřené na ochranu proti mandelince bramborové, které se paralelně uskutečnily v Poznani, Havlíčkově Brodě a Beltsville, ukázaly, že dobré výsledky vykazuje biopreparát Mycotrol GH-OF (*B. bassiana* kmen GHA). Rozdíly ve výnosech hlíz u parcel ošetřených tímto přípravkem ve srovnání s ošetřením biopreparátem Novodor (*Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*) a chemickým insekticidem Karate (lambda-cyhalotrin) nebyly významné, ale byly přibližně dvojnásobné než v neošetřené kontrole (55).

Vzhledem k tomu, že mandelinka bramborová je schopna vytvořit si v krátké době rezistenci vůči všem insekticidním účinným látkám (např. v Německu je známa rezistence vůči karbamátům a esterům kyseliny fosforečné, v Rakousku a Polsku vůči pyrethroidům), jeví se možnost biologické ochrany využitím přípravků na bázi houby *B. bassiana* jako velmi perspektivní. Zde je však potřeba vzhledem k slabšímu účinku přistoupit k aplikaci dříve než u syntetických přípravků. Optimální doba je krátce po prvním výskytu larev 1. a 2. stadia. Případné další ošetření je nutné uskutečnit v době masového výskytu larev 1. a 2. stadia (28).

Firma Mycotech produkuje dále biopreparát **BotaniGard**, jenž obsahuje též *B. bassiana* kmen GHA, je však primárně určen pro používání ve skleníku (86).

V USA a Evropě jsou k dispozici výrobky založené na houbě *B. bassiana* určené pro hubení třásněnky západní (*Frankliniella occidentalis*) včetně přípravku BotaniGard, který byl nedávno registrován společností Certis Netherlands.

Práce uskutečněná britskými výzkumnými společnostmi Horticultural Research International (HRI) a Stockbridge Technology Centre zjistila, že přípravky na základě houby *B. bassiana* mohou rychle poskytnout vysokou úroveň ochrany proti třásněnce západní u okurek a svilušce chmelové (*Tetranychus urticae*) u rajčat. V současnosti probíhá další výzkum organizací Horticultural Development Council (HDC) a britského ministerstva pro zemědělství Defra, který zkoumá potenciál produktů na základě *B. bassiana* u plodin pěstovaných v polních podmínkách, například salátu a kapusty (69).

Podle společnosti Certis vykazuje přípravek BotaniGard účinnost srovnatelnou s konvenčními programy (27).

Ve Švýcarsku a v Rakousku se již několik let používá biologický přípravek obsahující přirozeného nepřítele ponrav – houbu *Beauveria brongniartii*. Granulát, který se vyrábí ze zrn ječmene porostlých touto houbou, je na švýcarském trhu již od roku 1991.

Přípravek se aplikuje zpravidla kombinovaným secím strojem v doporučené dávce 30 až 40 kg/ha. Pro dosažení co nejlepšího účinku je důležité, aby přípravek byl aplikován hluboko do vlhké půdy. Zemědělci ve Švýcarsku, kteří již několik let přípravek používají, uvádějí, že na 80 až 100 % ploch jsou s účinky velmi spokojeni. K tomu, aby se snížil počet ponrav, je potřeba ošetřit napadené plochy 25 kg/ha po náletu chroustů koncem srpna/začátkem září a 25 kg/ha v následujícím roce koncem března/začátkem dubna. Náklady činí zhruba 320 až 384 EUR na hektar, účinek by však měl být zajištěn přibližně na 10 let (50).



Obr. 3. Chroust napadený *Beauveria brongniartii*

V Německu byl nedávno registrován biologický insekticid **Naturalis** na bázi klíčivých spor houby *Beauveria bassiana*. Přípravek byl vyvinut firmou Intrachem Bio Deutschland GmbH a je určen ke snížení napadení brambor drátovci.

Naturalis je mísitelný s fungicidním mořidlem Monceren a hnojivý (Proradix, roztok ledku amonného s močovinou). Je možná také kombinace s měďnatými přípravky. Hnojiva s obsahem manganu nevykazují podle dosavadních poznatků žádný dlouhodobý účinek na tento biopreparát. Naturalis však není mísitelný s mořidlem Risolex, které výrazně redukuje klíčivost spor účinného agens přípravku – houby *Beauveria bassiana*. Společná aplikace těchto dvou přípravků se proto na základě současných poznatků nedoporučuje (8).

V ČR byl registrován biopreparát **Boverol** obsahující entomopatogenní houby *B. bassiana*. Boverol byl primárně určen pro použití při regulaci populací larev mandelinky bramborové. Jeho použití je možné i při regulaci jiných škůdců, např. *Ostrinia nubilalis*, *Cydia pomonella* a dalších druhů obalečů u ovocných kultur, dále proti ponravám chroustů, larvám nosatců na kořenech užitkových rostlin atd. (86).

Preparát Boverol (prášek obsahující spory houby *B. bassiana* v inertním plnidle – amorf-ní kysličník křemičitý) se používá i v ochraně proti lesním škůdcům – k ošetření housenic pilatek, školkového materiálu a škůdců v korunách stromů (chrousti) nebo v půdě (kromě ponrav i lalokonosci, klikoroh) (26).

Využívání biopreparátů na bázi *B. bassiana* proti *Ips typographus* je rozšířeno zejména v Německu, Švýcarsku a Rakousku, na experimentální úrovni je tato houba zkoušena i v dalších zemích (např. USA, Austrálie, Finsko, Polsko). Nejčastěji je *B. bassiana* aplikována formou vodních suspenzí spor na povrch napadených stromů nebo stromových lapáků. Výsledky laboratorních studií a provozních aplikací dokazují, že v porovnání s většinou ostatních druhů entomopatogenních hub vykazuje *B. bassiana* po aplikaci na dospělé *I. typographus* nejen nejvyšší virulenci, ale i zjevně největší adaptaci na tohoto hostitele ve smyslu autodiseminace (samošíření), tj. schopnosti patogena šířit se prostřednictvím přirozených mechanismů odrážejících populační chování hostitele. Příkladem praktického využívání tohoto jevu je i unikátní forma aplikace *B. bassiana*, při které je práškový koncentrát spor patogena aplikován přímo do sběrné části feromonového lapače, který je upraven tak, aby byla zachována jeho atraktantní funkce, nicméně dospělci kůrovce nejsou natrvalo odchyceni sběrnou částí lapače. Cílem této aplikace je kontaminovat povrch těla dospělců vysokou dávkou spor a zajistit tak nejen usmrcení konkrétního jedince kontaminovaného při průchodu lapačem, ale zároveň podpořit i šíření nákazy v lokální populaci. Praktické výsledky prokázaly, že tato forma využití biopreparátů na bázi *B. bassiana* je velmi účelná zejména v situacích, kdy od aplikace není očekáván okamžitý účinek, ale perspektiva dlouhodobějšího potlačování populací škůdce (39).

Mezi výhledové možnosti biologického boje proti ponravám v lesních školkách a kulturách je možno zahrnout využití mycelia houby *B. bassiana* na nosiči (např. ječmen), který se zapraví do půdy v dávce cca 100 kg/ha. Přípravek je zaregistrován např. v Rakousku. Účinnost je dokládána na úrovni 60–80 %, předpokládaná cena se pohybuje v rozmezí 8 000–10 000 Kč/ha (66).

2.2.3 *Hirsutella* spp.

Říše: *Fungi*

Oddělení: *Eumycota*

Pomocné pododdělení: *Deuteromycotina*

Pomocná třída: *Hyphomycetes*

Řád: *Moniliales*

Rod *Hirsutella* infikuje řadu různých zástupců hmyzu, roztočů a hlístic (81).

Zahrnuje přes 50 entomopatogenních druhů, akarifágních druhů je však známo pouze několik (74).

Tab. 6 **Druhy rodu *Hirsutella* patogenní pro roztoče** (74)

Patogen	Hostitel	Čeleď
<i>Hirsutella brownorum</i>	půdní roztoči	
<i>Hirsutella gregis</i>	<i>Abacarus hystrix</i>	<i>Eriophyoidea</i>
<i>Hirsutella haptospora</i>	<i>Uropodina</i> sp.	<i>Uropodoidea</i>
<i>Hirsutella kirchneri</i>	<i>Abacarus hystrix</i> <i>Eutetranychus orientalis</i> <i>Hemisarcoptes coccophagus</i> <i>Panonychus citri</i> <i>Phyllocoptruta oleivora</i> <i>Tetranychus cinnabarinus</i>	<i>Eriophyoidea</i> <i>Tetranychidae</i> <i>Hemisarcoptidae</i> <i>Tetranychidae</i> <i>Eriophyoidea</i> <i>Tetranychidae</i>
<i>Hirsutella necatrix</i>	<i>Abacarus hystrix</i> <i>Tetranychus cinnabarinus</i>	<i>Eriophyoidea</i> <i>Tetranychidae</i>
<i>Hirsutella nodulosa</i>	<i>Aceria guerreronis</i> <i>Phyllocoptruta oleivora</i> <i>Polyphagotarsonemus latus</i>	<i>Eriophyoidea</i> <i>Eriophyoidea</i> <i>Tarsonemidae</i>
<i>Hirsutella rosrata</i>	<i>Dendrolaelaps tetraspinosus</i> <i>Proctolaelaps</i> sp.	<i>Digamasellidae</i> <i>Ascidae</i>
<i>Hirsutella thompsonii</i>	<i>Abacarus hystrix</i> <i>Acalitus vaccinii</i> <i>Aceria</i> sp. <i>Aceria guerreronis</i> <i>Aceria sheldonii</i> <i>Calacarus heveae</i> <i>Colomerus novaehbridensis</i> <i>Dolichotetranychus floridanus</i> <i>Eutetranychus banksi</i> <i>Eutetranychus sexmaculatus</i> <i>Mononychellus tanajoa</i> <i>Panonychus citri</i> <i>Phyllocoptruta oleivora</i> <i>Polyphagotarsonemus latus</i> <i>Retracus elaeis</i> <i>Rhynacus</i> sp. <i>Tetranychus cinnabarinus</i> <i>Tetranychus ilicis</i> <i>Tetranychus urticae</i> <i>Trachyuropoda coccinea</i> <i>Vasates destructor</i>	<i>Eriophyoidea</i> <i>Eriophyoidea</i> <i>Eriophyoidea</i> <i>Eriophyoidea</i> <i>Eriophyoidea</i> <i>Eriophyoidea</i> <i>Eriophyoidea</i> <i>Tenuipalpidae</i> <i>Tetranychidae</i> <i>Tetranychidae</i> <i>Tetranychidae</i> <i>Tetranychidae</i> <i>Eriophyoidea</i> <i>Tarsonemidae</i> <i>Eriophyoidea</i> <i>Eriophyoidea</i> <i>Tetranychidae</i> <i>Tetranychidae</i> <i>Tetranychidae</i> <i>Trachyuropodidae</i> <i>Eriophyoidea</i>
<i>Hirsutella tydeicola</i>	<i>Lorryia formosa</i> <i>Tydeus californicus</i> <i>Tydeus gloveri</i>	<i>Tydeidae</i> <i>Tydeidae</i> <i>Tydeidae</i>

Entomopatogenní druhy (např. *H. longicolla* infikující obaleče *Choristoneura* sp.) vytváří synemata (struktury složené z kompaktní skupiny vzpřímených konidioforů). Nejlépe popsáný druh – *H. thompsonii* – tvoří jednotlivé konidiofory. Tento druh a další druhy s jednotlivými konidiofory obvykle infikují hmyz z řádu stejnokřídlých a roztoče. Jeden druh – *H. rhossiliensis* – napadá hlístice (81).

Některé biologické charakteristiky, včetně virulence pro členovce, se v rámci rodu liší.

Houby rodu *Hirsutella* jsou považovány za kandidáty biologické ochrany proti roztočům a hmyzu (74).

***Hirsutella thompsonii* F. E. Fischer**

Druhu *H. thompsonii* je věnována velká pozornost, protože je silně patogenní k fytofágním roztočům, jako např. *Phyllocoptruta oleivora* (81).

První publikovaná zpráva o infekci vlnovníků (*Eriophyidae*) pochází z roku 1924: Speare a Yothers zaznamenali náhlou redukcí populace vlnovníka *Phyllocoptruta oleivora* na grapefruitech na Floridě. Autoři našli na uhynulých roztočích houbová vlákna a zjistili pokles výskytu houbové infekce po aplikaci fungicidních postřiků.

Fischer v roce 1950 popsal tuto houbu jako *H. thompsonii*. V publikaci byla popsána také *H. besseyi*, izolovaná ze stejného škůdce, jejíž taxonomický status však byl později zpochybněn (74).

Na základě ultrastrukturální analýzy konidiogenní struktury byly v roce 1980 ustanoveny tři morfologicky odlišné skupiny, které byly definovány jako tři různé variety: *H. thompsonii synnematosae*, jejíž areál je omezen na tropy a hostiteli jsou vlnovníci rodu *Aceria* a příbuzné rody, a další dvě variety *H. thompsonii thompsonii* a *H. thompsonii vinacea*, vyskytující se v subtropickém a mírném pásu. Var. *vinacea* vytváří na agaru vínové kolonie, var. *thompsonii* typické šedozelené kolonie (74, 81).

Výskyt houby *H. thompsonii* byl kromě vlnovníků zjištěn i na jiných roztočích. Houba byla vysoce patogenní vůči svilušce *Tetranychus cinnabarinus* (při kultivaci na bramborovo-dextrózovém agaru nebo sterilních pšeničných otrubách) a patogenní vůči *Eutetranychus orientalis* (na bramborovo-dextrózovém agaru). Mykofágní roztoči jako *Tarsonemus* sp. a *Tyrophagus palmarum* nebyli infikováni touto houbou, ale posloužila jim jako potrava. Pokusy s užitím této houby k ochraně proti sviluškám (*T. cinnabarinus*, *E. orientalis* a *T. urticae*) ve skleníkových podmínkách byly neúspěšné (74).

Tento druh a některé druhy dravých roztočů byly nalezeny také v asociaci s vlnovníkem *Acalitus vaccinii* (10).

Biologická účinnost šesti izolátů *H. thompsonii* získaných z různých agroklimatických oblastí v Indii byla testována postřikem houbové suspenze na plody a listy infikované *Phyllocoptruta oleivora* a *Tetranychus urticae*. Ukázalo se, že všechny izoláty byly účinné proti *P. oleivora*. Mortalita se po deseti dnech od ošetření pohybovala u jednotlivých izolátů mezi 31 a 48 %. Tyto izoláty vykazovaly účinek také proti dospělcům *Tetranychus urticae*. Osm dnů po ošetření byla v závislosti na jednotlivých izolátech zaznamenána mortalita 20–71 %. Jeden z izolátů vykazoval rovněž účinnost vůči larválnímu stadiu *Tetranychus urticae* (šest dní po ošetření dosáhla mortalita téměř 89 %) (2).

Infekci vyvolávají konidie. Jsou opatřeny mukózním obalem, který usnadňuje ulpívání na kutikule hostitele. Za příznivých podmínek (vysoká relativní vlhkost) konidie klíčí a pronikají do všech částí těla hostitele (74, 81).

V pokusech se sviluškou chmelovou (*Tetranychus urticae*) probíhala invaze hub do těla hostitele zejména v oblasti nohou; k infekci byli náchylní dospělci i larvy (81).

Hyfy se v hemocelu větví a rozrůstají. Po smrti hostitele mycelium vystupuje z těla ústním, řitním nebo pohlavním otvorem. Konidie jsou produkovány mimo infikované a usmrčené jedince – na rostlinném substrátu (74, 81).

Fragmentací hyf v tělní dutině mohou vznikat vícejaderné chlamydospory. Tyto spory klíčí a produkují mycelium, které může pronikat do tělní dutiny roztočů nebo sloužit k nepohlavnímu rozmnožování na povrchu listů.

