



MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
ÚSTAV BOTANIKY A ZOOLOGIE



Entomopatogenní houby

Bakalářská práce
Radka Černochová

Vedoucí práce: Mgr. Pavel Dobeš, Ph.D.

Brno 2014

Bibliografický záznam

Autor: Radka Černochová
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita
Ústav botaniky a zoologie

Název práce: Entomopatogenní houby

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie a biologie se zaměřením na vzdělávání

Vedoucí práce: Mgr. Pavel Dobeš, Ph.D.

Akademický rok: 2013/2014

Počet stran: 39

Klíčová slova: Entomopatogenní houby; *Beauveria bassiana*; *Metarhizium anisopliae*; abiotické faktory; biotické faktory; činitelé biologické kontroly; biologická kontrola rostlin; PDA; BSM

Bibliographic Entry

Author Radka Černochová
Faculty of Science, Masaryk University
Department of Botany and Zoology

Title of Thesis: Entomopathogenic Fungi

Degree programme: Chemistry

Field of Study: Chemistry and Biology with a view to Education

Supervisor: Mgr. Pavel Dobeš, Ph.D.

Academic Year: 2013/2014

Number of Pages: 39

Keywords: Entomopathogenic fungi; *Beauveria bassiana*; *Metarhizium anisopliae*; abiotic factors; biotic factors; biological control agents; biological control of plant pathogens; PDA; BSM

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá entomopatogenními houbami. Obecný popis rozmnožování a působení těchto druhů hub na hostitelské organismy je rozveden u vybraných zástupců. S použitím současné odborné literatury je vysvětlen vliv vnějších faktorů na průběh jejich životního cyklu. Práce rovněž poukazuje na perspektivu praktického využití těchto organismů v biologické ochraně rostlin. Součástí je také popis a fotodokumentace kultivace entomopatogenních hub *Beauveria bassiana* a *Metarhizium anisopliae* a jejich využití k nákaze hmyzích druhů v laboratorních podmínkách.

Abstract

Bachelor thesis deals with entomopathogenic fungi. General description of the reproduction and interaction with host organisms is documented on selected species. The influence of external factors on life cycle is explained using current scientific literature. The thesis also shows the perspective on practical use of these organisms in biological plant protection. There are also descriptions and photographs of the cultivation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and their use for infection of selected organisms under laboratory conditions.



Vysoká škola: Masarykova univerzita

Pracoviště: Ústav botaniky a zoologie

Fakulta: Přírodovědecká

Akademický rok: 2013/2014



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Bakalářský studijní program: B-CH Chemie

Studijní obor: Biologie se zaměřením na vzdělávání

Student(ka): Radka Černochová

Vedoucí bakalářské práce Vám ve smyslu zákona vlády ČR č. 111/1998 Sb., čl. o státních závěrečných zkouškách a státních rigorózních zkouškách, určuje tuto bakalářskou práci:

Název tématu: Entomopatogenní houby

Název tématu anglicky: Entomopathogenic fungi

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Pavel Dobeš, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Pavel Hyršl, Ph.D.

Zásady pro vypracování

1. Z literárních zdrojů vybrat informace týkající se problematiky entomopatogenních hub. Zaměřit se na rozdíly mezi jednotlivými skupinami, mechanismus jejich působení, vhodné hmyzí hostitele apod. Obecný popis entomopatogenních hub bude doplněn konkrétními příklady jejich použití v biologické ochraně získaných ze současné odborné literatury.
2. Literární přehled je možno doplnit experimentální částí, ve které bude vyzkoušena nákaza modelových hmyzích organismů vybranými entomopatogenními houbami v laboratorních podmínkách.
3. Z elektronických zdrojů získat další informace o zpracovávané problematice a také obrazové podklady, které budou text bakalářské práce vhodně doplňovat.

Rozsah grafických prací:

Práce bude zpracována na PC, včetně grafické úpravy.

Rozsah průvodní zprávy:

Dvanácti bodové písmo, 20-30 stran včetně tabulek, obrázků a grafů.

Časový harmonogram řešení (postup):

1. Shromáždění dostupných literárních zdrojů s využitím elektronických databází PŘF MU (podzim 2013 a průběžně dále).
2. Sestavení osnovy práce s rozvržením kapitol (podzim 2013 – podmínka udělení zápočtu za zpracování bakalářské práce v podzimním semestru).
3. Vypracování vlastního textu práce formou literární rešerše (podzim 2013 – jaro 2013).
4. Dokončení a odevzdání práce (jaro 2013, konkrétní datum dáno harmonogramem akademického roku).

Doporučená literatura:

- literatura poskytnutá vedoucím práce
- Insect pathogens: molecular approaches and techniques, edited by S. Patricia Stock et al., CAB International 2009, ISBN 978-1-84593-478-1.
- The Ecology of Fungal Entomopathogens, edited by Helen Roy et al., Springer 2010, ISBN 978-90-481-3965-1.
- průběžně budou recetní vědecké práce vyhledávány studentkou v elektronických databázích dostupných pro PŘF MU

Datum zadání bakalářské práce: 26.6.2013

Termín odevzdání bakalářské práce: dle harmonogramu příslušného akademického roku

Vyjádření vedoucího oddělení:

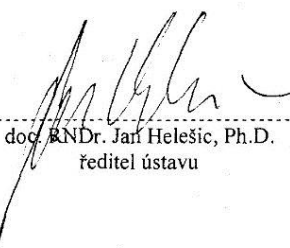
V Brně dne 26.6.2013



Radka Černochová
podpis studenta



Mgr. Pavel Dobeš, Ph.D.
podpis vedoucího bakalářské práce



doc. RNDr. Jan Helešic, Ph.D.
ředitel ústavu

MASARYKOVA UNIVERZITA
Přírodovědecká fakulta
4020 ÚSTAV BOTANIKY A ZOOLOGIE
611 37 Brno, Kotlářská 2

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat Mgr. Pavlu Dobešovi, Ph.D. za vstřícný přístup, ochotu, cenné rady i čas, který mi věnoval.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Petru Hroudovi, Ph.D. za upřesnění některých mykologických termínů i problematiky taxonomie hub a Ing. Štěpánce Radové, Ph.D. za objasnění současné situace biologické kontroly v České republice.

Děkuji také rodině a přátelům, kteří mi byli velkou oporou po celou dobu studia.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které v práci cituji.

Souhlasím s uložením této bakalářské práce v knihovně Ústavu botaniky a zoologie PřF MU v Brně a s jejím veřejným půjčováním.

Brno 25. dubna 2014

.....

Jméno Příjmení

OBSAH

1. ÚVOD.....	9
2. ŽIVOTNÍ CYKLUS ENTOMOPATOGENNÍCH HUB A JEJICH VLIV NA HOSTITELE.....	11
2.1 Napadení hostitele entomopatogenními houbami	11
2.2 Působení EPF na hostitelský organismus	13
3. TAXONOMIE A CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH EPF	15
3.1 Zařazení EPF do systému hub.....	15
3.2 Entomopatogenní Hypocreales a jejich vybraní zástupci	16
3.2.1 <i>Beauveria bassiana</i>	16
3.2.2 <i>Metarhizium anisopliae</i>	18
3.2.3 <i>Verticillium lecanii</i>	19
4. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ EPF	21
4.1 Abiotické faktory	21
4.1.1 Sluneční záření.....	21
4.1.2 Vzdušná vlhkost a dešťové srážky.....	22
4.1.3 Teplota.....	22
4.1.4 Půda.....	22
4.1.5 Pesticidy	23
4.2 Biotické faktory.....	23
4.2.1 Hostitel a jeho populace	23
4.2.2 Interakce s dalšími organismy	25
5. VYUŽITÍ EPF V BIOLOGICKÉ KONTROLE ROSTLIN.....	26
5.1 Vývoj biologické kontroly.....	26
5.2 Principy a metody	27
5.2.1 Metoda inokulativní introdukce.....	28
5.2.2 Metoda augmentativní introdukce	28
5.3 Právní předpisy	28
5.4 Komerční přípravky	28
6. KULTIVACE VYBRANÝCH ZÁSTUPCŮ EPF V LABORATORNÍCH PODMÍNKÁCH.....	30
6.1 Cíle.....	30
6.2 Kultivačních média	30
6.3 Růst vybraných EPF na médiích.....	31
6.4 Nákaza modelových organismů houbou <i>Beauveria bassiana</i>	32
6.5 Diskuse	34
7. ZÁVĚR.....	35
8. INFORMAČNÍ ZDROJE	36

1. ÚVOD

Entomopatogenní houby (dále jen EPF podle obecně užívaného anglického označení „*entomopathogenic fungi*”) jsou organismy schopné vyvolat infekční onemocnění u hmyzu.

