

Entomopatogenní houby

Houby patří mezi nejdéle známé a nejčastěji determinované mikroorganismy asociované s hmyzem. V současné době je známo více než 750 druhů nižších hub, které mohou působit jako obligátní nebo fakultativní původci onemocnění mnoha druhů hmyzu. 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*). Entomopatogenní houby mohou napadat všechna vývojová stádia hmyzu, nicméně nejčastěji se vyskytují na larvách a kuklách, méně často jsou houbami infikováni dospělci a vajíčka hmyzu. Některé druhy entomopatogenních hub mohou parazitovat na širokém sortimentu hostitelů patřících do zcela odlišných řádů hmyzu a mohou infikovat i různá vývojová stádia téhož hostitele (např. *Paecilomyces fumosoroseus*). Jiné druhy entomopatogenních hub naopak vykazují podstatně užší patogenitu s účinností omezenou na úroveň hmyzích řádů (např. houba *Nomuraea rileyi* parazitující výhradně na larvách motýlů). Z hlediska praktické biologické ochrany nepředstavuje takto rozmanitý potenciál žádná jiná skupina entomopatogenních mikroorganismů.

Klasifikace entomopatogenních hub

V systému hub jsou entomopatogenní druhy zastoupeny v mnoha řádech různých kmenů. Nejvýznamnější zastoupení mají entomopatogenní houby v kmenech Mastigomycotina (*Chytridiomycetes: Blastocladales*); Zygomycotina (*Zygomycetes: Entomophthorales, Mucorales*); Ascomycotina (*Pyrenomycetes: Spaeriales, Laboulbeniales*) a Deuteromycotina (*Hyphomycetes: Moniliales*). Velmi významnou a poměrně dobře známou skupinu entomopatogenních hub představují houby z řádu *Entomophthorales* (Zygomycotina; Zygomycetes). Entomopatogenní houby zastoupené v tomto řádu (např. houby patřící do rodů *Conidiobolus*, *Entomophaga*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Neozygites* a další) reprezentují převážně obligátně parazitické druhy, jejichž vývojový cyklus je vázán výhradně na živého hostitele. Biotrofní charakter však *de facto* znemožňuje praktické využívání těchto hub. Převážnou většinu hub z řádu *Entomophthorales* je možno produkovat pouze v „*in vivo*“ systémech na přirozených hostitelích, což prakticky znemožňuje jejich masovou produkci, která je nezbytným předpokladem komercializace standardních biopreparátů.

Z hlediska praktické biologické ochrany mají největší význam vláknité deuteromycety (Deuteromycotina, Hyphomycetes, Moniliales). K nejznámějším patří houby rodů *Beauveria*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium* a *Verticillium*. V těchto rodech je zastoupena řada druhů, z nichž přibližně 25 je v současnosti již využíváno ve formě standardních biopreparátů. Na rozdíl od obligátně parazitických entomofitor, představují vláknité deuteromycety parazity fakultativní. Většina hub této skupiny může realizovat kompletní vývojový cyklus i v alternativních systémech, bez přímé vazby na živého hostitele (např. saprofytický cyklus na odumírající organické hmotě různého původu). Statut fakultativních parazitů umožňuje produkci homogenní biomasy infekčních jednotek (konidiospora, blastospora, pyknospora aj.) těchto hub pomocí „*in vitro*“ kultivačních systémů, včetně velkokapacitních povrchových nebo fermentačních biotechnologií.

Vývojový cyklus vláknitých entomopatogenních hub

Hlavní fáze vývojového cyklu entomopatogenních hub lze definovat následujícím způsobem:

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

Houbové onemocnění zpravidla iniciují vitální a virulentní konidie. Z abiotických faktorů se na šíření infekčních propagulí hub v prostředí nejčastěji podílí voda a vzduch (vítr, déšť, pohyb vody v půdě, vodní páry). Mezi běžné mechanismy vzniku houbových epizootií v populacích hmyzu patří kontakt zdravých jedinců s jedinci infikovanými, kontaminace při kopulaci nebo kontaminace vajíček při jejich kladení. Sporadicky dochází k šíření mykóz i prostřednictvím biotických vektorů (např. roztoči, háďátka, jiné druhy hmyzu).

Přichycení konidií na povrch těla hostitele je základním předpokladem iniciace houbového onemocnění. Konidií některých druhů hub jsou pro tuto fázi vybaveny adhezivními substancemi, pomocí kterých vytvářejí pevnou vazbu s kutikulou hostitele již při prvním kontaktu (např. houby *Verticillium 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 *vers.* 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 aj.).

Klíčení konidií je prvou 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*, *blastospora*. 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. Mumifikaci 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 foliových krytů) může být celý vývojový cyklus realizován v průběhu 3-5 dnů, v běžných podmínkách vegetačního období mírného pásma probíhá v rozmezí od 7-21 dnů. Kritické fázi vývojového cyklu představují adheze a klíčení konidií. Klíčovým faktorem prostředí je vlhkost. Klíčení konidií zpravidla vyžaduje relativní vlhkost vzduch 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 povrch 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.

Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub

Účinnou složku většiny biopreparátů na bázi entomopatogenních hub tvoří konidie nebo blastospor. Konidie jsou produkovány formou povrchových kultivací na tekutých živných půdách nebo na pevných přirozených substrátech a biotechnologie jejich produkce imituje přirozený cyklus, při kterém je zprvu vytvořena povrchová myceliální biomasa a na konci cyklu se na vzdušném myceliu tvoří konidie. Blastospor entomopatogenních hub jsou produkovány ve fermentačních biotechnologiích (submerzní kultivace v tekuté živné půdě) a využívají fenoménu změny morfologické formy patogena po proniknutí do semi-aerobních podmínek tělní dutiny. Přes určité zásadní odlišnosti jsou však biopreparáty na bázi konidií nebo blastospor stejné v tom, že obsahují konkrétní počet vitálních, virulentních infekčních jednotek schopných přímo vyvolat infekci, které jsou doplněny o inertní nebo nutritivní složky. Nejčastěji jsou takovéto biopreparáty finalizovány do formy smáčlivých, ve vodě rozpustných prášků (WP) nebo granulí (WDG), v poslední době se již objevují i olejové suspenzní koncentráty. K aplikaci lze použít standardní aplikační techniku. Při aplikaci je třeba respektovat „kontaktní účinek“ preparátů (nutnost adheze konidií/blastospor na povrch těla cílového druhu hostitele). Při ošetření nadzemních částí rostlin je nutné pečlivě ošetřit niky, ve kterých se vyskytuje cílový druh škůdce.

Standardní biopreparáty na bázi entomopatogenních hub musejí splňovat řadu kvalitativních a kvantitativních kritérií a podléhají kompletnímu registračnímu

procesu. Mezi klíčové parametry kvalitativní povahy patří garance druhu a kmene patogena; specifikace podílu aktivní a doplňkové složky v biopreparátu a maximální přípustná kontaminace (zastoupení cizorodých biotických příměsí, např. bakterií, v 1 g/ml přípravku). Mezi hlavní kvantitativní parametry houbových biopreparátů patří:

- *počet infekčních jednotek* - tzv. titr konidií (konidiospor, blastospor). Titr infekčních jednotek se zpravidla pohybuje v rozmezí od $1,0 \times 10^9$ - $1,0 \times 10^{10}$ konidií v 1 g/ml biopreparátu
- *klíčivost konidií* garantovaná vitalita konidií nebo blastospor udávaná v %
- *počet kolonie tvořících jednotek* (CFU - *colony forming units*) - specifický údaj kvalitativní povahy, udávající z kolika jednotek patogena přítomných v 1 g/ml biopreparátu se při kultivaci na umělé živné půdě vytvoří samostatná kolonie

Zvláštní skupinu houbových biopreparátů představují přípravky jejichž aktivní složku tvoří buď neinfekční formy biomasy hub nebo infekční jednotky imobilizované v organických nebo anorganických nosičích. Tyto formulace byly cíleně vyvinuty pro účely půdních aplikací. V podstatě jsou známé dvě základní (a v principu značně podobné) verze těchto formulací:

- *biopreparáty na bázi myceliových granulí* - patogen je finalizován do formy sušených myceliových fragmentů, které po aplikaci do půdy jímají vodu a postupně regenerují do standardní formy mycelia, na kterém se tvoří konidie, které mohou infikovat hmyzího hostitele
- *biopreparáty na bázi alginátových pelet* - smíšená biomasa (mycelium, blastospor, konidie) patogena je spolu s nutriční složkou imobilizována do drobných pelet, které po aplikaci do půdy jímají vodu, imobilizovaná houba regeneruje a s využitím živin, které jsou součástí pelety realizuje kompletní saprofytní cyklus, jehož výsledkem je tvorba nové generace konidií

Při aplikaci půdních formulací je do půdy zaváděna neinfekční forma (alginátová nebo myceliová peleta), u které musí nejdříve proběhnout celý vývojový cyklus, v průběhu kterého se vytvoří spory. V půdním profilu se tak vytvoří soustava „přirozených infekčních zón“, která způsobuje dlouhodobý infekční tlak na populace škůdců. Takto formulované biopreparáty jsou aplikovány buď celoplošně (při některých agrotechnických operacích), častěji však v přesných dávkách přímo do okolí chráněné rostlin (při setí nebo sázení) a jako příměs do pěstebních substrátů (rychlení sazenic a pěstování okrasných květin).