Penetrace spor do kutikuly hostitele trvá minimálně 4 hodiny (74), sporulace nastává během 9–24 hodin po usmrcení hostitele při minimálně 98% relativní vlhkosti a optimální teplotě (25–30 °C) (81).

Kompletní životní cyklus *H. thompsonii* *in vivo* na hostiteli je ukončen po 60–72 hodinách (81).

Houby vstupují do hostitele kutikulou, která je tvořena ze zhruba 30 % chitinem obklopeným proteinovou matrix. Houby často produkují proteázy, které hrají hlavní roli v první fázi penetrace chitinových vláken. Následná exkrece chitinolytických enzymů způsobuje degradaci vláken.

Chitinolytická aktivita byla studována u dvou izolátů *H. thompsonii* a *H. necatrix*. Bylo zjištěno, že izoláty *H. thompsonii* produkují amylázu, alfa-esterázu a proteolytické enzymy, včetně chitinázy a elastázy. Izoláty *H. necatrix* neprodukují elastázu a liší se také v produkci chitinázy a některých proteolytických enzymů. To korelovalo s patogenitou pro svilušku *Tetranychus cinnabarinus*: izoláty *H. thompsonii* vykazovaly vyšší patogenitu než izoláty *H. necatrix*. Ukázalo se tak, že k usmrcení roztočů může docházet i v důsledku částečného nahrazení deficitu elastázy a chitinázy jinými enzymatickými aktivitami (74).

In vitro tato houba produkuje protein hirsutellin A (HtA), který je po vpravení do těla nebo pozřením s potravou toxický pro roztoče, mšice, vrtule, komáry a různé motýly (81).

Silný cytotoxický efekt (pyknóza jádra a léze v cytoplazmě) byl pozorován ve středním střevě, Malpighiho trubici, hypodermis, tukovém tělese, hemocytech, svalech a žlázách produkujících hedvábní housenek zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) (74).

Biologické testy toxicity ukázaly, že vysokou mortalitu housenek zavíječe voskového vyvolává již aplikace nízké dávky HtA. Tento protein je rovněž toxický pro vylíhlé larvy komára *Aedes aegypti* (44).

HtA inhibuje růst buněk hmyzu v kultuře – např. u blýskavky *Spodoptera frugiperda* dochází k hypotrofii buněk a narušení vnitřních organel a membrán, takže růst je zcela inhibován čtyři dny po ošetření (81).

HtA je silně zásaditý, neglykosylovaný protein. Je hydrofilní a termostabilní, nevykazuje proteolytickou aktivitu a není inaktivován proteolytickými enzymy (44, 74, 81).

Struktura a biologické vlastnosti jsou podobné proteinům inhibujícím ribozomy (RIPs) (74, 81) jako restrictocin, mitogellin a alfa-sarcin a produkovaným některými druhy hub rodu *Aspergillus*. HtA podobně jako RIPs může vyvolávat specifické štěpení ribozomální RNA a inhibovat syntézu proteinů (81).

Pozdější práce prokázaly toxicitu pro široký okruh členovců včetně roztočů – v koncentraci 100 µg/ml způsobuje téměř 100% mortalitu roztoče *P. oleivora*. Je pravděpodobné, že HtA také redukuje fertilitu tohoto roztoče (74).

HtA vykazuje aktivitu i proti samičkám svlušky chmelové (*Tetranychus urticae*). Exudát produkovaný sporulující kulturou kmene HtM120I sterilizoval samičky tohoto roztoče v závislosti na použité dávce. Lokální aplikace exudátu vyvolala po šesti dnech 100% redukci fertility roztoče. V závislosti na množství exudátu roztoč tři až šest dnů po ošetření částečně regeneroval a produkoval omezený počet vajíček. Exudát z tohoto kmene byl neškodný pro housenky zavíječe voskového (*Galleria mellonella*). Extrakt z další kultury HtM120I byl toxický pro housenky zavíječe, ale neinhiboval kladení vajíček roztočů. Tento nález ukázal, že faktor zodpovědný za potlačení kladení vajíček v samičkách roztočů je spojen s procesem sporulace a je odlišný od HtA produkovaného vegetativními buňkami (56).

Na Floridě tato houba vyvolává za teplého a vlhkého počasí pravidelné epizootie v populacích roztočů (např. *Phyllocoptruta oleivora*) (74, 81), které postihují larvy i dospělce (74).

Také ve sklenicích v Izraeli může *H. thompsonii* způsobovat epizootie, jinde jen když je vlhkost zvýšena do saturace a denní teploty nedosahují 37 °C (18).

Houbu *H. thompsonii* lze snadno kultivovat na umělých živných půdách (na agaru i v tekutých živných půdách) (74).

Ve studii prováděné v Izraeli bylo prokázáno, že v polních podmínkách by mohla být *H. thompsonii* vhodná k ochraně proti roztočům v tropických a vlhkých subtropických oblastech (18).

Biopreparáty

Houba *H. thompsonii*, komerčně vyráběná v podobě přípravku **Mycar**, byla prvním mykopatogenem registrovaným v USA. Houba je produkována ve velkém měřítku submerzní fermentací. Mycelium je separováno od média filtrací a uchováváno v chladu (10 °C) až do použití. Před aplikací na poli je smícháno s vodou a s dalšími složkami (např. s melasou), které umožňují přilnutí k povrchu hostitele a chrání před teplem a vysycháním (81).

Tento biopreparát je v USA využíván v ochraně ovocných dřevin včetně citrusů proti některým druhům fytofágních roztočů (37).

Hirsutella rhossiliensis Minter & B.L. Brady

Hirsutella rhossiliensis se přirozeně vyskytuje v zemědělských půdách. Je kosmopolitně rozšířena (61).

Patří mezi houby nematofágní, parazitující zejména na sedentárních háďátkách (cystotvorná a hálkotvorná háďátka) v půdě (37, 61).

Lepivé mucilagenní konidie *H. rhossiliensis* se přichytí na kutikulu háďátek. Během dvanácti hodin se vytvoří klíční hyfa, která penetruje kutikulu háďátka. V hostiteli se vytváří infekční bulbus, z něhož vyrůstají asimilační hyfy a prorůstají tělem háďátka. S postupným růstem mycelia hostitel hyne. Nově vytvořené hyfy vyrůstají z těla háďátka a vytvářejí vzdušné mycelium s fialidami, na nichž se tvoří nové spory. Jak ve sklenicích, tak i na poli může *H. rhossiliensis* způsobovat vysokou mortalitu fytoparazitických háďátek. Vysoká hustota populace háďátek podporuje výskyt této houby v půdě. V praxi však stoupá míra parazitace houby se zvyšující se hustotou populace háďátek jen pomalu. Právě v citlivých raných fázích vývoje kulturních rostlin je hustota spor *H. rhossiliensis* v půdě často příliš nízká pro dostatečnou ochranu klíčnicích rostlin proti napadení háďátky. Hustotu spor v půdě je ale možné zvýšit umělou aplikací houby.

Používání přirozených antagonistů háďátek je jednou z možností ochrany cukrovky proti významnému škůdci – cystotvornému háďátku *Heterodera schachtii*. Pokusy s *H. schachtii* ukázaly, že přirozený výskyt nematofágní houby *H. rhossiliensis* zredukoval napadení zelí háďátky až o 77 %. Tato nematofágní houba by tedy mohla být jedním z kandidátů biologické ochrany.

Od objevení a popsání *H. rhossiliensis* v roce 1980 (Minter & Brady) pracují různé vědecké týmy na vývoji této houby do podoby biologického přípravku na ochranu rostlin. Předpokladem je vhodná formulace, která umožní etablování konkurenčně slabé houby *H. rhossiliensis* v půdě a zajistí snadnou a spolehlivou manipulaci s produktem. Byla například zkoumána aplikace houby jako vodní suspenze mycelia, která může být úspěšná, avšak v praxi se příliš neosvědčila. Také různými pracovními skupinami favorizované alginátové formulace se v polních podmínkách ukázaly jako méně účinné. Oproti tomu první pokusy (v roce 1998 a 2000) s houbovými kapslemi na bázi celulózy se ukázaly jako velmi nadějně. Na tyto pokusy navázaly další výzkumy. Protože bylo prokázáno, že spory oddělené od houbového mycelia již nejsou infekční, bylo k formulaci použito mycelium houby. K stimulaci růstu houby a k zvýšení její konkurenceschopnosti vůči jiným mikroorganismům byla formulace obohacena dalšími živinami. Formulace by měla být pokud možno složena z materiálů na bázi obnovitelných zdrojů. V pokusech byly použity a hodnoceny různé vlhké a suché formulace *H. rhossiliensis* proti *H. schachtii* na cukrovce. Výsledky posloužily k dalšímu testování toho, do jaké míry je tento postup vhodný jako základ pro biologický přípravek (61).

Výše a spolehlivost účinku *H. rhossiliensis* byla nadále optimalizována. Cílem výzkumu probíhajícího v Německu ve spolupráci několika předních vědeckých institucí bylo zjistit, jakou roli hraje formulace (enkapsulace). Jako enkapsulační (obalovací) materiál byl použit derivát přírodní látky guar gum. Účinnost formulace byla zkoumána v patosystémech cukrovka/*Heterodera schachtii* a rajče/*Meloidogyne incognita*. U *H. schachtii* na cukrovce vedla aplikace suché látky guar gum a kapslí s obsahem 1 % a 10 % houby k redukci počtu vajíček a larev o více než 68 % ve srovnání s inokulovanou, neošetřenou kontrolou. V systému rajče/*M. incognita* byla zkoumána efektivita vlhké guar gum a kapslí s 5% obsahem houby ve dvou velikostech: 2,4–4 mm a 4,5–6 mm. Houbové kapsle byly 14 dní před výsadbou rajčat, popř. inokulací *M. incognita* aplikovány do půdy. Po dalším týdnu byl stanoven počet penetrujících larev. Celkově byla pozorována jen malá redukce *M. incognita* (60).

Tyto výzkumy dále pokračovaly. V návaznosti na předchozí výzkumy byly více zaměřeny na využití derivátů přírodní látky guar gum jako materiálu k enkapsulaci *H. rhossiliensis* a na zjišťování účinnosti různých obalů nematofágní houby *H. rhossiliensis* proti cystotvornému háďátku *H. schachtii*. V nádobových pokusech byly aplikovány vlhké kapsle z biopolymerů guar gum MF a guar gum MG s 1 % *H. rhossiliensis* do propařené a nepropařené půdy a po sedmi dnech byl stanoven počet larev *H. schachtii*. Dále byla zkoumána účinnost vysušených jednaprocentních a desetiprocentních houbových kapslí z biopolymerů guar gum MF + pektinu PA5, popř. guar gum MG proti *H. schachtii* v propařené půdě. Při aplikaci do propařené půdy vedly všechny typy houbových kapslí k výrazné redukci napadení háďátky (více než 90% redukce napadení). Zvýšením obsahu houby z 1 na 10 % nedošlo k dalšímu zvýšení účinku proti *H. schachtii*, mělo však pozitivní vliv na růst rostlin cukrovky a vedlo k nárůstu hmotnosti nadzemní biomasy. Kapsle bez obsahu houby, popř. samotný enkapsulační materiál oproti tomu stimulovaly napadení háďátky. Pokud však byly houbové kapsle aplikovány do nepropařené půdy, nebyl zaznamenán žádný účinek, přičemž populace *H. schachtii* v cukrovce byla dokonce podstatně vyšší. Předpokládá se, že beztak pomalý růst konkurenčně slabé houby *H. rhossiliensis* z kapslí je ještě brzděn půdními mikroorganismy. Nakonec bylo zjištěno, že tyto biopolymery použité k enkapsulaci *H. rhossiliensis* nejsou v praxi vhodné k ochraně proti *H. schachtii* na cukrovce. Úspěšná aplikace *H. rhossiliensis* v biologické ochraně v praxi vyžaduje buď jiný obalový materiál, nebo vývoj alternativního způsobu formulace (61).

Byly také zkoumány účinky *H. rhossiliensis* na necílové organismy – hlístice *Steinernema feltiae* a *Heterorhabditis bacteriophora*. Parazitace *S. feltiae* byla vesměs velmi nízká. U parazitovaných larev však mortalita během čtyř dnů dosahovala přibližně 90 %. Podobné platilo pro *H. bacteriophora*, mortalita však byla mírně nižší (< 5 % pro larvy s přichycenými 1–10 konidiemi, < 70 % pro larvy s přichycenými 10–20 konidiemi).

Přípravky na ochranu rostlin vykazovaly rozdílné účinky na *H. rhossiliensis*. Insekticid Pirimor G WG a herbicid Goltix WG neměly žádný vliv na *H. rhossiliensis*. Herbicid Betanal Progress působil při normální aplikační dávce na houbu inhibičně, při redukované dávce však tento účinek zaznamenán nebyl. Růst houby *H. rhossiliensis* podle očekávání zbrzdil fungicid Euparen M WG.

Navzdory dosavadní nedostatečné účinnosti aplikace *H. rhossiliensis* v praxi je tato houba považována za nadějný antagonistický organismus, jehož integrace do současných strategií ochrany rostlin by mohla být poměrně snadná (60).

Biopreparáty

K ochraně proti cystotvorným háďátkům na cukrovce dosud neexistuje žádný biologický přípravek (61).

2.2.4 *Lecanicillium* spp.

Říše: *Fungi*

Oddělení: *Eumycota*

Pomocné pododdělení: *Deuteromycotina*

Pomocná třída: *Hyphomycetes*

Řád: *Moniliales*

Houby rodu *Lecanicillium* jsou významnými patogeny hmyzu. Některé izoláty jsou také aktivní proti fytopatogenním háďátkům nebo houbám. *Lecanicillium* spp. využívají k přímé penetraci integumentu hmyzu a buněčných stěn houbových patogenů rostlin jak mechanického působení, tak i hydrolytických enzymů. V případě mykoparazitismu rostlinných patogenů je mechanismus účinku spojen s kolonizací pletiv hostitelské rostliny a vyvoláním systémové získané rezistence (SAR). V nedávné době bylo prokázáno, že hybridní kmeny *Lecanicillium* spp. získané fúzí protoplastů, které nesou rodičovské vlastnosti, mají širší hostitelský okruh a další prospěšné vlastnosti, jako např. zvýšenou vitalitu. Tyto hybridy vykazují vyšší virulenci vůči mšicím, molícím a cystotvornému háďátku sójovému (*Heterodera glycines*) (20).

***Lecanicillium lecanii* (Zimmerman) Gams & Zare**

Houba *Lecanicillium lecanii* (dříve *Verticillium lecanii* nebo *Cephalosporium lecanii*) byla poprvé popsána v roce 1861 (14, 114) po izolaci z červce *Coccus viridis* (92).

Jedná se o kosmopolitně rozšířený druh entomopatogenní houby (14, 37, 92, 114) bez specializace na hostitele (114).

Tento široce polyfágní druh patogena, který napadá mšice, červce, třásněnky, molice a jiné houby, je však schopen přežít na saprofytický způsob života a živit se odumřelým organickým materiálem (97, 114).

L. lecanii je běžným patogenem červců v tropickém a subtropickém pásmu (14).

Spontánní epizootie způsobené tímto patogenem jsou nejčastěji zaznamenány v populacích hmyzu řádu *Homoptera*, zvláště pak v populacích různých druhů mšic, molice a červců (92).

Tyto epizootie se mohou přirozeně vyskytovat ve sklenících, přičemž zdrojem infekce je pravděpodobně zálivková voda (97).

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 *Eryophyidae*. 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 (92).

Hostitelské spektrum *L. lecanii* zahrnuje rovněž padlí travní (*Erysiphe graminis*) (114).