Díky velmi propracovaným mechanismům působení na hostitelský organismus a účinným adaptacím, mezi které patří hlavně např. produkce velkého množství toxických látek, jsou tyto houby ve většině případů schopny způsobit smrt svého hostitele. Ve srovnání s jinými entomopatogenními organismy mají EPF široký hostitelský okruh a navíc dokáží napadat všechna vývojová stádia hmyzu. Hostiteli jsou nejčastěji hmyzí druhy z řádu stejnokřídlých (Homoptera), blanokřídlých (Hymenoptera), dvoukřídlých (Diptera) a také brouci (Coleoptera) a motýli (Lepidoptera) (Srivastava et al. 2009).

Patogenní působení a schopnost přežívání EPF je založeno na různých strategiích. Mezi jejich zástupci nalezneme jak obligátní, tak fakultativní parazity. Absence pohlavního rozmnožování umožňuje velmi rychlý průběh nepohlavních rozmnožovacích cyklů a produkci značného množství jedinců. Celý životní cyklus EPF však ovlivňuje řada abiotických i biotických faktorů, které se často stávají pro tyto organismy limitujícími.

Se skupinami entomopatogenních organismů je spojován termín biologická kontrola rostlin. Ta v sobě zahrnuje strategie využívající živé organismy k potlačení hmyzích škůdců, plevelů a chorob rostlin (Knudsen 2013). Při aplikacích přípravků biologické kontroly na bázi EPF se využívá infekčního potenciálu houbových konidií či blastokonidií přítomných v daném přípravku k rozvoji onemocnění u určitého hmyzího druhu. Očekávaným výsledkem je poté ochrana před napadením a zničením zemědělských plodin, lesních porostů i okrasných rostlin v důsledku potlačení celých populací daného hmyzího škůdce.

V následujících kapitolách této bakalářské práce nejprve obecně popisují způsob života těchto hub a také nejvýznamnější způsoby jejich negativního působení na hmyzí hostitele. V další části se pak zaměřují přímo na několik konkrétních zástupců EPF a jejich působení. Velkou pozornost věnují faktorům, které komplexně a značnou měrou EPF ovlivňují. Také se snažím poukázat na využití těchto organismů v biologické kontrole rostlin.

V experimentální části této práce jsem se věnovala dvěma vybraným zástupcům EPF, *Beauveria bassiana* a *Metarhizium anisopliae*, a jejich kultivaci v laboratorních

podmínkách. Mým cílem bylo vyzkoušet kultivaci těchto hub na vybraných obecně dostupných médiích a jejich následnou využitelnost k nákaze laboratorně chovaných zástupců hmyzu. Svá pozorování popisuji a dokládám fotodokumentací v závěrečné části této práce.

2. ŽIVOTNÍ CYKLUS ENTOMOPATOGENNÍCH HUB A JEJICH VLIV NA HOSTITELE

Nepohlavní rozmnožování dominuje u většiny hub včetně EPF. Tento typ rozmnožování není provázen střídáním jaderných fází. Z tohoto důvodu může probíhat na haploidním i dikaryotickém myceliu i několikrát během vegetační sezóny a výsledkem je poté velké množství nových jedinců. Nepohlavně se může houba rozmnožovat dělením svých buněk nebo prostou fragmentací houbových vláken (hyf), přičemž dochází k tvorbě nepohlavních spor.

Tvorba spor probíhá u EPF exogenně na hyfách. Na některých specializovaných hyfách nazývaných konidiofory se vytvářejí tzv. konidiogenní buňky, které dávají vznik sporám zvaným konidie či konidiospory. Celý proces tvorby spor se pak označuje jako konidiogeneze.

Obecně se rozlišují dva základní typy vzniku konidií (Kalina a Váňa 2005). Konidie vznikající z buněk hyf se označují jako thalokonidie nebo artrokonidie (zkráceně konidie). Hyfa se nejčastěji rozdělí přehrádkami a rozpadne se na jednobuněčné části. Takto vytvořené nepohlavní spory se mohou po uvolnění z hyfy zvětšovat či dodatečně měnit svůj tvar. Druhým typem jsou blastokonidie, které vznikají vypučením z konidiogenní buňky. Tyto útvary dorůstají do konečné velikosti ještě před uvolněním z mateřské konidiogenní buňky.

Evolučně potřebná genetická proměnlivost nových jedinců je většinou zprostředkována pohlavním rozmnožováním, které však u EPF chybí. U zástupců pomocného oddělení Deuteromycota tuto funkci nahrazuje parasexualita. Během parasexuálního cyklu neprobíhá genetická rekombinace pomocí meiózy a nevyváří se pohlavní stádium, ale může docházet k plazmogamii, karyogamii i haploidizaci (Kalina a Váňa 2005).

2.1 Napadení hostitele entomopatogenními houbami

Většina EPF napadá svého hostitele přímo přes vnější kostru (exoskelet) nebo pokožku prostřednictvím asexuálních nepohlavních výtrusů nazývaných konidie. Pozření těchto infekčních výtrusů tedy není nezbytným předpokladem pro zahájení infekce a díky této skutečnosti mohou být napadána všechna vývojová stádia hmyzu včetně nekrmových forem, jako jsou vajíčka nebo kukly (Srivastava et al. 2009). Dalšími místy vstupu houbové infekce mohou být dýchací otvory či řitní otvor (Landa 2009).

Jelikož nejčastější cesta EPF do hostitele vede přes jeho kutikulu nebo přímo přes pokožku, je pro zahájení celého infekčního procesu důležitá přilnavost infekčních konidií k povrchu těla hmyzu. Zprostředkovávají ji hydrofobní interakce mezi sporami a povrchovými proteiny a lipidy kutikuly (Schrank a Vainstein 2010). Enzymy na povrchu konidií některých hub, které způsobují degradaci ať už pokožky či kutikuly, také značně podporují přichycení spor na hostiteli (Srivastava et al. 2009).

Exoskelet hmyzu se skládá ze tří vrstev – epikutikuly, prokutikuly a epidermis. Epikutikula je vnější část, jejíž hlavními funkcemi jsou zadržování vody a ochrana před cizorodými látkami. Prokutikula leží pod epikutikulou a v některých částech těla je tak silná, že ji můžeme dále rozdělit na vnější exokutikulu a vnitřní endokutikulu. Jednotlivé vrstvy prokutikuly jsou tvořeny vůči sobě různě umístěnými lamelami chitinu. Toto uspořádání kutikuly tak vytváří velmi účinnou ochrannou bariéru před vnějšími vlivy a její hlavní složky – chitin, proteiny a lipidy znesnadňují průnik EPF do daného organismu (Meyer 2006). Houby však dokáží produkovat chemické látky, které tento ochranný pancíř degradují. Exoskelet navíc tvoří jednu kompaktní strukturu, ale dělí se na několik segmentů. Spojení mezi jednotlivými segmenty pak tvoří nejčastější místa invaze patogenů včetně EPF do těl hostitelů (Srivastava et al. 2009).