Stručná charakteristika nejvýznamnějších rodů a druhů entomopatogenních hub

Rod *Aschersonia* – nejvýznamnější druhy *A. aleyrodís*, *A. placenta*, *A. goldiana* aj., tropické a subtropické druhy hub parazitující na nymfách mnoha druhů molic (*Homoptera*, *Aleyrodidae*), včetně polyfágních škůdců kulturních rostlin pěstovaných ve sklenicích a foliovnicích (*Trialeurodes vaporariorum* a *Bemisia tabaci*). Houby rodu *Aschersonia* se šíří vřetenovitými pyknosporami. V průběhu parazitické fáze vývoje totálně mumifikují hostitele hustým myceliálním stromatem, ve kterém se formují pyknidy produkující masu nových pyknospor, která je na povrch těla vytlačována ve formě žlutého, oranžového nebo červeného exudátu.

Rod *Beauveria* - nejvýznamnější druhy *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. tenella*, reprezentují široce polyfágní houby, které se běžně vyskytují v půdě a parazitují na půdním hmyzu, případně na stádiích hmyzu, která se v půdě vyskytují pouze příležitostně (hibernace). V sortimentu hostitelů jsou zastoupeny i fytofágní druhy z

řádů rovnokřídlí (Orthoptera), brouci (Coleoptera), larvy a kukly motýlů (Lepidoptera, např. zavíječ kukuřičný) a dvoukřídlého hmyzu. V současnosti jsou k dispozici i kmeny *B. bassiana* vysoce virulentní vůči některým druhům stejnokřídlého hmyzu (Homoptera). Nákazy vyvolané těmito houbami jsou označovány jako „bílé muskardiny“, protože infikovaný jedinec zpravidla porůstá hustým, bílým myceliem

Rod *Hirsutella* - *H. thompsonii*, akarifágní houba, která může vyvolávat primární nákazy v populacích některých druhů fytofágních roztočů, včetně svilušky chmelové *Tetranychus urticae* a vlnovníka *Phyllocoptruta oleivora*. Některé druhy patřící do rodu *Hirsutella* patří i mezi houby nematofágní, parazitující zejména na v půdě se vyskytujících sedentárních háďátcích (cystotvorná háďátka – *Heterodera*, *Globodera*, hálkotvorná háďátka - *Meloidogyne*).

Rod *Metarhizium* – druhy *M. anisopliae*, *M. flavoviridae*, široce polyfágní houby, které jsou převážně vázány na půdní hmyz (rovnokřídlí - *Orthoptera*, brouci - *Coleoptera* a dvoukřídlí - *Diptera*). Nákazy vyvolané těmito houbami jsou označovány jako „zelené muskardiny“, protože infikovaný jedinec porůstá hustým, tmavě zeleným myceliem. Tyto houby jsou kosmopolitně rozšířeny a zcela běžně se vyskytují v zemědělských i nezemědělských půdách i v celé oblasti mírného pásma.

Rod *Nomuraea* - *N. rileyi*, představuje poměrně úzce specializovaný druh patogena, který je svou parazitickou verzí vývoje vázán na larvy mnoha druhů motýlů. V USA byl vyvinut biopreparát na bázi *N. rileyi*, který je určen pro ochranu kukuřice (zavíječ kukuřičný), brukvovité zeleniny (bělásek zelný – *Pieris brassicae*, můra zelná – *Mamestra brassicae*, osenice rodu *Agrotis* a další), lesních dřevin (*Lymantria* spp.) a pro biologickou ochranu řady dalších hostitelských rostlin.

Rod *Paecilomyces* – druhy *P. fumosoroseus*, *P. farinosus*, *P. lilacinus*, *P. variotii*, 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 druhích háďátek (cystotvorná háďátka z rodů *Globodera*, *Heterodera*). K nejvýznamnějším zástupcům rodu *Paecilomyces* patří široce polyfágní *P. fumosoroseus*, vykazující nejen statut entomopatogenní a akarifágní houby, ale i prokazatelný mykoparazitismus. *P. fumosoroseus* se může vyvíjet jako ektoparazit na některých druhích rží (*Uromyces dianthi*) a na různých druhích padlí (*Sphaerotheca fuliginea*).

Rod *Verticillium* - druh *V. lecanii*, představuje široce polyfágní entomopatogenní druh, který je používán zejména v biologické ochraně proti savým polyfágním škůdcům zeleniny a okrasných květin pěstovaných ve sklenících a foliových krytech (např. třásněnky *Thrips tabaci* a *Frankliniella occidentalis*, mšice *Myzus persicae* a *Aphis gossypii* a molice *Trialeurodes vaporariorum* a *Bemisia tabaci*). *V. lecanii* se v přirozených podmínkách běžně vyskytuje i jako patogen v populacích různých druhů brouků, motýlů a dvoukřídlého hmyzu. Některé kmeny *V. lecanii* mohou parazitovat i na fytofágních roztočích (*Tetranychus* spp., *Phyllocoptruta* spp.).