Vzhledem k bílému porostu mycelia vytvářejícímu lem okolo infikovaného červce a připomínajícímu svatozář je houba označována jako „white-halo fungus“. Konidie (spory) pokryté mucilagenní hmotou napadají kutikulu hmyzu. Houba infikující hmyz klíčními hyfami vyrůstajícími ze spor, které penetrují integument hmyzu, poté zničí vnitřní orgány hmyzu a způsobí jeho úhyn. Nakonec prorůstá kutikulou a sporuluje na povrchu těla hmyzu. Infikovaný hmyz vypadá jako bílý až žlutavý kousek bavlny. Nákaza propukne obvykle během 7 dnů. V závislosti na podmínkách prostředí se může doba od infekce do úhynu hmyzu značně prodloužit (14).

Nejlepšího účinku je dosaženo v rozmezí teplot 15 až 20 °C a při relativní vzdušné vlhkosti 85–90 %, která musí být zajištěna 10–12 hodin denně (14, 97).

Spory *L. lecanii* mohou být poškozeny ultrafialovým zářením. Ve sklenících může rozvod tepla redukovat účinnost houby, protože vytváří mikroklima se suchým vzduchem.

Mycelium *L. lecanii* produkuje toxin – insekticidní cyklopeptide zvaný bassianolid. Houba produkuje také další insekticidní toxiny, např. kyselinu dipikolinovou.

Vyšší infekce způsobuje rychlejší úhyn hmyzu. Virulence závisí na hustotě spor a rychlosti sporulace ovlivněné podmínkami prostředí. Virulence se liší podle způsobu produkce konidií. Méně virulentní konidie jsou získány z fermentačního média, vyšší virulence je dosaženo v tekutých nebo pevných živných půdách. Produkt na bázi konidií má trvanlivost jeden rok a slouží k přípravě postřiku. Houba ulpívá na povrchu listu nebo hmyzího hostitele. Bylo prokázáno, že kombinace entomopatogenní houby s insekticidem může zvýšit účinek, protože houba poruší integument hmyzu, což usnadní proniknutí insekticidu do těla hmyzu (14).

Suspenze spor *L. lecanii* aplikovaná na listy poinsettie infikované vajíčky a larvami 1., 2. a 3. instaru molice bavlníkové (*Bemisia tabaci*) a molice skleníkové (*Trialeurodes vaporariorum*) způsobila 89–96% mortalitu *B. tabaci* a 79–96% mortalitu *T. vaporariorum*. Vajíčka obou druhů molic vystavená nízké infekci (<1 %) a dospělci jsou vůči infekci relativně imunní. *L. lecanii* bylo úspěšně použito ve sklenicích proti *T. vaporariorum* na okurkách a proti *B. tabaci* na melounech. Některé fungicidy vykazují vůči tomuto patogenu škodlivé účinky a proto by aplikace neměla probíhat současně (24, 97).

K ochraně proti molici *Bemisia argentifolii* bylo testováno třicet pět kmenů *L. lecanii* získaných z různých hostitelů a geografických oblastí. U všech kmenů byla zkoumána jejich patogenita vůči larvám 3. instaru. Některé izoláty, které vykazovaly vysokou patogenitu vůči larvám, byly testovány také proti vajíčkům, kuklám a dospělcům *B. argentifolii*. Vajíčka byla k infekci imunní, ale mortalita vylíhlých larev dosahovala 95–98 %. Rychlost infekce líhnoucích se larev závisela na době, ve které byla vajíčka inokulována, a na virulenci kmene. Mortalita larev zaznamenaná 4. den po inokulaci kolísala od 0,5±0,3 % do 83±2,4 %, u kontroly se pohybovala mezi 2,5 a 10,2 %. Kmen s nejvyšší virulencí (LT 3,2 až 3,8 dní) byl izolován z mšic v Izraeli. Patogenita kmenů *L. lecanii* vůči kuklám 6 dní po inokulaci dosahovala 59±12,1 % až 72,5±13,1 %, zatímco přirozená mortalita dosáhla 13,5±4 %. Maximální mortalita dospělců v důsledku aplikace kmenů *L. lecanii* byla mezi 34,1±5,1 % a 52,6±3,8 % (19).

Rostliny a hmyz může kolonizovat celá řada hub, málo jich však může kolonizovat oba tyto substráty. Ačkoli právě houba *L. lecanii* je známa kolonizací některých zástupců hmyzu a hub a příležitostnou kolonizací rostlin, není znám mechanismus tříčlenné interakce. Za účelem objasnit tyto interakce byl zkoumán vztah mezi *L. lecanii*, mšičí bavlníkovou (*Aphis gossypii*) a bavlníkem. Studie ukázala, že houba kolonizuje jak mšice, tak rostliny – rostliny prostřednictvím mšic a mšice prostřednictvím rostlin. *L. lecanii* může kolonizovat *A. gossypii* kutikulou, je však nepravděpodobné, že pořízení spor vede ke kolonizaci mšic. Kolonizované mšice se mohou pohybovat z listu na list a šířit houbu. K jejich úhynu dochází většinou během 7 dnů (3).

Předmětem výzkumu byl také vliv *L. lecanii* na vývoj parazitické vosičky *Aphidius colemani* používané v biologické ochraně proti některým druhům mšic.

Vývoj *A. colemani* probíhá normálně (přibližně 90 % dospělců), pokud je jeho hostitel mšice bavlníková (*Aphis gossypii*) ošetřen konidiemi *L. lecanii* 5 nebo 7 dnů po parazitaci. Ošetření houbou jeden den před parazitací nebo do tří dnů po parazitaci redukovalo vývoj *A. colemani* od 0 do 10 %. Počet spor a myceliálních tělísek byl mnohem vyšší v mšičích ošetřených houbou do 3 dnů po parazitaci než v mšičích ošetřených po 5 nebo 7 dnech. Ukázalo se tedy, že parazitoida a houbu lze aplikovat společně tak, aby poslední aplikace houby umožnila vývoj i posledního instaru parazitoida (31).

Na vzorcích listů okurky byl studován vliv termínu aplikace mykoparazita *L. lecanii* proti plísni okurkové (*Sphaerotheca fuliginea*). Aplikace mykoparazita proběhla v různé době před a po inokulaci *S. fuliginea*. Při téměř maximální vlhkosti (95 % r. v. v.) vedlo časně provedené preventivní ošetření (9 a 5 dnů před inokulací *S. fuliginea*) a časně provedené kurativní ošetření (2 dny po inokulaci *S. fuliginea*) k značné redukci napadení listů, zatímco pozdní kurativní ošetření mělo za následek větší napadenou plochu listů. Bylo tak potvrzeno, že správně načasovaná aplikace *L. lecanii* je důležitá k zajištění ochrany (75).

Potenciál k ochraně proti mšičím a rovněž schopnost inhibovat růst a produkci spor houby *Sphaerotheca fuliginea* (padlí okurkové) vykazují kromě *L. lecanii* také další přirozeně se vyskytující druhy – ***L. attenuatum***, ***L. longisporum*** a izolát, který nemohl být přiřazen k žádnému v současné době popsanému druhu na základě sekvence rDNA (20).

Účinek tří entomopatogenních druhů rodu *Lecanicillium*: *L. longisporum*, *L. attenuatum* a neidentifikovaný izolát (DAOM 198499) proti padlí okurkovému a třem druhům mšic byl zkoumán na odebraných vzorcích listů. *L. longisporum* a *L. attenuatum* (nikoli však DAOM 198499) vykazovaly vysokou virulenci vůči mšiči broskvoňové (*Myzus persicae*), kyjatce zahradní (*Macrosiphum euphorbiae*) a kyjatce zemákové (*Aulacorthum solani*). Suspenze konidií a blastospor *Lecanicillium* spp. byla aplikována na listové terčíky o velikosti 15 mm získané z rostlin okurky před inokulací *S. fuliginea*. Pokud aplikace *Lecanicillium* spp. proběhla 1 a 8 dnů po inokulaci *S. fuliginea*, byl vývoj *S. fuliginea* inhibován. Jestliže bylo *Lecanicillium* spp. aplikováno na silně infikované terčíky listů 11 a 15 dnů po inokulaci *S. fuliginea*, aplikace potlačila pozdější produkci spor *S. fuliginea* ve srovnání s kontrolou. Tyto výsledky ukázaly potenciál dvojí role *Lecanicillium* spp. jako mikrobiálního agens k ochraně proti mšičím a plísni okurkové (30).

Biopreparáty

Již v roce 1925 Petch hodnotil *L. lecanii* jako druh využitelný k biologické ochraně proti členovcům (114).

Výsledky později prováděných výzkumů potvrdily možnost využití kmenů *Lecanicillium* spp. pro vývoj mikrobiálních přípravků účinných proti některým rostlinným chorobám, hmyzím škůdcům a fytopatogenním hádčátkům díky jejich antagonistickým a parazitickým vlastnostem a rovněž vlastnostem indukujícím rezistenci vůči chorobám (20).

Po dlouholetém výzkumu byly některé izoláty této houby vyvinuty v komerční přípravky (20, 114).

Produkty na bázi konidií mají trvanlivost jeden rok a slouží k přípravě postřiku. Houba ulpívá na povrchu listu nebo hmyzího hostitele. Ukázalo se, že kombinace entomopatogenní houby s insekticidem může zajistit vyšší účinek, protože houba poruší integument hmyzu, což usnadní proniknutí insekticidu do těla hmyzu (14).

Oproti tomu některé fungicidy vykazují vůči *L. lecanii* škodlivé účinky, a proto by aplikace neměla probíhat současně (24, 97).

V Evropě je *L. lecanii* komerčně dostupné k ochraně proti mšicím (přípravek Vertalec) a molícím (přípravek Mycotal). Oba přípravky vyrábí nizozemská firma Koppert a jsou určeny k ochraně rostlin pěstovaných ve skleníku.

Vertalec se používá k ochraně proti mšici broskvoňové (*Myzus persicae*) na chryzantémách ve Velké Británii. Jedna aplikace poskytuje ochranu na tři měsíce. Přípravek je účinný rovněž proti mšici bavlníkové (*Aphis gossypii*).

Mycotal se ve Velké Británii používá proti molícím (14) – především proti molici skleníkové *Trialeurodes vaporariorum* (27, 69) a molici bavlníkové *Bemisia tabaci* (53) na okrasných rostlinách (27), (gerberách) (14), salátových plodinách (27), okurkách a rajčatech. Postřik aplikovaný na okurky a rajčata pěstovaná ve sklenících vykazuje 90% mortalitu molice (14).

Kromě toho je účinný také proti třásněnce západní (*Frankliniella occidentalis*) (14).

Mycotal je od ledna 2004 registrován také ve Francii. Je prvním biologickým insekticidem pro používání u jahod (53).

Pro dosažení maximálního účinku vyžadují oba přípravky vysokou vlhkost v dosti dlouhém časovém období. Aby bylo možné tento požadavek splnit, doporučuje společnost Koppert míchání přípravků s adjuvancem Addit (27, 69).

Dalším přípravkem na bázi *L. lecanii* k ochraně bavlníku, zeleniny, olejnin, luštěnin, tabáku, vinné révy, okrasných rostlin, ovoce aj. proti mšicím, třásněnkám, molícím a různým druhům roztočů a hádčátek je **BioVL**. Optimálního výsledku se dosáhne pravidelnou aplikací jednou za měsíc. Stejně jako u ostatních přípravků na bázi této houby je třeba aplikaci provádět ve večerních hodinách, za vlhka. Nelze kombinovat s chemickými insekticidy. Pro zajištění účinku se doporučuje chemické insekticidy aplikovat nejdříve po 5–7 dnech od aplikace BioVL (108).

Také přípravek **Verticel** je účinný proti mšicím, třásněnkám, červcům, molícím a roztočům. Lze ho kombinovat s většinou biopesticidů a konvenčních insekticidů. Doporučuje se nekombinovat s chemickými fungicidy a aplikovat 3–5 dnů před nebo po aplikaci chemických fungicidů (100).

Další přípravky na bázi *L. lecanii* k ochraně proti mšicím, červcům, roztočům, třásněnkám a molícím: **Bioline** (výrobce Biotech International), **Bio-Catch** (výrobce T. Stanes & Company Ltd.) (80).

2.2.5 *Metarhizium* spp.

Říše: *Fungi*

Oddělení: *Eumycota*

Pomocné pododdělení: *Deuteromycotina*

Pomocná třída: *Hyphomycetes*

Řád: *Moniliales*

***Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin**

***Metarhizium flavoviridae* Gams & Rozsypal**

Oba druhy reprezentují široce polyfágní houby, které jsou převážně vázány na půdní hmyz (rovnokřídlí – *Orthoptera*, brouci – *Coleoptera* a dvoukřídlí – *Diptera*). Nákazy vyvolané metarhizií jsou označovány jako „zelené muskardiny“, protože infikovaný jedinec porůstá hustým, tmavě zeleným myceliem. Tyto houby se běžně vyskytují v půdách oblasti mírného pásma, subtropů a tropů. Podobně jako *B. bassiana* jsou běžnou složkou půd na celém území ČR, kde působí jako přirození regulátoři v populacích půdního hmyzu (37).

M. anisopliae je imperfektní entomopatogenní houba, která se nalézá v půdě po celém světě. Tato obligátně parazitická houba má velmi široký okruh hostitelů – okolo 300 druhů hmyzu. Jako biologické agens byla poprvé použita v roce 1879, v experimentálním testu Ilije Mečnikova, který ji vypěstoval na pivním mlátu a použil proti listokazu pšeničnému *Anisoplia austriaca*, později byla použita Krasilsčikem proti *Cleonus punctiventris*.

Vývojový cyklus začíná okamžikem kontaktu s kutikulou hostitele. Konidie přilnou k povrchu a začnou klíčit. Následuje přímo penetrace kutikuly nebo porůstání povrchu hostitele. Úspěšná penetrace závisí na stavu penetrační hyfy a fyziologickém stavu hostitele. Některé druhy hmyzu mají vyvinuty fyziologické mechanismy obrany proti houbovým infekcím. K tomu slouží produkce toxických látek, které inhibují klíčení spor. Mechanismy penetrace jsou jak mechanické, tak chemické. Při chemické penetraci hyfa nejprve zlyžuje v místě průniku epikutikulu (proteino-lipidová vrstva), a pak i prokutikulu (proteino-chitinová vrstva). Přitom aktivně absorbuje kutikulární komponenty a následně kolonizuje tkáň hostitele a tvoří mycelium anebo blastospory. Hostitel hyne ještě před úplnou kolonizací houbou následkem produkovaných sekundárních metabolitů – destruxinů. Když jsou zásoby těla hostitele vyčerpány, houba začne prorůstat na povrch hostitele. Zde se tvoří konidiofory a na nich v závislosti na vnějším prostředí dozrají konidie charakteristické cylindrickým tvarem a uspořádáním v paralelních řetězcích. Celý proces je zakončen mumifikací hostitele. Při porůstání povrchu hostitele může *M. anisopliae* využít ke své výživě lipidy kutikuly (9, 51, 87).

M. anisopliae je vázaná na mírné a vlhké klima. Její tepelné optimum leží mezi 20–25 °C a vyžaduje poměrně vysokou vlhkost. Může však tvořit konidie při vlhkosti nižší než 50 %. Proti vyšším teplotám je málo odolná. Škodí jí i UV záření. Proto je nejčastější u stadií hmyzu, která žijí v půdě. Je běžná u ponrav chroustů *Melolontha melolontha*, *M. hipocastanei*, housenek mūr *Autographa gamma*, *Agrotis segetum* atd. Laboratorní studie prokázala, že napadá také necilové organismy, např. *Orius insidiosus*.