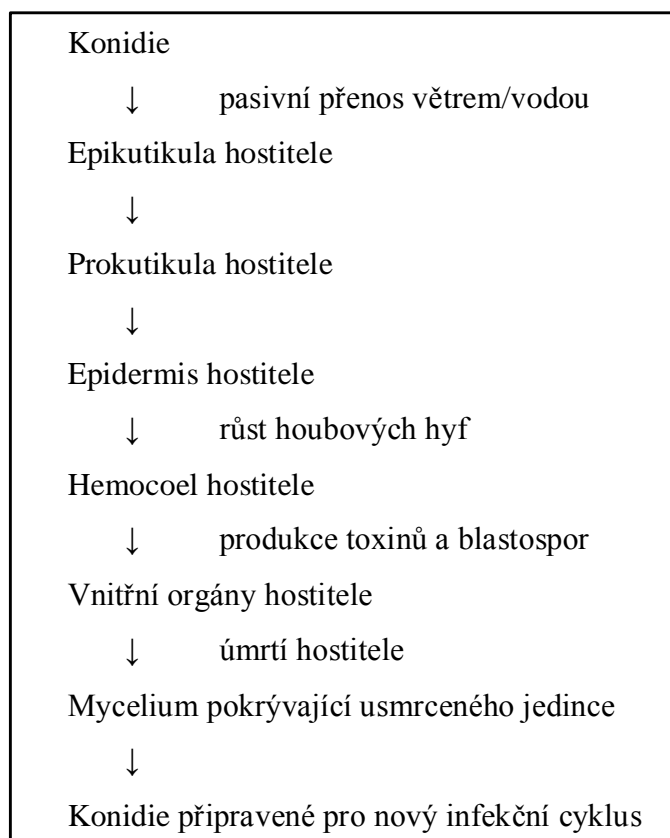
Většina konidií EPF je dostatečně energeticky vybavena k vyklíčení (Landa 2009). Za vhodných podmínek začínají konidie bobtnat, dochází k přestavbě jejich buněčné stěny a vytváří se primární klíček. Z klíčků vyrůstají hyfy, které díky mechanickému tlaku pronikají skrz degradovanou kutikulu do těla hostitele.

Po dosažení hemocoelu (tělní dutiny) houba dále velmi masivně proliferuje. Vytvořené jednoduché či větvené primární hyfy vytvářejí podhoubí (mycelium), které zaplňuje celou tělní dutinu infikovaného organismu (Molnár et al. 2010). U většiny vláknitých EPF později dochází v hemolymfě hmyzího hostitele k tvorbě druhého typu nepohlavních výtrusů – blastokonidií (Hall 1979).

Celý proces invaze a patogenního působení až do smrti hostitele je otázkou 3 – 14 dní (Srivastava et al. 2009). Hostitel umírá v důsledku kombinace několika patogenních faktorů, mezi něž patří hlavně toxicita látek vyprodukovaných houbami, narušení vnitřních orgánů invazními houbovými hyfami a vyčerpání živin v důsledku parazitického působení EPF.

Po smrti hostitele a za příhodných podmínek pronikají hyfy vznikající klíčením blastospor na povrch těla mrtvého jedince. Houba přechází do saprotrofní fáze a živiny přijímané z mrtvého hostitele využívá k tvorbě sekundárních vzdušných hyf (Srivastava

et al. 2009). Na těchto hyfách se později opět vytvářejí konidiogenezi infekční konidie schopné invaze. V tomto případě může být nakažen nový hostitel a začíná nový infekční cyklus. Průběh infekčního cyklu ukazuje obr. 1.



Obrázek 1: Typický životní cyklus většiny EPF (Srivastava et al. 2009)

V důsledku potřeby dlouhodobějšího uchování infekčního potenciálu EPF se vytvářejí struktury schopné přežít po určitou dobu ve vnějším prostředí (Molnár et al. 2010). Tyto struktury se obecně označují jako infekční propagule. Může se jednat o silnostěnné konidie nebo odolné části mycelia přežívající na mrtvém hostiteli i na jiných substrátech. Z dlouhodobého hlediska je důležité přežívání těchto propagulí v půdě, kde mohou vyčkávat na vnímavého hostitele či dokonce přečkávat celé zimní období (St. Leger 2008).

2.2 Působení EPF na hostitelský organismus

Z hlediska míry využití hostitelského organismu můžeme EPF rozdělit do dvou skupin. Jako oportunní hemibiotrofní druhy se označují zástupci, kteří se vyznačují jak parazitární fází v živém hostiteli, tak později i saprofytickou fází na mrtvém hostitelském organismu. Mezi zástupce této skupiny patří například druhy *Metarhizium anisopliae* či *Beauveria bassiana*. EPF s touto životní strategií produkují velké množství toxických

látek, aby překonaly obranné imunitní mechanismy hostitele (Srivastava et al. 2009). Druhá skupina EPF jen minimálně nebo případně vůbec nevyužívá již mrtvého hostitele ke své saprotrofní výživě. Tito biotrofové pak usmrcují hostitele převážně masivní kolonizací jeho tělní dutiny pomocí velkého množství hyf a působení mykotoxinů je až vedlejší (Srivastava et al. 2009).

Prvotní rozvoj patogeneze vyžaduje sekreci hydrolytických enzymů (proteáz, amyláz, chitináz a lipáz) k degradaci hmyzí kutikuly. Tyto látky se podílejí na hydrolyze esterových vazeb tuků a vosků v hmyzí kutikule, přičemž tímto procesem uvolněné mastné kyseliny následně přispívají k lepší přilnavosti spor k hostiteli (Hasan et al. 2013).

Uvnitř těla hostitele pak houba vytváří mykotoxiny. Produkce těchto nízkomolekulárních látek je geneticky podmíněným procesem, ovšem reálná produkce může být značně ovlivněna podmínkami jako teplota, dostupnost živin, pH, apod. (Roberts et al. 1992). Tyto insekticidní sekundární metabolity hub pak velmi rozlišně působí na hostitelský organismus.

Mezi dosud známé mykotoxiny patří např. efrapeptiny. Jedná se o skupinu peptidů s antibiotickými účinky, které inhibují oxidativní fosforylaci v mitochondriích i činnost ATP-ázy. Další skupinou jsou destruxiny. Tyto cyklohexadepsipeptidy původně izolované z EPF *Metarhizium anisopliae* mají poměrně široké insekticidní působení. Některé například mohou ovlivňovat iontové kanály pro vápník ve svalech hmyzu. Jako konkrétní příklady mykotoxinů lze uvést beauvericin či bassianolid. Beauvericin je cyklický mykotoxin, jehož toxicita spočívá ve vytváření komplexů s dvojmocnými kationty, čímž dochází k blokaci jejich původní funkce v organismu. Bassianolid je toxický metabolit izolovaný z druhů *Beauveria bassiana* a *Verticilium lecanii*. Tato látka díky konformaci své molekuly může na svou hydrofilní vnitřní část také navazovat různé anorganické kationty. (Roberts et al. 1992)

Produkce těchto látek může dále způsobovat rozklad vnitřních orgánů v důsledku porušení buněčných membrán nebo jejich antagonistické působení k syntéze inhibičního neurotransmiteru glycinu v nervovém systému může vést až k vážnému svalovému třesu nebo hmyz pod vlivem mykotoxinů přestává přijímat potravu (Srivastava et al. 2009).

Mechanismy působení jednotlivých sekundárních metabolitů jsou složité a mnohdy ani nejsou přesně známy. Otázkou také často zůstává, jakým způsobem houby chrání vlastní buňky před působením těchto látek. Produkce mykotoxinů však umožňuje entomopatogenním houbám velmi účinně bojovat proti svým hostitelům i konkurenčním organismům.

3. TAXONOMIE A CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH EPF

3.1 Zařazení EPF do systému hub

Říše Fungi (houby) je skupina zahrnující jednobuněčné i mnohobuněčné eukaryotní organismy rozmnožující se pohlavní či nepohlavní cestou. V posledních desetiletích prošel systém tohoto taxonu značnými proměnami.

Přirozený systém klasifikující pohlavně se rozmnožující (teleomorfní) houby se snaží o dodržování fylogenetických vztahů. Existují však druhy hub, mezi něž patří i většina EPF, u kterých jsou známy pouze nepohlavní (anamorfní, imperfektní) stádia a právě u těchto zástupců nastává problém s jejich zařazením do systému. Z tohoto důvodu bylo v minulosti vytvořeno několik pomocných taxonů, které sdružují jedince podle podobnosti morfologických charakteristik. Snahou moderní systematiky je zařadit anamorfy k nejbližším teleomorfám v souladu s fylogenezí. Z tohoto hlediska jsou poté EPF zastoupeny v třídách a řádech různých houbových kmenů, jak ukazuje tabulka.

Kmen	Třída	Řád	Příklady entomopatogenních druhů
Ascomycota	Hemiascomycetes	Endomycetales	<i>Blastodendrium psedococci</i>
	Laboulbeniomycetes	Laboulbeniales	<i>Hesperomyces virescens</i> <i>Trenomycetes histophthorus</i>
	Loculoascomycetes	Pleosporeales	<i>Podonectria coccicola</i>
	Plectomycetes	Ascospherales	<i>Ascophaera apis</i>
	Pyrenomycetes	Sphaeriales	<i>Cordycepioideus bisporus</i> <i>Cordyceps aphodii</i>
	Coelomycetes		<i>Aspergillus flavus</i>
	Hyphomycetes		<i>Beauveria bassiana</i> <i>Metarhizium anisopliae</i> <i>Verticillium lecanii</i> <i>Isaria fumosorosea</i>
Basidiomycota	Phragmobasidiomycetes	Septobasidiales	<i>Septobasidium clelandii</i>
Chytridiomycota	Chytridiomycetes	Chytridiales	<i>Myiophagus ucrainicus</i>
		Blastocladales	<i>Coelomycidium simuli</i>
Oomycota	Oomycetes	Lagenidiales	<i>Lagenidium giganteum</i>
		Saprolegniales	<i>Leptolegnia chapmanii</i>
Zygomycota	Trichomycetes	Harpellales	<i>Legeriomyces sp.</i>
		Eccrinales	<i>Taeniella carani</i>
		Assellariales	<i>Asellaria aselli</i>
		Amoebidiales	<i>Amoebidium parasiticus</i>
	Zygomycetes	Entomophthorales	<i>Conidiobolus coronatus</i>
		Mucorales	<i>Sporodiniella umbellata</i>

Tabulka 1: Hlavní houbové taxony a příklady jejich entomopatogenních zástupců (Srivastava et al. 2009)

U většiny EPF tedy dosud nebylo pozorováno pohlavní rozmnožování. Na základě tohoto kritéria jsou téměř všechny jejich druhy řazeny do uměle vytvořeného pomocného oddělení Fungi imperfecti (houby nedokonalé), též nazývaného Deuteromycota. V rámci biologické kontroly rostlin jsou pak nejvíce využívány houby z řádu Hypocreales (Hajek a Delalibera Jr. 2010).

3.2 Entomopatogenní Hypocreales a jejich vybraní zástupci

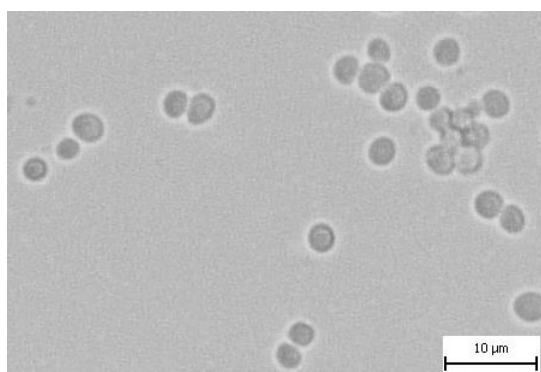
Do řádu Hypocreales náleží největší množství insekticidních houbových druhů. Tyto druhy jsou běžnou součástí půdní mikroflóry. Typickými znaky hypocreoidních entomopatogenních hub je široký okruh hostitelů a tvorba velkého množství sekundárních metabolitů (Molnár et al. 2010).

Na jednoduchých či větvených hyfách se vytváří buňky konidiofory, na kterých dochází ke konidiogenezi a tvorbě nepohlavních spor – konidií. Tvorbou přehrádkovaných hyf s jednoduchými póry v přepážkách a vrstevnatou hyfální stěnou vykazují příbuznost s houbovým kmenem Ascomycota.

3.2.1 *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin 1912 patří mezi anamorfní zástupce čeledi Cordycipitaceae (Kirk 2014a). Jedná se o houbu rostoucí přirozeně v půdách po celém světě (Kos a Celar 2013).

Kulovité až elipsoidní spory velikosti 2,5 – 3,5 μm (obr. 2) jsou bíle zbarveny (IRRI 2009a).



Obrázek 2: Spory *Beauveria bassiana*

Spory se vytvářejí na konidiogenních buňkách, které se větví sympodiálně – sounoží (obr. 3, Barron 2001). Po dosažení vhodné délky mateřské konidiogenní buňky se zastavuje její růst a na jejím vrcholu (apexu) se začíná vytvářet konidiospora. Následný růst mateřské buňky poté nastává z místa ležícího právě pod vzniklou konidií. Jedná se

tedy o akropetální tvorbu nepohlavních spor, kdy nejmladší sporu nalezneme na samém konci konidiogenní buňky.



Obrázek 3: Sympodiální větvení konidiogenních buněk houby *Beauveria bassiana* (Barron 2013b)

Z uvolněných konidií vyrůstají houbové hyfy produkující enzymy, které nejčastěji napadají a narušují pokožku či kutikulu hostitelského organismu. Po průniku houbových hyf do těla hostitele EPF začíná vytvářet enzym neutrální trehalázu (Liu et al. 2011), který přeměňuje disacharid trehalózu z hemolymfy hmyzu na monosacharid glukózu. Houba pak využívá glukózu ke své výživě a zároveň snižuje dostupnost tohoto cukru pro hostitele, čímž jej značně energeticky vyčerpává. Dále se začíná uvolňovat mykotoxin beauvericin (Mahr 1997). Tato látka způsobuje oslabení imunitního systému a následnou smrt napadeného jedince.

Po smrti hostitele houba začíná produkovat antibiotikum oosporein, které jí umožňuje konkurovat střevním bakteriím uvnitř těla mrtvého jedince (Mahr 1997). Mycelium se poté rozrůstá a zaplňuje celou tělní dutinu. Při příznivých podmínkách prorůstají hyfy měkčími částmi těla na povrch mrtvého jedince a vytváří se pro tento druh typické bílé mycelium. Nákaza vyvolaná tímto druhem se proto nazývá bílá muskardina (obr. 4).



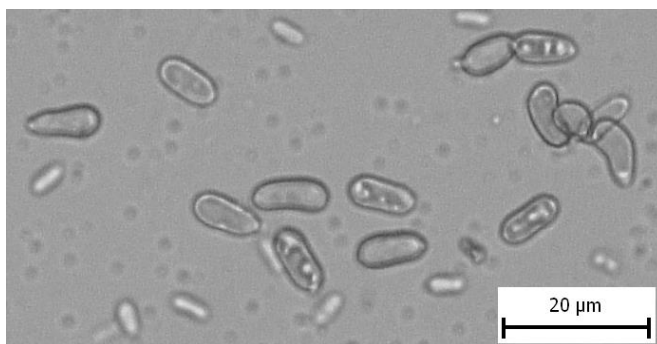
Obrázek 4: Cikáda pokrytá bílým myceliem EPF *B. bassiana* (Barron 2013a)

Na rozsáhlém seznamu hostitelů *B. bassiana* nalezneme například mandelinku bramborovou, molice, mšice, kobylky, kůrovce a další hospodářsky významné škůdce. Kromě toho je *B. bassiana* schopna žít jako endofyt v cévních tkáních některých odrůd kukuřice (Mahr 1997). Tato houba napadá všechna vývojová stádia širokého spektra hmyzích druhů. Řadí se tak mezi generalisty a je hojně využívána v biologické kontrole rostlin.