V biologické ochraně se využívají spory i mycelium. Formulují se do granulí nebo prášku. Při větších objemech se houba vyrábí v submerzních kulturách a následně je formulována jako prášek. Pro menší produkci postačuje kultivace na sterilní rýži v plastických pytlích. Široce se využívá k ochraně proti termitům *Reticulitermes* spp. K infekci zde dochází přímým kontaktem s použitým přípravkem a následným šířením houby z napadených jedinců do zdravé části kolonie. V laboratorních podmínkách docházelo k usmrcení jedinců do 4 až 10 dnů od napadení (87).

Možnosti využití *M. anisopliae* v biologické ochraně brambor proti drátovcům (larvy kovařikovitých brouků – *Elateridae*) zkoumali vědci z Vysoké školy zemědělské v Zollikofenu ve Švýcarsku. Vzhledem k tomu, chemická ochrana proti drátovcům je problematická (přípravky mají široký účinek a mohou působit i na užitečné organismy), je biologická ochrana založená na parazitaci této půdní houby považována za vhodnou alternativu.

Výzkum probíhal v rámci projektu „Zajištění kvality při pěstování brambor“ na třiceti pozemcích. Vzorky půdy byly odebrány z hloubky 5–15 cm. Na základě údajů (pěstitelské systémy; vlastnosti půdy – obsah humusu, struktura a hodnota pH; napadení drátovci) bylo zjišťováno, které faktory ovlivňují výskyt této houby v půdě. Ukázalo se, že *M. anisopliae* je ve zkoumaných zemědělských půdách hojně rozšířeno. Nebyl prokázán ani vliv půdních vlastností, ani osevního postupu nebo aplikace fungicidů či insekticidních mořidel a granulátů na výskyt této houby. V následných polních pokusech byl výzkum zaměřen na ověření parazitického účinku houby na drátovce v praxi a na podmínky při aplikaci (9, 51).

V projektu financovaném Komisí pro technologii a inovaci (KTI) a zahájeném v dubnu 2005 zkoumá skupina švýcarských vědců ze tří výzkumných ústavů možnosti biologické ochrany proti bázlivci kukuřičnému (*Diabrotica virgifera virgifera*). Výzkum je zaměřen především na potenciál entomopatogenních hlístic a hub. Předmětem výzkumu je rovněž kompatibilita těchto skupin antagonistických organismů s transgenní Bt-kukuřicí. Studie probíhá ve Švýcarsku v uzavřeném systému a je doplněna výsledky polních pokusů ze zahraničí. V rámci projektu jsou rovněž porovnávány analýzy rizik ochranných strategií.



Obr. 4. Drátovec napadený *Metarhizium anisopliae*

Byly identifikovány, kultivovány a aplikovány nejvíce patogenní izoláty hub. Ukázalo se, že houba *Metarhizium anisopliae*, která se v půdě hojně vyskytuje, přirozenou cestou napadá larvy i dospělé. V laboratorních testech byly vybrány nejlepší izoláty a testovány v polních podmínkách. Pozornost byla zaměřena na optimalizaci formulace, aplikační techniky a termín aplikace. Další výzkum by podle vědců měl být zaměřen na vývoj molekulární metody, která by napomohla perzistenci této houby v půdě, a na testování vlivu této houby na necílové organismy (5).

Na monitoring výskytu entomopatogenních hub a hodnocení možností jejich využití v biologické ochraně proti blýskáčku řepkovému (*Meligethes aeneus*) byly zaměřeny další pokusy ve Švýcarsku v letech 2004 a 2005. Na základě odchytu dospělců provedeném po přezimování při náletu na řepková pole bylo zjištěno, že téměř 2 % byla infikována entomopatogenními houbami. Z těchto hub byly zaznamenány pouze druhy rodu *Beauveria*. Překvapivé je, že nebyl zjištěn výskyt houby *Metarhizium anisopliae*. Tento druh se v literatuře uvádí jako patogen blýskáčka řepkového a je považován za kandidáta na ochranu proti tomuto škůdci. Je také nejčastější entomopatogenní půdní houbou ve Švýcarsku. Nebyl však nalezen ani na jedincích, kteří se vyvíjeli na řepkových polích. Tato zjištění dokazují, že *M. anisopliae* blýskáčka nenapadá, a pokud ano, tak jen vzácně (52).

Houba *Metarhizium anisopliae* (zelená muskardina) působí účinně také proti lesním škůdcům – v půdách školek se používá proti larvám brouků. Pro obratlovce jsou muskardiny neškodné (26).

Entomopatogenní houby jsou rovněž efektivními antagonisty lýkožroutů, kteří patří k nejvýznamnějším škůdcům lesních dřevin (zejména jehličnatých). Na základě uspokojivých laboratorních testů s houbami *Beauveria bassiana* a *Metarhizium anisopliae* byla ze tří německých výzkumných ústavů sestavena pracovní skupina vědců, která prováděla několik let praktické testy proti lýkožroutu smrkovému (*Ips typographus*). Tyto pokusy však žádné slibné výsledky nepřinesly.

Nová strategie spočívající v kombinaci komerčních feromonových lapáků s *B. bassiana* k infikování populace lýkožrouta byla zatím testována pouze v laboratorních podmínkách a v malé míře také v praktických pokusech (95).

Biopreparáty

Biopreparáty na bázi metarhizií jsou velkoplošně aplikovány zejména v zemích Jižní Ameriky (Brazílie, Argentina, Kolumbie) (37).

2.2.6 *Nomuraea* spp.

Říše: *Fungi*

Oddělení: *Eumycota*

Pomocné pododdělení: *Deuteromycotina*

Pomocná třída: *Hyphomycetes*

Řád: *Moniliales*

Rod *Nomuraea* zahrnuje poměrně úzce specializované patogeny, kteří jsou vývojem vázáni převážně na housenky motýlů (111).

Nomuraea rileyi (Farlow) Samson

Nejvýznamnějším zástupcem je *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson – patogen celé řady hospodářsky významných škůdců z říše motýlů (*Lepidoptera*), ale i některých brouků (*Coleoptera*) (22, 63, 101).

Infekce a vývoj *N. rileyi* byl zaznamenán např. u těchto druhů: kovolesklec *Chrysodeixis acuta* (22), kovolesklec cizokrajný (*Trichoplusia ni*), *Plathypena scabra*, *Pseudoplusia includens*, blýskavka *Spodoptera litura* (63), *S. exigua* (16), *S. depravata* (23), *Anticarsia gemmatalis* (62, 63), bourec morušový (*Bombyx mori*) (35, 63), šedavka kukuřičná (*Heliothis zea*, syn. *Helicoverpa zea*) (63, 84), *H. virescens* (84), černopáska bavlníková (*Helicoverpa armigera*) (16, 67, 68), záředník polní (*Plutella xylostella*) (16), *Lerodea eufala*, *Nymphula depunctalis* (101).

Infikovaní hostitelé jsou pokryti hustým bílým myceliem, které po vytvoření konidií získává světle zelenou barvu (35, 63, 84, 101).

Průběh infekce byl popsán na housenkách můry šedavky kukuřičné (*Heliothis zea*, syn. *Helicoverpa zea*).

Konidie *N. rileyi* klíčí 2 dny po ošetření sedmidenních housenek při teplotě 25 °C a vysoké vlhkosti. Klíční vlákna pronikají do epikutikuly. O den později byla prokázána přímá penetrace kutikuly. Bylo zjištěno, že vstupní otvory jsou tmavší, nasvědčující lýzi, pravděpodobně způsobené enzymatickou aktivitou. Lýze byla pozorována v epikutikule a exokutikule, ale ne v endokutikule. Čtvrtý den laterálně větvené hyfy penetrují endokutikulu. Tyto hyfy rostou rovnoběžně s endokutikulárními lamelami. Penetrace do hemocelu (tělní dutiny) byla pozorována šestý den po aplikaci konidií. Hyfová tělíska vzniká pučením hyf a jejich odškrcováním jsou krátká, silná, většinou 1-, 2- nebo 3buněčná vlákna se zřetelným jádrem. Jako první jsou napadány krevní buňky, posléze i tukové těleso, Malpighio trubice, svaly a mesenteron. Po úhynu hostitele prorůstají hyfy na povrch. Enzymatické testy *in vitro* ukázaly, že *N. rileyi* produkuje chitinázy, proteázy a lipázy.

Testy prováděné v Mississippi potvrdily, že *N. rileyi* je častým patogenem housenek *Heliothis/Helicoverpa* spp. Bylo prokázáno, že housenky třetího až pátého instaru jsou citlivější k infekci než housenky prvního a druhého instaru. Nejvýraznějšího účinku je dosaženo při teplotě 20 a 25 °C, kdy mortalita dosahuje 80 a 71 % (84).

Podobným způsobem probíhá infekce housenek blýskavky *Spodoptera litura*.

Sporová suspenze *N. rileyi* byla aplikována na housenky. Bylo zjištěno, že klíční vlákna penetrují kutikulu 48 hodin po inokulaci. Lýze endokutikuly nastává ještě před penetrací a invazí hyf do epidermis přibližně 2,5 dnů po inokulaci. Fáze invaze hyf poté přechází ve fázi tvorby hyfových tělísek v hemocelu. Tato neinvazivní hyfová tělíska postupně vyplňují hemocel a 5 až 6 dnů po inokulaci se mění v invazivní mycelium. Na konci infekčního cyklu mycelium prorůstá kutikulou a produkuje konidiofory (přibližně 7 dnů po inokulaci). Larvy jsou zcela pokryté bílým myceliem, jehož barva se za 1 až 2 dny v důsledku produkce spor mění v zelenou. Kompletní vývojový cyklus *N. rileyi* na *S. litura* trvá přibližně 8 až 9 dní (63).

Patogenita *N. rileyi* byla testována také proti druhu *Spodoptera depravata*. Kmen SdNr-1 vykazoval nejvyšší mortalitu housenek *S. depravata* srovnatelnou s jinými entomopatogenními houbami, jako např. *Beauveria bassiana*. *N. rileyi* byla patogenní v rozmezí teplot 15 až 25 °C, při 15 °C však infekce probíhala pomaleji. V nádobových pokusech byla *N. rileyi* patogenní i při nízkých aplikačních dávkách (23).

Na housenkách bource morušového klíčí zralé konidie *N. rileyi* během 24 hodin a penetrují kutikulu do 36 hodin po inokulaci při teplotě 23–25 °C a relativní vlhkosti 75–85 %. Housenky podléhají infekci 6–7 dní po ošetření; 7. až 8. den dochází k jejich mumifikaci. Vzniká velký počet konidioforů, které vytvářejí souvislý bílý houbový porost na celém povrchu hostitele do 9–10 dnů. Vyrývají se světle zelené konidie, které dodávají tělu housenky zelenou barvu. Životní cyklus houby *N. rileyi* na bourci morušovém je dokončen po 10–11 dnech (35).

Vliv environmentálních faktorů na infekci *N. rileyi* izolované z černopásy bavlníkové byl studován v laboratorních podmínkách. Aplikace suspenze konidií o koncentraci 5×10^6 konidií/ml způsobila vyšší mortalitu housenek 4. instaru při 20 °C než při 30 °C. Vývoj houby v inokulovaných larvách probíhal optimálně při 20 až 25 °C. Také rychlost klíčení byla vyšší při teplotě 20 a 25 °C než při 30 nebo 35 °C. Sporulace při 100% relativní vlhkosti proběhla o 2 dny dříve než při 95% vlhkosti. Ačkoliv fotoperioda neovlivňuje mortalitu housenek 5. instaru způsobenou *N. rileyi*, LT_{50} (střední smrtná doba) byla kratší při inkubaci na světle než ve tmě. Inkubace infikovaných mrtvých housenek 12 nebo 24 h na světle vedla k 20krát vyšší produkci konidií než ve tmě. Potvrdilo se tak, že osvětlení je nezbytné pro vývoj tohoto izolátu na uhynulém hmyzu (67).

V polních podmínkách bylo 90,5% až 100% mortality housenek 4. instaru černopásy bavlníkové dosaženo při aplikaci 10^7 konidií/ml na kukuřici, listy sóji, rajčata a chryzantémy. Střední smrtná doba byla při této koncentraci 5,9–6,7 dní.

Housenky v 5. instaru vykazovaly 94,6% mortalitu v půdě s 20% obsahem vody a 41,7% mortalitu v půdě s 10% obsahem vody, pokud byla na povrch půdy aplikována suspenze konidií o koncentraci 10^8 konidií/ml (68).

Bylo prokázáno, že housenky černopásy bavlníkové 3. až 5. instaru jsou citlivější k infekci než housenky 1. a 2. instaru. Nejvýraznějšího účinku je dosaženo při teplotě 20 a 25 °C, kdy mortalita dosahuje 80 a 71 %.

N. rileyi je citlivá vůči syntetickým insekticidům a fungicidům. Synergismus mezi *N. rileyi* a syntetickými insekticidy byl zjištěn v krátkém období vývoje housenek blýskavky *Spodoptera depravata* (23).

Pět fungicidů, osm insekticidů a devět herbicidů, které se běžně používají do kukuřice, bylo testováno z hlediska inhibice klíčení konidií *N. rileyi*. Pouze dva fungicidy (maneab a propineb) vykazovaly vysoce inhibiční účinky, zatímco insekticidy a herbicidy neměly na tuto houbu negativní vliv (68).

Aplikace fungicidů k ochraně proti *Microsphaera diffusa* měla za následek redukcí přirozeného inokula *N. rileyi* v populaci *Anticarsia gemmatalis*. Fungicidy vykazovaly škodlivé účinky na užitečné houby, redukcí infekce, zpoždění epizootie a zvýšení hustoty populace hostitele. V laboratorních pokusech ovlivnily benomyl, difenoconazol, síra a carbendazim klíčení konidií *N. rileyi*. Byl hodnocen vliv fungicidů (benomyl, difenoconazol) používaných k ochraně proti *M. diffusa* na *N. rileyi*. Počet housenek *A. gemmatalis* byl ve variantě s fungicidním ošetřením výrazně vyšší než v kontrolní variantě. Populace *A. gemmatalis* se 7 až 12 dní po první aplikaci zvýšila a zůstala na stejné úrovni až do 19. dne po druhé aplikaci. Bylo prokázáno, že fungicidní ošetření zpožďuje nástup epizootie *N. rileyi* o 2 až 14 dnů (62).

Byl však zaznamenán i synergistický efekt dvou entomopatogenních mikroorganismů – houby *N. rileyi* a bakterie *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*.

Houba *N. rileyi* byla izolována z uhynulých housenek blýskavky červivcové (*Spodoptera exigua*) na polích s chřestem poté, co byly porosty ošetřeny bakterií *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. Na základě prvních pozorování a v souladu s dřívějšími výsledky pokusů se ukázalo, že houba infikuje oslabené housenky motýlů jako sekundární patogen po ošetření *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*. Výzkumy proto byly zaměřeny na vývoj biopesticidu na bázi této houby s cílem užití v kombinaci s *B. thuringiensis* v ochraně proti housenkám motýlů. Výzkumné práce byly zaměřeny na získání dalších izolátů zhruba 10 biotypů *N. rileyi* a studium jejich vlastností. Biologickými testy bylo zkoumáno hostitelské spektrum a následně toxicita *N. rileyi* vůči záplavníku polnímu (*Plutella xylostella*), blýskavce červivcové (*Spodoptera exigua*) a černopásce bavlníkové (*Helicoverpa armigera*). Byla zjišťována také LC_{50} (letální koncentrace) *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* na těchto housenkách. Synergistický efekt *N. rileyi* a *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* byl zkoumán použitím různých subletálních dávek obou entomopatogenních organismů. Mechanismus účinku vybraných biotypů *N. rileyi* bude teprve objasněn, stejně jako akutní toxicita, subakutní toxicita a test dráždivosti na myších, potkanech a králících (16).

N. rileyi může v populacích hmyzu vyvolávat epizootie. Například epizootie v populacích můry šedavky *Heliothis* spp. byly zaznamenány v některých oblastech v Mississippi a byly obvykle spojeny s vlhkými, chladnými podmínkami prostředí a vysokou hustotou populace hostitele, často během podzimního období (84).



Obr. 5. Housenka *Heliothis virescens* pokrytá konidiofory a konidii *Nomuraea rileyi*.

Biopreparáty

Hostitelská specifická tato houba a její přátelskost k životnímu prostředí je významným předpokladem užití v managementu ochrany proti hmyzím škůdcům (63).

V USA byl na bázi *N. rileyi* vyvinut biopreparát, který prochází registračním procesem a je určen pro ochranu kukuřice (zavíječ kukuřičný), brukvovité zeleniny (bělásek zelný, mūra zelná a další), lesních dřevin (bekyně) a pro ochranu řady dalších hostitelských rostlin (111).

2.2.7 *Paecilomyces* spp.

Říše: *Fungi*

Oddělení: *Eumycota*

Pomocné pododdělení: *Deuteromycotina*

Pomocná třída: *Hyphomycetes*

Řád: *Moniliales*

Rod *Paecilomyces* reprezentují široce polyfágní entomofágní, akarifágní a nematofágní druhy hub, které iniciují nákazy na zástupcích z mnoha řádů hmyzu (*Orthoptera*, *Thysanoptera*, *Homoptera*, *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Diptera*), fytofágních roztočích (např. sviluškovití – *Tetranychidae*) a některých druzích háďátek (cystotvorná háďátka z rodů *Globodera*, *Heterodera*).



K nejvýznamnějším zástupcům rodu *Paecilomyces* patří široce polyfágní *P. fumosoroseus*, dále *P. lilacinus* a *P. farinosus* (37, 93).

Obr. 6 *Paecilomyces* spp.

***Paecilomyces farinosus* (Holmsk.) A.H.S. Br. & G. Sm.**

P. farinosus je všudypřítomný hmyzí patogen, hojně rozšířený po celém světě (88, 103).

Je široce polyfágní a byl pozorován na larvách a kuklách motýlů (*Lepidoptera*) a na dalších zástupcích hmyzu z řádů *Diptera*, *Homoptera*, *Coleoptera*, *Hymenoptera* a *Arachnida* (88).

P. farinosus je také často izolován z lesní půdy (88, 103).

Na hmyzím hostiteli houba vytváří bílou myceliální plst', ze které vyrůstají v husté vrstvě početné konidiofory. Ze všech částí těla hostitele vyrůstá obvykle několik bílých až žlutých synnemat (coremií – konidiomat složených z více či méně kompaktních skupin vzpřímených a někdy spojených konidioforů) (88).

Druh byl testován především k ochraně proti škůdcům bavlníku, jako je např. blýskavka červivcová (*Spodoptera exigua*) (34).

Vývoj této entomopatogenní houby na larvách blýskavky červivcové *in vivo* byl zkoumán pod světelným a elektronovým mikroskopem. Blastosporý injikované do hemocelu larev (500 blastospor/larva) byly okamžitě pohlceny fagocytujícími hemocyty. V hemolymfě nebyly do 36 hodin po inokulaci zaznamenány žádné houbové buňky. Blastosporý produkované *in vivo* nejsou na rozdíl od blastospor *in vitro* opatřeny povrchovou vrstvou tvořenou galaktomanany, která je zapotřebí k navázání humorálních lektinů *S. exigua*. Tyto buňky *in vivo* nebyly rozpoznány fagocytujícími granulocyty a volně cirkulovaly v hemolymfě. Hyfy vyrůstající z blastospor byly rozpoznány hemocyty a vyvolaly tvorbu vícebuněčných shluků hemocytů. Po 72 hodinách od inokulace bylo pozorováno vystupování mycelia ze shluků a po 96 hodinách byly larvy mumifikovány v důsledku rozrůstání houby v tkáních hostitele. Ani fagocytóza původně injikovaných *in vitro* produkovaných blastospor ani tvorba shluků hemocytů v blízkosti hyfových buněk během infekčního procesu nezastavila růst houby. Vývoj *P. farinosus in vivo* byl podobný jako u houby *Beauveria bassiana*, kromě toho, že v pozdější fázi byla tvorba shluků hemocytů inhibována produkcí houbových metabolitů (49).

P. farinosus byl ojedinele zaznamenán v asociaci s lýkožroutem *Ips typographus* (38) a byl také úspěšně testován (jakož i *P. fumosoroseus*) v půdách škoků proti pilatkám a ploskohřbetkám. Širší aplikace *Paecilomyces* proti lesním škůdcům se v současnosti připravuje (26).

Bylo zjištěno, že *P. farinosus* také potlačuje kolonie padlí na oddělených listech rostlin.

V John Innes Centre (Norwich, Velká Británie) byly od roku 2001 některé izoláty padlí travního (*Blumeria graminis*) uchovávané na oddělených listech spontánně infikovány neznámou vláknitou houbou, jejíž mycelium rychle přerůstalo kolonie padlí a vykazovalo inhibiční účinky. Celkem bylo získáno pět izolátů, které byly na základě morfologických charakteristik

a sekvence rDNA určeny jako *P. farinosus*. Tyto izoláty byly jako potenciální činitelé biologické ochrany proti padlí dále zkoumány – byly studovány interakce s následujícími čtyřmi druhy padlí: *B. graminis* f. sp. *hordei* na ječmeni, *Oidium neolycopersici* na rajčeti, *Golovinomyces orontii* na tabáku a *Podosphaera fusca* na okurce. Kolonie těchto čtyř druhů padlí byly sice rychle inhibovány houbou *P. farinosus* na listech, ale žádná konidiální suspenze ani kultivační filtrát izolátů *P. farinosus* nepotlačil šíření infekce padlí na napadených rostlinách ječmene, rajčete, tabáku a okurky ve skleníku. Ukázalo se tak, že ačkoli houba *P. farinosus* na oddělených listech vykazuje inhibiční účinky na kolonie padlí, v praxi ji nelze vzhledem k nedostatečnému účinku aplikovat (65).

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

P. fumosoroseus (PFR) je kosmopolitní široce polyfágní houbový patogen (89, 93, 106).

Tento druh byl izolován také z různých půd (103, 106).

Většina záznamů týkajících se izolace této houby z různých druhů hmyzích hostitelů (v přirozených podmínkách) uvádí mezi nejčastějšími hostiteli různé zástupce z řádů *Lepidoptera*, *Diptera* a *Coleoptera* (89, 93).

Poprvé byl *P. fumosoroseus* zjištěn jako patogen přirozeně se vyskytující v populacích molice až v roce 1983, kdy se v populacích molice *Trialeurodes vaporariorum* ve sklenicích v oblasti Pekingu objevily velmi silné spontánní epizootie, které dočasně zcela decimovaly populace tohoto škůdce. Tento kmen byl odizolován a jako vysoce virulentní vůči molici skleníkové byl označen jako subspecies trinominálním označením *beijingensis*, tedy jako *P. fumosoroseus* var. *beijingensis*.

Druhým případem přirozené epizootie způsobené *P. fumosoroseus* v populacích molice je periodický výskyt PFR v populacích molice bavlníkové (*Bemisia tabaci*) na různých hostitelských rostlinách/lokality na Floridě. Odizolovaný kmen byl označen jako PFR 97 – kmen Apopka (Apopka – jméno oblasti na Floridě, kde byl kmen PFR 97 v roce 1987 poprvé zachycen a odizolován Dr. Lance S. Osbornem). Kmen PFR 97 způsobil rozsáhlé epizootie v populacích molice bavlníkové jak v sklenicích, tak i na polních kulturách (89).

Další pokusy s touto houbou prokázaly široce polyfágní základ a vysokou virulenci i vůči mšicím, třásněnkám, larvám některých druhů motýlů, larvám a kuklám vrtalek a dokonce i vynikající účinnost vůči svilušce chmelové. *P. fumosoroseus* je schopen vyvolávat i nákazu vajíček molice a svilušek (89, 93).

Houba *P. fumosoroseus* je tedy schopna infikovat široký hostitelský okruh a byla zjištěna na více než 40 druzích hmyzu (93) z více než 25 různých čeledí (99).

Uvádí se, že *P. fumosoroseus* je jedním z nejběžnějších druhů hub napadajících larvy a dospělé molice rodu *Bemisia* v polních a skleníkových podmínkách a *Trialeurodes vaporariorum* ve sklenicích (21).

Hostitelský okruh zahrnuje také molici *Bemisia argentifolii*, zápledňička polního (*Plutella xylostella*) nebo mšici zhoubnou (*Diuraphis noxia*) (99).

P. fumosoroseus vykazuje nejen statut entomopatogenní a akarifágní houby, ale za určitých okolností vykazuje i statut mykoparazita. Patogen se jako ektoparazit může vyvíjet na rzích a na různých druzích padlí, např. na konidiích padlí okurkového (37, 93).

V několika případech byl prokázán i stimulující vliv na vývoj hostitelské rostliny (93).

Na přirozeném hostiteli i na umělých živných půdách vytváří *P. fumosoroseus* zprvu bílé vatovité kultury (89, 93, 106), které později mění barvu do odstínů narůžovělé, nařezané až šedofialové barvy. Změna barvy kolonií přímo koreluje se stupněm sporulace kultury. Starší, plně sporulující kultury mají až šedofialové zbarvení a vatovitý charakter kolonie se mění v prašný, s povrchem zcela pokrytým obrovským množstvím konidií (89, 93).



Obr. 7 *Paecilomyces fumosoroseus* vytváří vatovité, bílé mycelium s růžovými sporami

P. fumosoroseus je vzhledem k širokému hostitelskému okruhu považován za nadějnýho činitele biologické ochrany (99).

V současné době je účinným bioagens proti molici skleníkové (*Trialeurodes vaporariorum*) a je kompatibilní s jinými přirozenými nepřáteli (4).

Podobně jako u jiných entomopatogenních hub se infekce uskutečňuje přichycením spor na kutikulu hmyzu, dochází ke klíčení a následné penetraci. Po rozmnožení v těle hmyzu a usmrcení houbou prorůstá *P. fumosoroseus* při vhodné vlhkosti opět na povrch hostitele.

Optimální teplota pro regulaci molice skleníkové (*Trialeurodes vaporariorum*) se pohybuje mezi 20 a 28 °C, vzdušná vlhkost by měla minimálně 12 hodin přesahovat 80 % (106).

Také další pokusy byly zaměřeny na testování patogenity *P. fumosoroseus* (9 izolátů) a *P. lilacinus* (1 izolát) vůči tomuto škůdci. Larvy 2. instaru molice skleníkové byly ošetřeny sporovou suspenzí připravenou z každého izolátu. Mortalita byla zaznamenána 3 až 6 dnů po aplikaci. Účinnost izolátů přímo korelovala s délkou inkubace. Některé izoláty vyvolaly po 6 dnech od inokulace 70% mortalitu larev. Vývoj infekce byl monitorován na uměle infikovaných larvách v 12hodinových intervalech.

Uhynulý hmyz byl pokryt hustým myceliem nebo se jeho barva změnila z průhledně nazelenalé v mléčně bílou nebo světle žlutou.

Konidie *P. fumosoroseus* vytvářejí na povrchu larev molic 2. instaru apresoria. Zvýšená tvorba apresorií byla zaznamenána v oblasti intersegmentálních membrán, které umožňují vzájemnou pohyblivost článků (21).

Houba *P. fumosoroseus* může také infikovat a likvidovat škůdce okurek – mandelinku *Acalymma vittata*. V rámci laboratorních pokusů byli brouci inokulováni houbovou suspenzí. Ukázalo se, že blastospory klíčí a infikují hmyz během 24 hodin po kontaktu a po 72 hodinách dochází za vysoké relativní vlhkosti ke sporulaci na uhynulém těle hmyzu.

Mortalita dosáhla 100 % ve srovnání s nulovou mortalitou u kontrolní varianty.

Dospělci mandelinky *Acalymma vittata* se během jara a léta živí na zlatobýlu jako sekundárním rostlinným hostiteli a pak migrují na výsadby okurek na poli. Proto pokud by populace brouků živících se zlatobýlem byla snížena infekcí této houby před migrací na okurková pole, omezil by se výskyt bakteriového vadnutí rostlin a zvýšily by se výnosy.

Navíc, tato houba je zcela neškodná pro necilové užitečné členovce (4).

V laboratorních podmínkách byla houba *P. fumosoroseus* a některé další druhy entomopatogenních hub testována proti různým vývojovým stadiím vrtule třešňové (*Rhagoletis cerasi*), která je nejvýznamnějším škůdcem třešně v Evropě. Ukázalo se, že napadeni byli pouze dospělci. Nejlepší účinek vykázaly houby *Beauveria bassiana* a *Paecilomyces fumosoroseus*. Obě tyto houby, na jejichž bázi již existují komerční přípravky, byly v roce 2006 úspěšně aplikovány proti dospělcům vrtule třešňové ve dvou polních pokusech (15).

***Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson**

P. lilacinus je typická půdní houba, často izolovaná také z hmyzu (21, 103).

Byla nalezena i na různých organických substrátech, např. na kontaktních čočkách, syntetické gumě a polyuretanu, a je používána v testování rezistence hub. *P. lilacinus* patří také mezi patogeny člověka a zvířat (103).

Běžně se vyskytuje v tropech a subtropích (21).

Na hmyzu houba produkuje řídkou myceliární plst', ze které jednotlivě vyrůstají konidiofory tvořící fialovou vrstvu. Na hmyzu se také mohou tvořit zřetelná volná synnemata (90).

Tento druh je však známý především nematofágními účinky (21, 46, 99).

Poprvé byl izolován z vajíček háďátka *Meloidogyne* spp., později také z vajíček *Globodera rostochiensis*, *Heterodera glycines* aj. (98).

Studie zaměřené na biologickou ochranu rostlin proti škůdcům v posledních letech dokazují, že rod *Paecilomyces* je jedním z nejvýznamnějších z hlediska tohoto způsobu ochrany a *P. lilacinus* je druh, který chrání kořenový systém rostlin proti napadení fytoparazitickými háďátky (25, 104), zejména proti *Meloidogyne* spp., *Globodera pallida*, *G. rostochiensis*, *Heterodera* spp., *Tylenchulus semipenetrans*, *Radopholus similis* a *Rotylenchulus reniformis*.

Kolonizuje povrch kořenů rostlin a je antagonistickou houbou parazitující vajíčka a samičky háďátek (104).

Po ošetření rostlin *P. lilacinus* kmene Bioact251 nebyly houbové hyfy objeveny v kořenech rostlin, ačkoli kolonie porůstaly povrch kořenů. Výzkumy chování hyf na kořenech a povrchu vajíček háďátek byly porovnány a shledány jako velmi odlišné. Parazitace byla zaznamenána na vajíčcích háďátek, nikoliv však na povrchu kořenů (25).

Bylo prokázáno, že parazitace houby může vést ke zničení až 90 % vajíček a 75–80 % cyst (104).

Účinnost *P. lilacinus* kmene 251 (PL251) v ochraně banánovníku proti *Radopholus similis* – endoparazitickému háďátku, které napadá kořenový systém rostlin, byla hodnocena ve skleníkových pokusech. Cílem bylo stanovit optimální dávku a způsob aplikace tohoto bioagens. Ukázalo se, že nejvyšší účinnosti bylo dosaženo aplikací do půdy současně s inokulem obsahujícím háďátka šest dní před přesazením mladých rostlin. Dalšího zvýšení účinku bylo dosaženo kombinací aplikace do půdy a k mladým rostlinám. Opakovaná aplikace vedla k zvýšení účinnosti o 50 až 80 %. Výsledky ukázaly, že *P. lilacinus* je vynikajícím kandidátem proti fytopatogenním háďátkům na banánovníku (46).