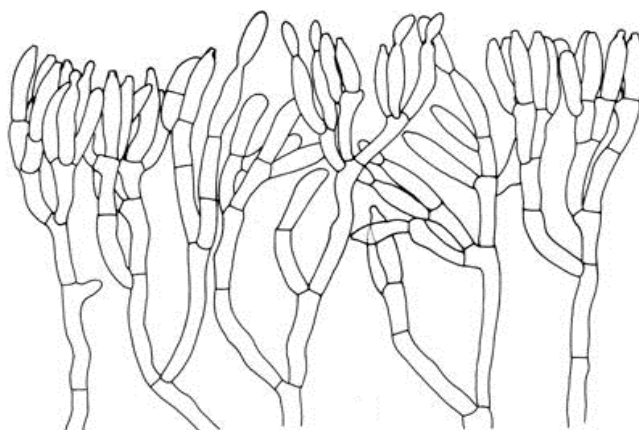
3.2.2 *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium anisopliae (Metchnikoff) Sorokin 1883 je anamorfní houbou patřící také do čeledi Cordycipitaceae (Kirk 2014b). Přednostně kolonizuje rhizosféru. Napadá larvální stádia i dospělé mnoha druhů brouků, dále například kobylky, krtonožky, housenky motýlů, mravence a také klíšťata (St. Leger 2008).

Na myceliu se vytvářejí rozvětvené konidiogenní buňky (obr. 6; TNAU 2013a), přičemž na každé větvi se vytváří dlouhý řetězec konidií. Nejmladší konidie se nacházejí v přímém sousedství konidioforů, nejstarší se uvolňují z konců jednotlivých řetězců. Konidie jsou zelené, více než 9 μm dlouhé, cylindrické se zúženou centrální částí (obr. 5). K novým hostitelům se šíří nejčastěji větrem nebo vodou (IRRI 2009b).



Obrázek 5: Spory *Metarhizium anisopliae*



Obrázek 6: Schématický nákres konidioforů *Metarhizium anisopliae* (Tzean a Hsieh 1997)

V hemolymfě hostitelského organismu *Metarhizium* vylučuje podobně jako *Beauveria* enzym katalyzující přeměnu trehalózy na glukózu. Nyní se však jedná o kyselou trehalázu (Schränk a Vainstein 2010). Nejvíce produkovanými toxiny tohoto druhu jsou destruxiny, zejména destruxin A, E a D, které jsou značně insekticidní (Schränk a Vainstein 2010). Způsobují oslabení imunitního systému hostitele, poškození svalů a Malpighiho trubic hmyzu.

Po úmrtí hostitele prorůstají bílé hyfy na povrch jeho těla. Po určité době dochází ke změně zbarvení mycelia na tmavě zelenou v důsledku vznikajících spor (IRRI 2009b). Proto se nákaza tímto druhem popisuje jako zelená muskardina (obr. 7).



Obrázek 7: Kobylka usmrčená *Metarhizium anisopliae* (Xia a Wang 2010)

3.2.3 *Verticillium lecanii*

Verticillium lecanii (Zimmermann) Zare et W. Gams 1939, anamorfní *Cordycipitaceae* (Kirk 2014c), je druh upřednostňující tropické a subtropické klima.

Na vysokých a vzprímených konidioforech se vytvářejí buď jednotlivě nebo v přeslenech specializované konidiogenní buňky – fialidy. Oválné až válcovité konidie velikosti 2 – 6 μm se poté vytváří na špičkách fialid (Tzean a Chen 1997).

Během svého vývoje tato houba produkuje toxin bassianolid a další insekticidní látky, kterými usmrcuje svého hostitele (Cloyd 1999). Podobně jako *B. bassiana* i tento druh svého mrtvého hostitele pokrývá bílým prašným myceliem.

V závislosti na kmenu tohoto druhu se značně liší hostitelská specificita. Kmeny *Verticillium lecanii* s malými spory infikují převážně mšice, zatímco kmeny s velkými spory způsobují nákazu především u molíc (Cloyd 1999).

4. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ EPF

Šíření infekčních propagulí v prostředí i vývojový cyklus EPF ovlivňuje celá řada faktorů. Na schopnost přežívání a působení hub na organismy v epigeickém prostředí mají vliv především faktory jako sluneční záření, teplota, vlhkost i složení vzduchu a rezidua pesticidů v prostředí. Zástupce obývající půdní prostředí také velmi ovlivňuje vlhkost a teplota půdy. Neméně důležitá je textura půdy či působení biotických faktorů.

4.1 Abiotické faktory

4.1.1 Sluneční záření

Spory i hyfy houbového mycelia jsou struktury citlivé na působení slunečního záření. Za hlavní příčinu zničení houbových propagulí v epigeickém prostředí jsou považovány UVA a UVB záření. Tyto složky slunečního záření jsou tedy zodpovědné za krátkou perzistenci v tomto prostředí. Poločas života houbové propagule (doba, za kterou koncentrace propagulí klesne na polovinu původního množství) uchycené na rostlině přímo v polních experimentech je obecně 3–4 hodiny (Jaronski 2010). Byly však pozorovány propagule s poločasem života dokonce až šest dní. Kromě zvýšené úmrtnosti houbových spor způsobuje přímé sluneční ozáření i zpomalení jejich klíčení. Důležitým aspektem je také umístění spor na substrátu. Například spory vyskytující se na zastíněné abaxiální straně listu přežívají delší dobu ve srovnání se sporami vyskytujícími se na záření plně vystavené adaxiální straně listu (Jaronski 2010).

Rozdíly v toleranci k intenzitě slunečního záření jsou značné u druhů a dokonce i jednotlivých kmenů jednoho druhu. Například druhy *Beauveria bassiana*, *Metarhizium acridium* a *Metarhizium anisopliae* jeví značnou odolnost proti UV záření v porovnání s velmi citlivým druhem *Isaria fumosorosea* (Jaronski 2010).

Pigmentace spor značnou měrou ovlivňuje jejich citlivost k UV záření. Braga a kol. (2006) zkoumali tento jev u přirozeně zbarvených a barevně modifikovaných konidií *Metarhizium anisopliae*. Oproti klasickým, tmavě zeleným konidiím byly mutantní barevné fenotypy konidií k poškození v důsledku záření mnohem náchylnější.

Fotosenzitivita EPF využívaných v biokontrolě byla uznána jako hlavní faktor odpovědný za snížení jejich účinnosti v polních testech (Cohen a kol. 2001).

4.1.2 Vzdušná vlhkost a dešťové srážky

Vysoká vzdušná vlhkost je pro EPF nezbytná a je považována za jeden z jejich limitujících environmentálních faktorů. Nejméně 90% relativní vzdušná vlhkost je potřebná ke sporulaci (tvorbě nových spor), klíčení i k invazi do hostitele (Sharififar et al. 2012). Průběh infekce uvnitř tělní dutiny již však není na vlhkosti okolního prostředí závislý (Jaronski 2010).

Děšť následující v krátkém časovém intervalu po aplikaci houbových propagulí na listy může mít katastrofální dopad na účinnost EPF v případě, že hostitelé obývají epigeické prostředí. V rámci biologické kontroly se problém nežádoucího smývání propagulí z nadzemních částí rostlin překonává pomocí preparátů založených na olejové bázi (Jaronski 2010). Smývání spor na zemský povrch v důsledku srážek a jejich následné odplavení do půdy však nemusí mít tak negativní účinky, pokud jsou cíloví jedinci zástupci hypogeických druhů.

4.1.3 Teplota

Většina EPF toleruje teplotu okolí v rozmezí 0–40 °C, nicméně teplotní optima pro infekci, růst mycelia a tvorbu spor bývají omezenější (Cabanillas a Jones 2009).

Obecně se teploty vhodné pro optimální klíčení a růst většiny EPF pohybují v rozmezí 23–28 °C. Snížení teplot pod 16 °C zpomaluje klíčivost i růst. Při teplotách nad 30 °C dochází rovněž ke zpomalení klíčení spor i růstu houbových hyf.