Také pokusy prováděné z hlediska využití v biologické ochraně rostlin proti *Meloidogyne incognita* na rajčatech a bramborách byly úspěšné (98).

Moderní zemědělská praxe často vyžaduje k redukci škůdců a mikrobiálních patogenů aplikaci několika typů činitelů biologické ochrany. Tento způsob ochrany však musí být kompatibilní a integrovatelný do všech produkčních systémů. Ve studii prováděné v Německu byla zkoumána kompatibilita *P. lilacinus* kmene 251 s třemi druhy entomopatogenních hlístic: *Steinernema feltiae*, *Heterorhabditis bacteriophora* a *H. megidis*. Přežívání těchto entomopatogenních druhů hlístic v půdě ošetřené houbou *P. lilacinus* bylo hodnoceno po 1, 7 a 14 dnech. Byl rovněž zkoumán vliv *P. lilacinus* na účinnost těchto entomopatogenních druhů proti zavíječi voskovému (*Galleria mellonella*). Po 24 hodinách od ošetření kultivačním filtrátem *P. lilacinus* nebyl zaznamenán negativní účinek na aktivitu entomopatogenních hlístic. Dále bylo zjištěno, že přežívání a virulence těchto entomopatogenních druhů hlístic nebyla ovlivněna přítomností *P. lilacinus*. Studie tak prokázala, že *P. lilacinus* kmen 251 a testované entomopatogenní hlístice jsou kompatibilními články integrovaného managementu ochrany proti škůdcům (47).

Biopreparáty

Druh *P. fumosoroseus* je již využíván v praktické ochraně rostlin. Americká firma ThermoTrilogy Corporation vyrábí a distribuuje biopreparát PFR 97 WDG - Apopka, který je pod obchodním názvem **PREFERAL** distribuován také belgickou firmou BIOBEST v Evropě. Tento preparát je používán v ochraně rychlené zeleniny a okrasných květin proti širokému sortimentu škůdců (mšice, molice, červci, třásněnky a další) (37).

Přípravek je vysoce ceněn při regulaci molice, protože se zaměřuje na všechna stadia životního cyklu. Je velmi účinný u skleníkových plodin, vyžaduje však obzvláště pečlivé zajištění podmínek prostředí, zejména teploty a vzdušné vlhkosti v prvních 12 hodinách následujících po aplikaci (27, 69).

V ČR je pokusně používán v ochraně jehličnanů proti kůrovcům z rodu *Ips* (např. *I. typographus*) a v ochraně brambor proti mandelince bramborové (37).

BioAct WG je biologický přípravek k ochraně proti háďátkům vyvinutý společností PROPHYTA GmbH. Různé polní pokusy prokázaly účinnost proti těmto fytoparazitickým háďátkům: *Meloidogyne* spp. (kořenová háčkovitá háďátka), *Heterodera* spp.,

Globodera spp. (cystotvorná háčkovitá), *Pratylenchulus* spp. (107).

Účinnou složkou biopreparátu BioAct WG jsou konidie *P. lilacinus*. BioAct WG byl v roce 2005 uveden na trh v USA a je vhodnou alternativou chemických přípravků k ochraně proti háčkovitým. Pokusy stále ještě probíhají na rajčatech, okurkách a paprikách, golfových trávnících, podzemnici olejné a ananasech. Nevýhodou jsou vysoké nároky houby *P. lilacinus* na půdní teplotu.

Výsledky pokusů, v nichž byl nematocid aplikován kapkovou závlahou, jednoznačně potvrdily účinnost přípravku, která byla srovnatelná s účinností chemických přípravků. Aplikace BioAct WG vedla ke zvýšení výnosů až o 56 %. Pokusy prováděné v Mexiku ukázaly, že došlo k redukci symptomů způsobených háčkovitým *Nacobbus aberrans* o 89 %. Počet háčkovitých na kilogram půdy se 80 dnů po aplikaci snížil ve srovnání s neošetřenou kontrolou o 92 %. Pozitivních výsledků bylo v polních pokusech dosaženo také proti *Meloidogyne* spp., *Heterodera* spp., *Globodera* spp. a *Pratylenchulus* spp. (41)

2.2.8 *Tolypocladium* spp.

Říše: *Fungi*

Oddělení: *Eumycota*

Pomocné pododdělení: *Deuteromycotina*

Pomocná třída: *Hyphomycetes*

Řád: *Moniliales*

Rod *Tolypocladium* zahrnuje převážně saprofytické, půdní houby (82).

Některé druhy jsou patogeny hmyzu a hlístic (79).

Identifikace a izolace entomopatogenních druhů začala probíhat, ve srovnání s jinými entomopatogenními houbami, relativně nedávno. Menší počet entomopatogenních druhů rodu *Tolypocladium* může být způsoben omezeným hostitelským okruhem ve srovnání s jinými entomopatogenními rody třídy *Hyphomycetes* (např. r. *Metarhizium*) nebo chybnou determinací. Houby rodu *Tolypocladium* mají velmi podobnou morfologickou stavbu jako houby rodu *Beauveria* a lze je tedy snadno zaměnit – *T. cylindrosporum* je podobné *Beauveria brongniartii*, *T. niveum* (syn. *T. inflatum*) připomíná *B. bassiana*. Zástupci rodu *Tolypocladium* však na rozdíl od rodu *Beauveria* tvoří konidie na fialidách. Myceliální růst je srovnatelný, oba rody vytvářejí kompaktní, hyalinní mycelium. Konidie rodu *Tolypocladium* jsou spojeny slizovitou hmotou, zatímco konidie rodu *Beauveria* jsou suché (82).

Pro některé druhy rodu *Tolypocladium* je charakteristická produkce efrageptinů – účinných inhibitorů mitochondriální prokaryotické ATPázy, které vykazují antifungální a insekticidní aktivitu (32, 82).

Jsou známy také antibakteriální účinky efrageptinů. Například bakterie *Micrococcus luteus* je považována za vynikající indikátor přítomnosti efrageptinů, protože je obzvláště citlivá k těmto látkám.

Množství efrageptinů produkované *in vivo* je většinou příliš nízké, aby způsobilo uhynutí hmyzu. Tato insekticidní schopnost však působí v souladu s jinými patogenními činiteli (7).

Nejprve byla produkce efrageptinů prokázána u druhu *T. niveum*, později u *T. geodes*. Ze skupiny šesti efrageptinů označených A, B, C, D, E, F převládá u *T. geodes* efrageptin F, zatímco u *T. niveum* má převahu efrageptin D (32).

U *T. niveum* je poměr efrageptinů *in vitro*: D > E > F > C > G, *in vivo*: D > F > C > E > G.

T. parasiticum produkuje *in vitro* pouze efrageptin E, a to jen v malém množství.

Efrageptiny jsou detekovatelné 48 hodin po inokulaci a jejich množství se zvyšuje s růstem biomasy. Efrageptiny aplikované do hemocelu jsou toxické pro široký okruh hmyzu. Mortalita závisí na aplikovaném množství (7).

Dalším toxickým metabolitem produkovaným houbami rodu *Tolypocladium* je tolypin. Byl popsán v roce 1988 Weiserem a Mathou, kteří zaznamenali symptomy intoxikace (knock-down) larev komára *Culex pipiens* (59).

Rod *Tolypocladium* je významný také v souvislosti se schopností produkovat cyklosporiny – skupinu neutrálních cyklických oligopeptidů (82) tvořených jedenácti aminokyselinami (109), které účinně potlačují odpověď T-lymfocytů na antigenní podněty přítomné v organismu (105).

Jsou produkovány zejména druhy *T. inflatum* a *T. terricola* (105).

Cyklosporin A (CsA) byl objeven v roce 1972 vědci z laboratoře švýcarské farmaceutické firmy Sandoz při pátrání po nových fungicidech. Byl identifikován jako sekundární metabolit dvou nově izolovaných kmenů vláknitých půdních hub *Tolypocladium inflatum* a *Cylindrosporum lucidum* z půdních vzorků z Norska (115).

Objevem cyklosporinu začala nová éra imunofarmakologie. Cyklosporin izolovaný z houby *T. inflatum* byl prvním imunosupresivním lékem, který umožňoval imunoregulaci T-lymfocytů bez extrémní toxicity. Cyklosporin byl nejprve zkoumán jako antifungální antibiotikum, ale spektrum jeho účinku bylo příliš úzké pro klinické použití. J. F. Borel objevil jeho imunosupresivní aktivitu v roce 1976 (72).

Postupně byly cyklopeptidické metabolity cyklosporinového typu nalezeny nejen u dalších druhů hub rodu *Tolypocladium* (115), ale i u řady jiných vláknitých hub, včetně patogenů hmyzu (např. *Beauveria* spp., *Fusarium* spp., *Lecanicillium* spp.).

Z entomopatogenních hub existuje nejvíce informací o přirozené produkci cyklosporinů právě u rodu *Tolypocladium*. Je např. známo, že *T. terricola* – druh patogenní pro komáry – produkuje cyklosporiny efektivněji než zástupci rodu *Beauveria* nebo *Lecanicillium* (82).

T. niveum, další druhy rodu *Tolypocladium* a morfologicky příbuzné houby z rodů *Beauveria*, *Fusarium* a *Neocosmospora* kromě cyklosporinu A produkují také extracelulární lipázy a chitinázy. Proteázová aktivita zaznamenaná nebyla (1).

***Tolypocladium cylindrosporum* Gams**

Houba *T. cylindrosporum* byla poprvé izolována v roce 1971 v Kalifornii z komára *Ochlerotatus sierrensis* (syn. *Aedes sierrensis*) a později na Novém Zélandu z *O. australis* (59).

Je nejběžnějším druhem, který infikuje larvy komárů (82).

Může však napadat také jiný dvoukřídlný hmyz (např. *Drosophila* spp., *Plecia nearctica*) (82, 13, 36), dále některé motýly, jepice, ale i jiné hostitele, např. klanonožce a vířníky (82).

Druh byl nalezen také na pozůstatcích kapradorostů, *Eucalyptus* sp. a v půdě.

Geografické rozšíření: půdy v Evropě (ČR, Nizozemsko, Velká Británie), Nepál, Kanada; *Diptera* v USA (Kalifornie, Florida), na Novém Zélandu; *Eucalyptus* sp., Austrálie; *Picea mariana*, Kanada (13).

Kromě dalších významných druhů hub byla přítomnost *T. cylindrosporum* zaznamenána ve vzorcích půd odebraných na lokalitách napadených lýkožroutem (*Ips typographus*) v NP a CHKO Šumava (39).

T. cylindrosporum produkuje toxické metabolity efrageptiny (6) a tolypin (59).

Infekce *T. cylindrosporum* byla popsána na larvách komárů. Infekční jsou jak blastokonidie, tak i vzdušné konidie, blastokonidie jsou však méně virulentní (59).

Larvy komárů jsou infikovány kutikulou (13, 59) i přijímanou potravou (59) – infekce se šíří ze středního střeva.

V hostiteli se rozrůstá mycelium a tvoří se blastospory. V některých hostitelích dochází k enkapsulaci invadujících hyf, hostitel hyne pouze po silném napadení hemocelu.

Přirozená infekce populací *A. sierrensis* žijících v dutinách stromů způsobuje více než 70% mortalitu. Samičky šíří infekci z dutin stromů při kladení vajíček do jiných dutin stromů, kdy jsou samy náchylné k infekci touto houbou.

Pokusná infekce *Culex molestus* (*Culex pipiens molestus*) probíhala obdobně, první symptomy se objevily 5 dnů po infekci, během 7 dnů larvy uhynuly. Úspěšná byla také pokusná infekce *A. aegypti*, *A. caspius* a *Anopheles stephansi* (13).

T. cylindrosporum izolované z komára *Aedes australis* na Novém Zélandu a další kmeny izolované z půdy v bývalém Československu také vykazaly patogenitu pro larvy komárů. Kukly a dospělci nebyli infikováni (78).

Tento druh je především patogenem larev komárů, ačkoli výsledky některých studií potvrzují náchylnost vůči infekci také u dospělců *O. sierrensis*, kde způsoboval 50% mortalitu během 5 dnů a 100% mortalitu během 9 dnů. V laboratorní studii *T. cylindrosporum* způsobilo více než 90% mortalitu larev *O. sierrensis* a 67% mortalitu larev *Culex tarsalis* při koncentraci 5×10^6 konidií/ml. Devatenáct druhů komárů bylo náchylných k infekci touto houbou – např. deset druhů rodu *Aedes*, šest druhů rodu *Culex*, dva druhy rodu *Culiseta* a jeden druh rodu *Anopheles* (59).

T. cylindrosporum způsobuje epizootie v populacích komárů na Novém Zélandu a v Kalifornii (36).

O patogenitě *T. cylindrosporum* pro mnoho druhů komárů existuje řada poznatků, méně informací je však k dispozici o dalších hostitelích. Ukázalo se, že květilka cibulová (*Delia antiqua*) jakož i vodní necílové organismy (buchanky, hrotnatky, jepice aj.) jsou v laboratorních podmínkách náchylné k infekci *T. cylindrosporum*. V přírodě byla zaznamenána také infekce larev octomilky (*Drosophila* sp.) a *Plecia nearctica* (36).

Přirozená redukce populace zimujících housenek osetice polní (*Agrotis segetum*) vyvolaná houbou *T. cylindrosporum* byla zjištěna v Dánsku. Patogenita houby byla testována v nádobovém pokusu aplikací suspenze konidií na zimující housen-

ky osenice polní. V pokusu byly použity nádoby s housenkami a/nebo půdou z kontaminovaného stanoviště za účelem studia přirozené mortality vyvolané touto houbou. Experiment byl založen v polovině října a odběry proběhly v období leden až květen čtyřikrát. Houba způsobila vysokou mortalitu v lednu, kdy bylo infikováno téměř 70 % ošetřených housenek a v březnu bylo více než 94 % housenek usmrceno. 21 % housenek pocházejících z přirozeně kontaminovaného stanoviště bylo v polovině října infikováno a v březnu infekce dosáhla 93 %. Schopnost houby infikovat hmyz při nízké teplotě zřejmě souvisí s relativně nízkou optimální teplotou pro růst (21 °C), která je nižší než u většiny entomopatogenních hyfomycet. Při studiu hostitelského spektra s testováním 10 druhů hmyzu se ukázalo, že tato houba je pravděpodobně specifická pro zimující housenky (64).

Interakce mezi *T. cylindrosporum*, jeho sekundárními metabolity (efrapeptiny) a imunitní reakcí hmyzu byla zkoumána *in vivo* a *in vitro*. Studie *in vitro* ukázala, že efrapeptiny inhibují fagocytózní aktivitu hemocytů zavíječe voskového (*Galleria mellonella*). Reakce závisela na aplikovaném množství. Aktivace fenoloxidázy nebyla ovlivněna efrapeptiny. Také studie *in vivo* ukázala, že efrapeptiny neovlivnily fenoloxidázovou aktivitu a celkový počet hemocytů 1 až 6 hodin po ošetření housenek. Po 12 hodinách od aplikace však nastala výrazná inhibice fenoloxidázové aktivity v hemocytovém lyzátu. Do 24 hodin po aplikaci spor *T. cylindrosporum* na housenky zavíječe nebyla také zaznamenána významná redukce fenoloxidázové aktivity a celkového počtu hemocytů. Po uplynutí 48 hodin od ošetření housenek sporami však byla potlačena fenoloxidázová aktivity a snížen celkový počet hemocytů (6).

***Tolypocladium niveum* Gams**

(syn. *T. inflatum* Gams)

Houba *T. niveum* je významným producentem sekundárních metabolitů – efrapeptinů (33) a cyklosporinů (A, B, C) (48, 109).

Efrapeptiny izolované z této houby tvoří směs pěti blízce příbuzných složek, které vykazují toxickou aktivitu proti svlušce chmelové, mandelince bramborové, blýskavce *Spodoptera eridania* a černopásce *Heliothis virescens*. Insekticidní aktivita efrapeptinů byla testována aplikací dvou složek proti mandelince bramborové ve formě postřiku na listy. Efrapeptin F (LC₅₀ = 8.4 ppm) byl přibližně dvakrát účinnější než efrapeptin D (LC₅₀ = 18.9 ppm). Schopnost efrapeptinů inhibovat ATPázovou aktivitu byla demonstrována užitím mitochondriálních preparátů ze dvou druhů hub (*Metarhizium anisopliae* a *T. niveum*) a ze hmyzu (mouchy domácí). Ze všech pěti testovaných efrapeptinů proti mouše domácí byl nejúčinnějším inhibítorem ATPázy efrapeptin D (33).

T. niveum produkuje rovněž extracelulární lipázy a chitinázy (1).

Přítomnost *T. niveum* byla kromě dalších významných druhů hub zaznamenána ve vzorcích půd odebraných na lokalitách napadených lýkožroutem (*Ips typographus*) v NP a CHKO Šumava (39).

Kmen *T. niveum* izolovaný v bývalém Československu byl patogenní pro larvy komára *Culex pipiens autogenicus* (76).

Tento druh vykazuje také nematostatické a nematocidní účinky (např. na *Meloidogyne incognita* a *Panagrellus redivivus*) (79).

***Tolypocladium terricola* sp. N.**

Nový entomopatogenní druh rodu *Tolypocladium*, který byl popsán z půdního vzorku z Finska. Od jiných druhů rodu *Tolypocladium* se liší morfologií, produkcí sekundárních metabolitů a relativně silnou aktivitou proti komárům (77).

Jako hlavní metabolit tvořící povrchovou vrstvu spor byl stanoven cyklosporin A (43).

Larvy komárů ošetřené *T. terricola* vykazují typické známky intoxikace projevující se koncentrací larev ve středu nádrže a orientací ústního ústrojí k vodní hladině (77).

Konidie *T. terricola* a dalšího entomopatogenního druhu *T. tundrense* ozářené UV vykazují silnou toxicitu vůči larvám komára *Aedes aegypti* při koncentraci 5×10⁵ a 5×10⁶/ml. Ošetření larev vysušeným extraktem spor v metanolu vyvolává vysokou mortalitu doprovázenou histologickými změnami, včetně vakuolizace a následné destrukce mitochondrií buněk středního střeva (43).

V laboratorní studii byla po osmi dnech od infekce *T. terricola* prokázána více než 80% mortalita larev komára *Aedes sierrensis* (59).

Biopreparáty

T. cylindrosporum je považováno za potenciální agens biologické ochrany proti larvám komárů (36) a muchniček ve vodním prostředí v oblastech mírného pásma. Výsledků získaných v laboratoři by mohlo být dosaženo v přírodě pouze za určitých

podmínek, při kterých však nelze tuto houbu využít k ochraně proti komárům. Studie *in vivo* na Novém Zélandu a v Albertě (Kanada) prokázaly neefektivitu této houby. Kromě toho zájem o využití v ochraně proti larvám komárů snižuje také nedostatečná reziduální aktivita (59).

3. ZÁVĚR

V přírodě se vyskytuje relativně velký počet hub z různých taxonomických skupin, které jsou patogenní pro rostlinné škůdce (hmyz, roztoče, háďátka). Většinou jsou specifické pro jednotlivý cílový druh škůdce nebo omezený počet druhů a jsou neškodné pro obratlovce a rostliny. Často vyvolávají přirozené epizootie v populacích škůdců, čímž se řadí mezi významné mikroorganismy regulující četnost těchto populací. Některé mitosporické houby mohou být masově produkovány, formulovány v podobě biopesticidů a aplikovány způsobem podobným aplikacím chemických pesticidů – užitím postřiků, poprašků nebo zálivek. Jejich výhodou je, že nezanechávají žádná toxická rezidua a nevytvářejí žádné nebo jen malé znečištění prostředí. Jsou také kompatibilní s mnoha chemickými pesticidy, parazitoidy a predátory. Po celém světě je dostupných přes sto produktů pro používání v zahradnictví, zemědělství a lesnictví. Jsou však ve srovnání s chemickými pesticidy dražší a jejich účinnost významným způsobem ovlivňují podmínky prostředí.

4. LITERATURA

1. AARNIO, T. H. – AGATHOS, S. N. Production of extracellular enzymes and cyclosporin by *Tolypocladium inflatum* and morphologically related fungi. *Biotechnology Letters*, 1989, vol. 11, no. 11, s. 759–764.
<http://www.springerlink.com/content/v236768565187615/>
2. AGHAJANZADEH, S. – MALLIK, B. – CHANDRASHEKAR, S. H. Bioefficacy of six Isolates of *Hirsutella thompsonii* Fisher Against Citrus Rust Mite, *Phyllocoptruta oleivora* Ashmead (Acari: Eriophyidae) and Two Spotted Spider Mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidea). *Pakistan Journal of Biological Science*, 2006, vol. 5, no. 9, s. 871–875.
<http://www.ansijournals.com/3/detail.php?id=1&jid=pjbs&theme=3&issueno=122&articulo=5827>
3. ANDERSON, CH. Interactions between *Lecanicillium lecanii*, *Aphis gossypii* and cotton.
<http://www.bio.usyd.edu.au/honspage/2003/2003Abs.doc>
4. AVERY, P. Potential Beetle Control. *American Vegetable Grower*, 2008, vol. 56, no. 4, s. 44.
5. BABENDREIER, D. – KELLER, S. – ROMEIS, J. – BIGLER, F. Neue Ansätze für die Bekämpfung des Maiswurzelbohrers. *Agrarforschung*, 2006, vol. 13, no. 2, s. 80–82.
6. BANDANI, A. R. Effects of *Tolypocladium cylindrosporum* and its secondary metabolites, efrapeptins, on the immune system of *Galleria mellonella* larvae. *Biocontrol Science and Technology*, 2005, vol. 15, no. 1, s. 67–79.
<http://www.ingentaconnect.com/content/tandf/cbst/2005/00000015/00000001/art00005>
7. BANDANI, A. R. – KHAMBAY, B. P. S. – FAULL, J. L. – NEWTON, R. – DEADMAN, M. – BUTT, T. M. Production of efrapeptins by *Tolypocladium* species and evaluation of their insecticidal and antimicrobial properties. *Mycological Research*, 2000, no. 104, s. 537–544.
<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=43159>
8. Biologisches Insektizid zur Befallsminderung von Drahtwürmern an Kartoffeln. *Kartoffelbau*, 2008, vol. 59, no. 4, s. 151.
9. BLASER, M. – KEISER, A. – KELLER, S. Insekten tötender Bodenpilz in Schweizer Kartoffelfeldern. *Agrarforschung*, 2004, vol. 11, no. 3, s. 92–97.
10. Blueberry bud mite.
http://ipm.ncsu.edu/small_fruit/mite.html
11. BOUMA, D. Švýcarsko má bioprodukci v oblíbení.
http://www.agroweb.cz/rostlinna-vyroba/Svycarsko-ma-bioprodukci-v-oblibe_s44x28807.html
12. BRADY, B. L. *Aschersonia aleyrodis*. [Descriptions of Fungi and Bacteria]. *IMI Descriptions of Fungi and Bacteria*, 1984, no. 82, s. 811.
<http://www.cababstractsplus.org/google/abstract.asp?AcNo=20056400811>
13. BRADY, B. L. *Tolypocladium cylindrosporum*. [Descriptions of Fungi and Bacteria].
<http://www.cababstractsplus.org/google/abstract.asp?AcNo=20056400819>
14. CLOYD, R. The Entomopathogen *Verticillium lecanii*.
<http://www.entomology.wisc.edu/mbcn/kyf612.html>
15. DANIEL, C. – KELLER, S. – WYSS, E. Einsatz entomopathogener Pilze gegen die Kirschfruchtfliege *Rhagoletis cerasi*: erste Feldresultate.
<http://edocs.ub.uni-frankfurt.de/volltexte/2008/10929/>
16. Development of *Nomuraea rileyi* based biopesticides for controlling *Lepidopteran* larva.
<http://rde.biotech.or.th/rdedocs/Proposal/224PP/AbstractEng.doc>
17. FASULO, T. R. – BROOKS, R. F. Whitefly Pests of Florida Citrus.
<http://edis.ifas.ufl.edu/ch058>
18. GERSON, U. – KENNETH, R. – MUTTATH, T. I. *Hirsutella thompsonii* a fungal pathogen of mites. II. Host-pathogen interactions.
<http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1744-7348.1979.tb07410.x?journalCode=aab>
19. GINDIN, G. – GESCHTOVT, N. U. – RACCAH, B. – BARASH, I. Pathogenicity of *Verticillium lecanii* to Different Developmental Stages of the Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Phytoparasitica*, 2000, vol. 28, no 3.
<http://www.phytoparasitica.org/phyto/pdfs/2000/issue3/gind2.pdf>
20. GOETTEL, M. S. – KOIKE, M. – KIM, J. J. – AIUCHI, D. – SHINYA, R. – BRODEUR, J. Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes and plant diseases.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18423483?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum
21. GOKCE, A. – KUBILAY, M. Pathogenicity of *Paecilomyces* spp. to the Glasshouse Whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, with Some Observations on the Fungal Infection.
<http://journals.tubitak.gov.tr/agriculture/issues/tar-05-29-5/tar-29-5-1-0411-1.pdf>
22. GUPTA, V. P. Natural Occurrence of the Entomopathogenic Fungus *Nomuraea rileyi* in the Soybean Green Semilooper, *Chrysodeixis acuta*, in India.
<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/brief/2003/fungus/>

23. HIROMORI, H. – KOTARO, G. – KANAKO, S. – MASAYOSHI, H. Insecticidal Activity and Chemical Susceptibility of *Nomuraea rileyi* as the Pathogen to the Larvae of Lawn Cutworm, *Spodoptera depravata*. *Journal of Japanese Society of Turfgrass Science*, 2002, vol. 30, no. 2, s. 123–129.
<http://scielinks.jp/j-east/article/200210/000020021002A0351361.php>
24. HODDLE, M. S. The Biology and Management of Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolii* Bellows and Perring (Homoptera: Aleyrodidae) on Greenhouse Grown Ornamentals.
<http://www.biocontrol.ucr.edu/bemisia.html#verticillium>
25. HOLLAND, R. J. – WILLIAMS, K. L. – NEVALAINEN, K. M. H. *Paecilomyces lilacinus* strain Bioact251 is not a plant endophyte. *Australasian Plant Pathology*, 2003, vol. 32, no. 4, s. 473–478.
<http://www.publish.csiro.au/paper/AP03046.htm>
26. HOLUŠA, J. – WEISER, J. Biologické postupy boje s lesními škůdci.
http://209.85.129.104/search?q=cache:8XkZAlqLdFgJ:www.vulhm.cz/docs/24/Zpravodaj/ZOL-11-2005.pdf+zelen%C3%A1+muskardi+na&hl=cs&ct=clnk&cd=3&gl=cz&lr=lang_cs
27. Is the biopesticide tide turning?
Grower, 2006, 26 January, s. 12–13.
28. JÖRG, E. – BECK, W. Bekämpfung des Kartoffelkäfers. *Kartoffelbau*, 2002, vol. 53, no. 5, s. 170–173.
29. JUN ZHI, Q. – ZHI PENG, H. – JIE RU, P. – XUE QIN, X. – YAN PING, Z. – SHAO SHENG, Z. – XI ONG, G. Infection behavior of entomopathogenic fungus *Aschersonia aleyrodalis* on *Bemisia tabaci*. *Mycosystema*, 2004, vol. 23, no. 1, s. 115–121.
<http://www.cababstractsplus.org/google/abstract.asp?AcNo=20043070140>
30. KIM, J. J. – GOETTEL, M. S. – GILLESPIE, D. R. Potential of *Lecanicillium* species for dual microbial control of aphids and the cucumber powdery mildew fungus, *Sphaerotheca fuliginea*. *Biological Control*, 2007, vol. 40, no. 3, s. 327–332.
31. KIM, J. J. – KIM, K. CH. – ROBERTS, D. W. Impact of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* on development of an aphid parasitoid, *Aphidius colemani*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2005, vol. 88, no. 3, s. 254–256.
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WJV-4FJ8C7M-1&_user=622206&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_view=c&_acct=C000031958&_version=1&_urlVersion=0&_userid=622206&md5=cdd5ab7dc999795ad6f8ab31111ecbf6
32. KRASNOFF, S. B. – GUPTA, S. Identification and directed biosynthesis of efrapeptins in the fungus *Tolypocladium geodes* gams. *Journal of Chemical Ecology*, 1991, vol. 17, no. 10, s. 1953–1962.
<http://www.springerlink.com/content/k4p756gj0231g465/>
33. KRASNOFF, S. B. – GUPTA, S. – ST LEGER, R. J. – RENWICK, J. A. A. – ROBERTS, D. W. Antifungal and insecticidal properties of the efrapeptins: metabolites of the fungus *Tolypocladium niveum*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1991, vol. 58, no. 2, s. 180–188.
http://grande.nal.usda.gov/ibids/index.php?mode2=detail&origin=ibids_references&therow=417046
34. KREUTZ, J. Möglichkeiten einer biologischen Bekämpfung des Buchdruckers, *Ips typographus* L. (Col., Scolytidae), mit insekten-pathogenen Pilzen in Kombination mit Pheromonfallen.
http://www.infill.com/projekte/kreutz/papers/diss_2002.pdf
35. KUMAR, V. – SINGH, V. P. – KUMAR, V. – BABU, A. M. – DATTA, R. K. SEM study on the invasion of *Nomuraea rileyi* (Farlow) on silkworm, *Bombyx mori* Linn. causing green muscardine. *Mycopathologia*, 1997, vol. 139, no. 3, s. 141–144.
<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=2237106>
36. LAM, T. N. C. – GOETTEL, M. S. – SOARES, G. G., Jr. Host Records for the Entomopathogenic Hyphomycete *Tolypocladium cylindrosporum*. *The Florida Entomologist*, 1988, vol. 71, no. 1, s. 86–89.
<http://www.jstor.org/pss/3494898>
37. LANDA, Z. Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub. *AGRO-ochrana rostlin*, 1998, č. 10, s. 7–12.
<http://home.zf.jcu.cz/public/departments/krv/rostlin/vyuka/clanky/agro.htm>
38. LANDA, Z. – HORŇÁK, P. – BURSOVÁ, E. Entomopatogenní houby asociované s lýkožroutem smrkovým *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae) v oblasti NP a CHKO Šumava.
http://www.npsumava.cz/storage/124_128.pdf
39. LANDA, Z. – KŘENOVA, Z. – VOJTĚCH, O. Využití houby *Beauveria bassiana* v ochraně proti lýkožroutu smrkovému. *Lesnická práce*, 2007, č. 10, s. 14–15.
<http://lesprace.silvarium.cz/content/view/1988/133/>
40. LOURENCAO, A. L. – YUKI, V. A. – ALVES, S. B. Epizootics of *Aschersonia cf. goldiana* on *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) biotype B in the state of São Paulo. *Brazil. An. Soc. Entomol. Bras.*, 1999, vol. 28, no. 2, s. 343–345.
http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0301-80591999000200020&script=sci_abstract
41. LÜTH, P. Weitere Entwicklung des biologischen Nematizides BioAct WG.
http://www.dpg.phytomedizin.org/fileadmin/alte_Webseiten/ak/07/Tagung2005/tagung2005.htm
42. MARTIN, P. A. W. – SCHRODER, R. F. W. – POPRAWSKI, T. J. – LIPA, J. J. – SOSNOWSKA, D. – HAUSVATER, E. – RASOCHA, V. Vliv vysokých teplot na citlivost mandelinky bramborové (Coleoptera: Chrysomelidae) k *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin v Polsku, České republice a v USA. *Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod*, 13, 1999, 69–77.
http://www.vubhb.cz/_t.asp?f=prace/1999.htm#06c