Po dosažení teplot 34–37 °C se růst již téměř zastavuje. Některé druhy EPF jsou však schopné přežít teploty vyšší než 35 °C. Tento fakt vyvolává obavy z jejich možné patogenity pro teplokrevné obratlovce (Jaronski 2010).

U jednotlivých druhů nalézáme značné rozdíly v teplotní toleranci. Například houba *Isaria fumosorosea* velmi dobře snáší teploty okolo 30 °C (Cabanillas a Jones 2009), kdežto pro druh *Beauveria bassiana* je optimální teplota 25 °C (Ying a Feng 2011).

Z fyziologického hlediska termoregulace úzce souvisí s produkcí skupiny proteinů teplotního šoku (Kim et al. 2011). Některé z těchto proteinů pak působí jako chaperony při ochraně vlastních proteinů houby před denaturací způsobenou vyššími teplotami (Ying a Feng 2011).

4.1.4 Půda

V důsledku složitosti a komplexnosti půdního prostředí je obtížné hodnotit půdní faktory jednotlivě a je nutné pohlížet na půdu jako na celek (Meyling a Eilenberg 2007).

Textura, teplota a vlhkost půdy jsou primární abiotické faktory ovlivňující EPF v tomto prostředí. Další fyzikální faktory jako pH půdy, kationtová výměnná kapacita či výskyt anorganických solí nemají zásadní význam (Jaronski 2010).

Jednotlivé druhy a dokonce i kmeny vykazují různá teplotní optima pro svůj růst v půdním prostředí (Meyling a Eilenberg 2007). Nízké půdní teploty zpomalují klíčení i růst houby stejně jako v epigeickém prostředí (Jaronski 2010). Z tohoto důvodu se rozšíření jednotlivých druhů EPF liší v závislosti na zeměpisné poloze.

V závislosti na textuře a zhutnění půdy se vytváří síť půdních pórů, která ovlivňuje nejen distribuci spor, ale také velikost a schopnost pohybu cílových jedinců hmyzu v tomto prostředí. Písčité prostředí či trhliny v suché půdě umožňují rozšíření spor do větších lokalit díky snadnému průniku suspenze spor ve vodě. V jílovitých půdách je distribuce již obtížnější (Jaronski 2010). V závislosti na výše popsaných attributech se tedy liší míra infekčnosti. V kyprých, neudusaných půdách lze proto předpokládat lepší podmínky pro šíření EPF.

4.1.5 Pesticidy

Chemické sloučeniny jsou nejúčinnější nástroje pro regulaci populací škůdců zemědělských plodin, ovšem jejich bezhlavé využívání může vážně narušovat agroekosystémy. Nicméně současné využití určitých biologických kontrolních činitelů v kombinaci s některými chemickými sloučeninami může vést k lepším výsledkům v boji proti škůdcům (Golshan a kol. 2013).

Inhibiční účinky pesticidů na EPF se liší u jednotlivých kmenů. Nejdůležitějším aspektem při posuzování možného společného využití pesticidu a EPF je vliv chemikálie na klíčení houbových spor. Golshan a kol. (2013) na základě výzkumu vlivu pesticidů na druh *Beauveria bassiana* ukázali, že fungicidy a insekticidy mají značný negativní vliv na klíčivost spor EPF. Naopak jako nejméně negativní se prokázaly herbicidy a lze tudíž uvažovat o jejich společném využití s EPF v rámci integrované ochrany rostlin.

4.2 Biotické faktory

4.2.1 Hostitel a jeho populace

Podle rozmanitosti hostitelských taxonů můžeme rozdělit EPF na specialisty a generalisty (Brodeur 2012). Generalistické druhy jsou schopny napadat široké spektrum hostitelských organismů a dokáží se rozdílným druhům částečně přizpůsobovat. Naopak specializované druhy napadají většinou jen konkrétní druh hmyzího škůdce.

Reakce hmyzu na houbové patogeny mají přímý vliv na účinnost hub jako činitelů biologické kontroly. Obzvláště dva procesy jsou významné v interakci mezi hmyzem a entomopatogenní houbou, a to dovednost hostitele rozpoznat houbový patogen a schopnost uniknout mu. Dále pak hraje důležitou úlohu možnost přenosu patogenu v populaci hostitelského hmyzu. Šíření patogenu v populaci může probíhat v rámci jednoho druhu buď horizontálně (v jedné generaci) nebo vertikálně (mezi dvěma generacemi). Infekce se může přenášet také navzájem mezi druhy (Baverstock et al. 2010).

Dovednost hmyzu detekovat EPF v prostředí se liší v závislosti na druhu hmyzu i na substrátu, ve kterém je houba uložena. Většina hmyzu však není vůbec schopna rozpoznat houbový patogen ve svém okolí. Pokud však k detekci dochází, hostitel většinou nevnímá houbu jako hrozbu a nevykazuje žádné změny ve svém přirozeném chování (Baverstock et al. 2010). Výjimku potvrzující toto pravidlo tvoří například slunéčko sedmítečné *Coccinella septempunctata*. Dospělí jedinci tohoto druhu se záměrně vyhýbají kontaktu s podklady infikovanými spory houby *B. bassiana* (Baverstock et al. 2010; Ormond et al. 2011).

Ač většina EPF proniká do těla svého hostitele nejčastěji přes kutikulu, existují i jiné infekční cesty. Jednou z dalších možností je například požití spolu s potravou. V rámci biologické kontroly lze tuto skutečnost využít. K snadnému infikování populace škůdce může napomoci tvorba směsí celulózy s konidii EPF tvořících lákavou potravu hmyzích škůdců (Baverstock et al. 2010). Vývoj těchto dobře stravitelných návnad se zdá být klíčem ke zvýšení účinnosti EPF.

Imunitní systém hmyzu je další částí obrany škůdců, který musí EPF překonávat. U hub se vyvinuly dvě hlavní strategie pro překonání imunitní odpovědi hostitele. První z nich je tvorba imunomodulačních látek, které potlačují imunitu hmyzu. Druhou je potom tvorba kryptických perzistentních forem, které imunitní systém hostitele nedokáže vůbec rozpoznat (Schrank a Vainstein 2010).

Některé druhy hmyzu (kobyly, švábi, moucha domácí) prokazují schopnost aktivní termoregulace. V důsledku absorpce tepla ze slunečního záření i z okolního substrátu dokáží udržovat své tělo na teplotě o několik stupňů vyšší než je teplota okolí. Tento jev se označuje jako tzv. behaviorální horečka (z anglického „*behavioral fever*“). Zvýšená teplota je již pro infekční propagule limitující. V důsledku tohoto chování může právě nakažený jedinec cíleně způsobit zničení propagulí. Po snížení teploty je hmyz k nákaze opět náchylný (Jaronski 2010).

Důležitým faktorem ovlivňujícím celý infekční proces je věková struktura populace cílového jedince. Daniel a Wyss (2009), Yaginuma a kol. (2006) a další autoři popisují různou náchylnost jednotlivých vývojových stádií k působení EPF. Obecně jsou mladší vývojová stadia k houbovým patogenům náchylnější (Boyle a Christopher Cutler 2012).

4.2.2 Interakce s dalšími organismy

EPF se zapojují do složitých vztahů s dalšími organismy. Některé z těchto vzájemných interakcí se jeví jako konkurenční, jiné však mohou být pro houby prospěšné.

Půdní bakterie značnou měrou ovlivňují EPF. Obecným trendem se zdá být snížení klíčivosti houbových spor v důsledku působení bakterií, přičemž Gram negativní bakterie inhibují klíčení více než bakterie Gram pozitivní. Růst houbových hyf již obecně není bakteriemi ovlivňován (Jaronski 2010).

I další půdní organismy mohou negativně ovlivňovat EPF. Některé půdní měňavky (Lobosea) přímo požívají houbové konidie či někteří kořenonožci (Vampyrellidae) perforují konidie a ničí houbové mycelium (Jaronski 2010).

Nepřímo může být houbový patogen ovlivněn jiným patogenem cílového jedince. Často se jedná o jiný druh houby nebo parazitoida. Parazitoidi jsou organismy vyvíjející se uvnitř jiného organismu, které na konci vývoje usmrcují svého hostitele. Tímto se řadí mezi další přirozené nepřátele škůdců a tedy i možné konkurenty EPF. Zdá se však, že v konkurenčním souboji mají EPF nad parazitoidy převahu. Například parazitoid *Aphidius ervi* z řádu blanokřídlých je sám náchylný k patogennímu působení EPF *Pandora neoaphidis* (Jaronski 2010) Obecně však hostitelé parazitoidů čelí většímu riziku infekce EPF než parazitoid sám. Větší náchylnost hostitele k houbové infekci vyplývá z jeho celkového oslabení v důsledku působení druhého patogenu.

EPF mohou mít prospěch i z jiných druhů hmyzu než jen ze svých cílových hostitelů. Mnoho dravého a parazitického hmyzu jeví značnou odolnost proti působení EPF (Jaronski 2010). Tímto se stávají potenciálními přenašeči houbových spor a mohou tak příznivě ovlivnit jejich šíření v prostředí.

5. VYUŽITÍ EPF V BIOLOGICKÉ KONTROLE ROSTLIN

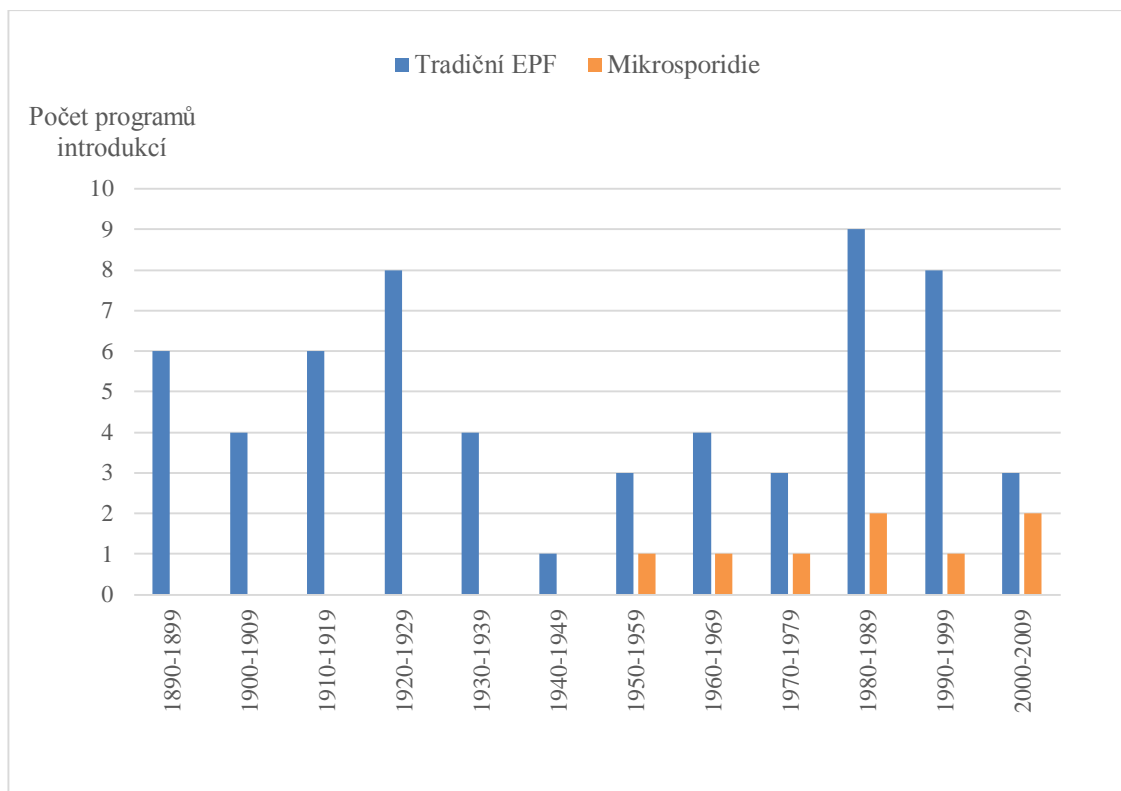
V dnešní době jsou lidé vystaveni chemickým látkám téměř na každém kroku. Na biologickou kontrolu rostlin lze pohlížet jako na vhodnou alternativu k využívání nadměrného množství chemikálií nejen v zemědělském průmyslu. Ač se jedná o postup efektivní, k životnímu prostředí šetrný a poměrně nízkonákladový, není v praxi ještě dostatečně rozšířen. Je však velmi perspektivní.

Za dosavadním nízkým využíváním biologické kontroly pravděpodobně stojí velmi nákladné výzkumy, které si dávají za cíl vyvinutí co nejúčinnějších přípravků pro použití přímo ve venkovních podmínkách či ve sklenících. Důležitým faktem však zůstává, že biologická kontrola, jak z názvu vyplývá, má za cíl pouze kontrolu a redukci škůdců. Úplné vyhubení škůdce by také mohlo značně narušit celý přirozený ekosystém.

5.1 Vývoj biologické kontroly

První záznam o úmyslném využití živého organismu v boji proti škůdcům pochází od neznámého autora již z roku 1893. Jednalo se o houbu *Botrytis brongniartii* (vědecké synonymum pro *Beauveria brongniartii*) a její použití v boji proti obaleči jablečnému na Novém Zélandě (Hajek a Delalibera Jr. 2010). Prvním využitým organismem ke kontrole nad hmyzím škůdcem byla tedy entomopatogenní houba. Od této doby bylo pro biologickou kontrolu rostlin využito několik desítek organismů z různých biologických říší.

Do roku 2009 proběhlo celosvětově 136 programů biologické kontroly proti škůdcům z kmene členovců (Arthropoda), přičemž 59 (obr. 8) z nich bylo založeno na introdukci tradičních vláknitých EPF. Dalších 8 programů pak využívalo jako agens entomopatogenní mikrosporidie (třídu hub spájivých) dříve patřících k prvokům. Výsledky účinnosti byly publikovány pouze u 33 programů využívajících tradiční EPF, kdy úspěšnost dosáhla 57,6 %, a u 4 programů využívajících mikrosporidie, kdy úspěšnost byla až 75 % (Hajek a Delalibera Jr. 2010).



Obrázek 8: Počet programů klasické biologické kontroly využívajících EPF včetně mikrosporidií využitých celosvětově v jednotlivých dekadách (Hajek a Delalibera Jr. 2010).

5.2 Principy a metody

Relativní škodlivé účinky biologické kontroly na životní prostředí a na necílové organismy lze výrazně minimalizovat výběrem konkrétních biologických činidel (Brodeur 2012). V závislosti na celé řadě faktorů ovlivňujících EPF je potřeba komplexně zhodnotit podmínky pro jejich využití v každém konkrétním případě. Při použití přípravků biologické kontroly ve sklenících nehrozí rozšíření patogenního organismu do okolí a využití postřiků je zde nejjednodušší metodou. Při aplikaci na polích je však nutné zvážit i riziko nežádoucího šíření patogenu. Kromě postřiků suspenzí spor ve vodě přímo na listy je možno využít například aplikaci do půdy. Při ochraně monokultur stromů je možné rovněž využít postřiků. Lze také použít aplikaci práškového koncentráту spor houby do sběrných částí feromonových lapačů, přičemž dospělci nezůstávají ve speciálně upravených lapačích uvěznění, ale mohou jej opustit a díky kontaminaci povrchu jejich těla se může nákaza dále rozšiřovat.

Metody biologické ochrany rostlin lze s ohledem na způsob a podmínky introdukce přirozeného nepřitele do zájmového agroekosystému rozdělit na dvě základní metody vztahující se také na EPF (Navrátilová 2013).