43. MATHA, V. – JEGOROV, A. – WEISER, J. – PILLAI, J. S. The mosquitocidal activity of conidia of *Tolypocladium tundrense* and *Tolypocladium terricola*. *Cytobios*, 1992, no. 69, s. 278–279.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1505208>
44. MAZET, I. – VEY, A. Hirsutellin A, a toxic protein produced in vitro by *Hirsutella thompsonii*. *Microbiology*, vol. 141, s. 1343–1348.
<http://mic.sgmjournals.org/cgi/content/abstract/141/6/1343>
45. MEEKES, E. T. M. – FRANSEN, J. J. – VAN LENTEREN, J. C. Pathogenicity of *Aschersonia* spp. against whiteflies *Bemisia argentifolii* and *Trialeurodes vaporariorum*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2002, vol. 81, no. 1, s. 1–11.
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WJV-470TY5W-2&_user=622206&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000031958&_version=1&_urlVersion=0&_userid=622206&md5=6bd7ab122ab19eb7674e33e655085d59
46. MENDOZA, A. – SIKORA, R. A. – KIEWNICK, S. Efficacy of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 for the control of the burrowing nematode *Radopholus similis* in banana.
http://www.dpg.phytomedizin.org/fileadmin/alte_Webseiten/ak/07/Tagung2005/tagung2005.htm
47. MENDOZA LUNA, A. R. – RUMBOS, CH. – KIEWNICK, S. – SIKORA, R. A. Effect of *Paecilomyces lilacinus* Strain 251 on the Survival and Virulence of the Entomopathogenic Nematodes *Steinernema feltiae*, *Heterorhabditis bacteriophora*, and *H. megidis*.
http://www.tropentag.de/2005/abstracts/links/Mendoza_Luna_iKOA57KA.pdf
48. Method Of Altering the Domains of Cyclosporin Synthetase to Give a Modified Cyclosporin Synthetase.
<http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?wo=1999002659&IA=WO1999002659&DISPLAY=DESC>
49. PENDLAND, J. C. – SHI-YIH HUNG – BOUCIAS, D. In vivo development of the entomogeneous hyphomycete *Paecilomyces farinosus* in host *Spodoptera exigua* (beet armyworm) larvae. *Mycopathologia*, 1995, vol. 130, no. 3, s. 151–158.
<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=3657046>
50. Pilz contra Engerlinge. *Top Agrar*, 2004, no. 9, s. 74.
51. Pilz gegen Drahtwurm. *Top Agrar*, 2004, no. 5, s. 20.
52. PILZ, CH. – KELLER, S. Pilzkrankheiten bei adulten Rapsglanzkäfer.
[Agrarforschung](http://www.dpg.phytomedizin.org/fileadmin/alte_Webseiten/ak/07/Tagung2005/tagung2005.htm), 2006, vol. 13, no. 8, s. 353–355.
53. PIRON, M. – LACORDAIRE, A.-I. *Verticillium lecanii* Ve6. Insecticide biologique contre les aleurodes. *Phytoma*, 2006, vol. 58, no. 591, s. 42–44.
54. PSOTA, V. Možnosti pro rozšíření spektra biologické ochrany kukuřice. *Nové Agro*, 2008, roč.1, č. 2, s. 26–27.
55. ROD, J. Mandelinka bramborová v Polsku. *Rostlinolékař*, 2001, č. 2, s. 15.
56. ROSAS-ACEVEDO, J. L. – BOUCIAS, D. G. – LEZAMA, R. – SIMS, K. – PESCADOR, A. Exudate from sporulating cultures of *Hirsutella thompsonii* inhibit oviposition by the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Experimental & applied acarology*, vol. 29, 2003, no. 3–4, s. 213–225.
<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=15251928>
57. SHADDICK, C. Blocking a global problem. *Horticulture Week*, 2003, 4 December, s. 22–23.
58. SHADDICK, C. Effective controls for spider mite pests. *Horticulture Week*, 2003, 2 October, s. 26–27.
59. SCHOLTE, E. J. – KNOLS, B. G. J. – SAMSON, R. A. – TAKKEN, W. Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. *Journal of Insect Science*, 2004, s. 4–19.
<http://www.insectscience.org/4.19/>
60. SLAATS, B. E. – PATEL, A. – BEITZEN-HEINEKE, W. – MÜLLER, J. – HALLMANN, J. *Hirsutella rhossiliensis*: Formulierung, Wirkung auf Nichtzielorganismen und Beeinflussung durch Pflanzenschutzmittel.
http://www.dpg.phytomedizin.org/fileadmin/alte_Webseiten/ak/07/Tagung2005/tagung2005.htm
61. SLAATS, B. E. – PATEL, A. – VORLOP, K.-D. – BEITZEN-HEINEKE, W. – HALLMANN, J. Wirksamkeit von verkapseltem *Hirsutella rhossiliensis* gegen *Heterodera schachtii* an Zuckerrüben.
<http://www.bba.de/veroeff/mitt/pdfs/mitt404.pdf>
62. SOSA-GÓMEZ, D. R. – DELPIN, K. E. – MOSCARDI, F. – DE H. NOZAKI, M. The impact of fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson epizootics and on populations of *Anticarsia gemmatilis* Hübner (*Lepidoptera: Noctuidae*), on soybean.
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-566X2003000200014
63. SRISUKCHAYAKUL, P. – WIWATB, CH. – PANTUWATANAC, S. Studies on the Pathogenesis of the Local Isolates of *Nomuraea rileyi* against *Spodoptera litura*. *ScienceAsia*, 2005, vol.31, s. 273–276.
http://scienceasia.tiac.or.th/PDF/vol31/v31_273_276.pdf
64. STEENBERG, T. – OGAARD, L. Mortality in hibernating turnip moth larvae, *Agrotis segetum*, caused by *Tolypocladium cylindrosporum*. *Mycological Research*, 2000, no.104, s. 87–91.
<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=43065>
65. SZENTIVANYI, O. – VARGA, K. – WYAND, R. – SLATTER, H. – KISS, L. *Paecilomyces farinosus* destroys powdery mildew colonies in detached leaf cultures but not on whole plants. *European Journal of Plant Pathology*, 2006, vol. 115, no. 3, s. 351–356.
<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=17966255>

66. ŠVESTKA, M. – BALEK, J. Ponravy chroustů opět ohrožují lesní školky a kultury. <http://lesprace.silvarium.cz/content/view/562/>
67. TANG, L. C. – HOU, R. F. Effects of environmental factors on virulence of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, against the corn earworm, *Helicoverpa armigera* (Lep., Noctuidae). *Journal of Applied Entomology*, 2001, vol. 125, no. 5, s. 243–248. <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1046/j.1439-0418.2001.00544.x?journalCode=jen>
68. TANG, L. C. – HOU, R. F. Potential application of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, for control of the corn earworm, *Helicoverpa armigera*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, July 1998, vol. 88, s. 25–30. <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1046/j.1570-7458.1998.00342.x?journalCode=eea>
69. The future potential of biopesticides. *Grower*, 2005, 20 January, s. 16–18.
70. The invisible but lethal army. *Grower*, 2002, vol. 138, no. 19, s. 14–15.
71. THUNGRABEAB, M. – BLAESER, P. – SENGONCA, C. Possibilities for biocontrol of the onion thrips *Thrips tabaci* Lindeman (Thys., Thripidae) using different entomopathogenic fungi from Thailand. <http://www.dgae.de/html/publi/mitt2006/299.pdf>
72. UPTON, H. Origin of drugs in current use: the cyclosporin story. http://www.world-of-fungi.org/Mostly_Medical/Harriet_Upton/Harriet_Upton.htm
73. URBAN, Z. – KALINA, T. *Systém a evoluce nižších rostlin*. SPN Praha, 1980, 415 s.
74. VAN DER GEEST, L. P. S. – ELLIOT, S. L. – BREEUWER, J. A. J. – BEERLING, E. A. M. Diseases of mites. *Experimental and Applied Acarology*, 2000, vol. 24, s. 497–560. http://64.233.183.104/search?q=cache:VnOpCaAalf8J:www.nhm.ac.uk/hosted_sites/acarology/saas/e-library/pdf000200/a000185.pdf+Hirsutella+thompsonii&hl=cs&ct=clnk&cd=56&gl=cz
75. VERHAAR, M. A. – OSTERGAARD, K. K. – HIJWEGEN, T. – ZADOKS, J. C. Preventative and Curative Applications of *Verticillium lecanii* for Biological Control of Cucumber Powdery Mildew. *Biocontrol Science and Technology*, 1997, vol. 7, no. 4, s. 543–552. <http://www.informaworld.com/smpp/469528756-19503275/content~content=a713655848~db=all~order=page>
76. WEISER, J. Mosquito-killing activity of strains of *Tolypocladium cylindrosporum* and *T. niveum*. *Czech Mycology*, 1987, vol. 41, no. 4, s. 219–224. <http://www.natur.cuni.cz/cvsm/CM4143.pdf>
77. WEISER, J. – MATHA, V. – JEGOROV, A. *Tolypocladium terricola* sp. N., a new mosquito-killing species of the genus *Tolypocladium* Gams (Hyphomycetes). *Folia Parasitologica*, 1991, vol. 38, no. 4, 363–369. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1688023>
78. WEISER, J. – PILLAI, J. S. *Tolypocladium cylindrosporum* [Deuteromycetes, Moniliaceae] a new pathogen of mosquito larvae. <http://www.springerlink.com/content/q152318u70543877/>
79. ZAKI, M. J. Nematostatic and nematocidal activity of entomogenous fungus *Tolypocladium niveum*. *International Journal of Biology and Biotechnology*, 2004, vol. 1, no. 4, s. 727–728. <http://www.cababstractsplus.org/google/abstract.asp?AcNo=20043194545>
80. http://attra.ncat.org/attra-pub/biorationals/biorationals_results_actingred.php?PestType=&Pest=&ActIngred=Verticillium%20lecanii
81. <http://books.google.cz/books?id=fpuMPQfSlzMC&printsec=frontcover&dq=Tolypocladium+terricola#PPA355,M1>
82. <http://books.google.cz/books?id=fpuMPQfSlzMC&printsec=frontcover&dq=Tolypocladium+terricola#PPA356,M1>
83. <http://botany.upol.cz/atlas/system/>
84. <http://msucare.com/pubs/techbulletins/tb218fungus.htm>
85. <http://rl.zf.jcu.cz/informacni/cihlar/aschersonia-aleyrodis/aschersonia-aleyrodis/>
86. <http://rl.zf.jcu.cz/informacni/cihlar/beauveria-bassiana/beauveria-bassiana/>
87. <http://rl.zf.jcu.cz/informacni/cihlar/metarhizium-anisopliae/metarhizium-anisopliae/>
88. <http://rl.zf.jcu.cz/informacni/cihlar/paecilomyces-farinosus/paecilomyces-farinosus/>
89. <http://rl.zf.jcu.cz/informacni/cihlar/paecilomyces-fumosoroseus/paecilomyces-fumosoroseus/>
90. <http://rl.zf.jcu.cz/informacni/cihlar/paecilomyces-lilacinus/paecilomyces-lilacinus/>
91. <http://rl.zf.jcu.cz/studijni-informacni-databaze/obecne-informace-1/beauveria-bassiana>
92. <http://rl.zf.jcu.cz/studijni-informacni-databaze/obecne-informace-1/lecanicillium-lecanii>
93. <http://rl.zf.jcu.cz/studijni-informacni-databaze/obecne-informace-1/paecilomyces-fumosoroseus>
94. <http://rum.bf.jcu.cz/public/mykol/zygo01.doc>
95. http://www.bba.bund.de/cln_045/nn_813794/DE/Home/pflanzen_schuetzen/biologisch_alternativ/biolps/biolps.html
96. <http://www.biocontrol.ucr.edu/bemisia.html#aschersonia>
97. <http://www.biocontrol.ucr.edu/bemisia.html#verticillium>

98. <http://www.biological-research.com/philip-jacobs%20BRIC/pa-lila.htm>
99. <http://www.entomology.wisc.edu/mbcn/kyf403.html>
100. <http://www.excelind.co.in/Verticel.htm>
101. http://www.knowledgebank.irri.org/beneficials/default.htm#Nomuraea_rileyi.htm
102. http://www.landwirtschaft-mlr.baden-wuerttemberg.de/servlet/PB/menu/1042846_11/index.html
103. <http://www.moldbacteria.com/learnmore/paecilomyces.html>
104. <http://www.neemproducts.com/paecilomyces.htm>
105. <http://www.neumm.cz/cz/archiv/177/uvod>
106. <http://www.oekolandbau.de/erzeuger/pflanzenbau/pflanzenschutz/nutzorganismen/insektenpathogene-pilze/paecilomyces-fumosoroseus/>
107. <http://www.prophyta.de/deutsch/index1024.html?start.html>
108. <http://www.soo.co.in/biovl.htm>
109. <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?wo=1999002659&IA=WO1999002659&DISPLAY=DESC>
110. <http://www.zf.jcu.cz/structure/departments/sekce-rostlinolekarstvi/entmopatogenni-organizmy/entomopatogenni-houby/klasifikace-entomopatogennich-hub/>
111. <http://www.zf.jcu.cz/structure/departments/sekce-rostlinolekarstvi/entmopatogenni-organizmy/entomopatogenni-houby/strucna-charakteristika-nejvyznamnejsich-rodu-a-druhu-entomopatogennich-hub/>
112. <http://www.zf.jcu.cz/structure/departments/sekce-rostlinolekarstvi/entmopatogenni-organizmy/entomopatogenni-houby/vyvojovy-cyklus-vlaknitych-entomopatogennich-hub/>
113. <http://www.zf.jcu.cz/structure/departments/sekce-rostlinolekarstvi/entmopatogenni-organizmy/entomopatogenni-mikroorganizmy/>
114. http://www2.biologie.uni-halle.de/zool/dev_biol/diss/schreiter/diss_einl.html
115. http://74.125.39.104/search?q=cache:rg_YO--zxp4J:tomcat.prf.jcu.cz/sebest/Dipl/Olga.doc+Tolypocladium+terricola&hl=cs&ct=clnk&cd=4&gl=cz&lr=lang_cs

Obrázky v textu

- Obr. 1** Housenky a kukla *Heliothis virescens* zcela pokryté bílými konidiofory a konidii houby *Beauveria bassiana*.
[Larvae and pupa completely covered by white conidiophores and conidia \(asexual spores\).](http://msucares.com/pubs/techbulletins/images/tb218f30.jpg)
<http://msucares.com/pubs/techbulletins/images/tb218f30.jpg>
- Obr. 2** Dospělec *Heliothis virescens* porostlý houbou *Beauveria bassiana*.
<http://msucares.com/pubs/techbulletins/images/tb218f32.jpg>
- Obr. 3** Chroust napadený *Beauveria brongniartii*. *Top Agrar*, 2004, no. 9, s. 74.
- Obr. 4** Drátovec napadený *Metarhizium anisopliae*. *Top Agrar*, 2004, no. 5, s. 20.
- Obr. 5** Housenka *Heliothis virescens* pokrytá konidiofory a konidii *Nomuraea rileyi*.
<http://msucares.com/pubs/techbulletins/images/tb218f35.jpg>
- Obr. 6** *Paecilomyces* spp. *American Vegetable Grower*, 2008, vol. 56, no. 4, s. 44.
- Obr. 7** *Paecilomyces fumosoroseus* vytváří vatovité, bílé mycelium s růžovými sporami.
<http://www.oekolandbau.de/erzeuger/pflanzenbau/pflanzenschutz/nutzorganismen/insektenpathogene-pilze/paecilomyces-fumosoroseus/>