5.2.1 Metoda inokulativní introdukce

Tento postup je též označován klasická biologická ochrana. Je založen na záměrné introdukci malého počtu pro danou lokalitu nepůvodních mikroorganismů. Cílem je adaptace, rozmnožení a další šíření těchto patogenů v prostředí. Předpokládá se určitá perzistence infekčních propagulí, proto se tato metoda využívá zejména ve víceletých kulturách. Výhledově se jeví klasická biologická kontrola jako jedna z možných metod například pro dlouhodobou kontrolu nad invazivními druhy, k jejichž rozšiřování dochází ve všech částech světa v důsledku rozvoje celosvětového obchodu.

5.2.2 Metoda augmentativní introdukce

Tuto metodu lze označit také zaplavení nebo navýšení. Principem je pouze podpora již existující populace přirozeného nepřítel daného škůdce ve vybrané lokalitě. Nepředpokládá se však dlouhodobější přežití celé uměle rozšířené populace v zájmovém prostředí a introdukce se v dalším pěstitelském období zpravidla musí provést opakovaně.

5.3 Právní předpisy

Povolování přípravků biologické ochrany a využívání bioagens podléhá rostlinolékařským právním předpisům. V roce 2009 byla členy Evropské Unie přijata směrnice 2009/128/ES, která je v současné době jako novela zákona č. 199/2012 Sb. o rostlinolékařské péči součástí platné legislativy České republiky. Od 1. 1. 2014 je účinná vyhláška č. 205/2012 Sb., o obecných zásadách integrované ochrany rostlin (Ministerstvo zemědělství 2013).

5.4 Komerční přípravky

Hlavním cílem výzkumů biologické kontroly je specifikace vlastností přirozených nepřátel daného škůdce (Cabanillas a Jones 2009) a aplikace těchto poznatků při vývoji komerčně dostupných přípravků. Při výběru vhodného kandidáta nestačí pouze volba určitého druhu EPF. Bhadauria a kol. (2013) popisují rozdílné působení 8 různých kmenů houby *B. bassiana* na můry druhu *Spilarctia obliqua* v laboratorních podmínkách. Pro úspěch jakéhokoliv programu biologické kontroly je tedy zapotřebí izolovat, charakterizovat a selektovat konkrétní kmen dané EPF s nejvyšší virulencí.

V České republice nejsou v současné době registrovány žádné přípravky na bázi EPF. V minulých letech dostupné preparáty Boverol a Preferal již byly staženy z trhu. Zdá se,

že Česká republika obecně není biologické kontrole příliš nakloněna. V roce 2007 byla experimentálně použita *B. bassiana* k potlačení populací lýkožrouta smrkového *Ips typographus* v napadených lokalitách NP Šumava. Cílem projektu bylo poukázat na perspektivy využívání EPF a výsledkem je mimo jiné sbírka více než 150 kultur entomopatogenních hub. (Landa 2008)

V zahraničí je v současnosti biologická kontrola využívající EPF již mnohem rozšířenější. Například v Nizozemsku či ve Španělsku jsou na téměř 90 % rostlin pěstovaných ve sklenících aplikovány přípravky biologické kontroly, naproti tomu např. v Číně se těchto augmentativních metod zatím moc nevyužívá (Liu et al. 2014). Podobné introdukce s druhem *B. bassiana* jako v NP Šumava byly již dříve úspěšně otestovány v Německu, Švýcarsku a Rakousku (Landa 2008), kdy výsledky prokázaly perspektivu až při dlouhodobější kontrole lýkožrouta smrkového. Rychlý rozvoj vědy jistě do budoucna umožní důkladnější výzkumy v oblastech biologické kontroly a tudíž i rozšíření tohoto přístupu k ochraně rostlin.

6. KULTIVACE VYBRANÝCH ZÁSTUPCŮ EPF V LABORATORNÍCH PODMÍNKÁCH

6.1 Cíle

Cílem tohoto experimentu bylo zavedení metodiky kultivace EPF v laboratoři věnující se imunologii hmyzu. Pro kultivaci jsem zvolila dva druhy běžných entomopatogenních hub – *Beauveria bassiana* a *Metarhizium anisopliae*, které jsou hojně využívány jak jako modelové organismy, tak v biologické kontrole hmyzích škůdců. Izoláty těchto druhů byly získány od prof. Eustachia Tarasca z Univerzity of Bari Aldo Moro, Bari, Itálie a poté kultivovány na dvou vybraných kultivačních médiích. Po provedení optimalizace laboratorní kultivace a úspěšném namnožení zvolených EPF bylo mým cílem potvrdit čistotu kultur mikroskopickým pozorováním a také ověřit jejich patogenitu na vybraných zástupcích hmyzu.

6.2 Kultivačních média

Na základě požadavku dobré dostupnosti základních složek a případné možnosti kultivace dalších druhů EPF jsem za testovaná média zvolila bramborovo-dextrózový agar a dále *Beauveria selective medium*.

Na přípravu bramborovo-dextrózového agaru (Potato dextrose agar, PDA) jsem použila 100,6 g neloupaných nakrájených brambor, které jsem vařila po dobu 30 minut v půl litru destilované vody. Uvařené brambory jsem následně rozmačkala a přecedila přes sítko. Získaný výluh z brambor jsem doplnila destilovanou vodou tak, aby celkový objem činil půl litru. K takto připravené suspenzi jsem dále přidala 10,0 g agaru (Difco Laboratories, USA) a 10,0 g dextrinu (Lachema, Česká republika) a po důkladném promíchání jsem celou směs sterilizovala v autoklávu po dobu 15 minut. (TNAU 2013b)

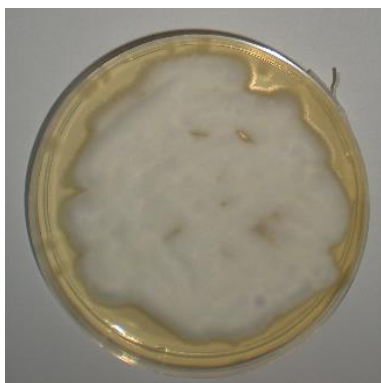
Při přípravě druhého média (*Beauveria selective medium*, BSM) jsem k půl litru destilované vody přidala postupně 10,0 g D-glukosy (Lachema, Česká republika), 6,0 g agaru (Difco Laboratories, USA) a 5,0 g peptonu (Elisabeth Pharmacon, Česká republika). Po promíchání jsem směs sterilizovala v autoklávu po dobu 15 minut. (Meyling 2007)

Tekutá sterilizovaná média jsem nechala mírně vychladnout a následně jsem jimi plnila Petriho misky. Po zatuhnutí médií na jednotlivých miskách jsem provedla inokulaci *B. bassiana* a *M. anisopliae* na obě média tak, že jsem pomocí inokulační kličky rovnoměrně na celý povrch živné půdy nanášela malá množství mycelia a spor

z mateřských kultur. Zbývající množství připravených médií jsem do dalšího použití uchovávala v lednici při 4 °C.

6.3 Růst vybraných EPF na médiích

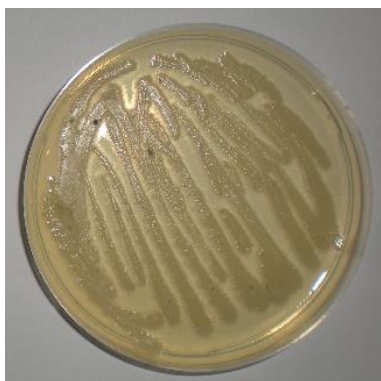
Na obrázcích 9 – 12 jsou zachyceny pět dnů staré houbové kultury, které byly po inokulaci ponechány v místnosti s konstantní teplotou 25 °C. Z fotografií je patrné, že již po několika dnech se na obou médiích vytvořilo poměrně husté bílé mycelium *B. bassiana* (obr. 9 a 10), zatímco u *M. anisopliae* se jednalo pouze o mírný povlak houbového mycelia (obr. 11 a 12).



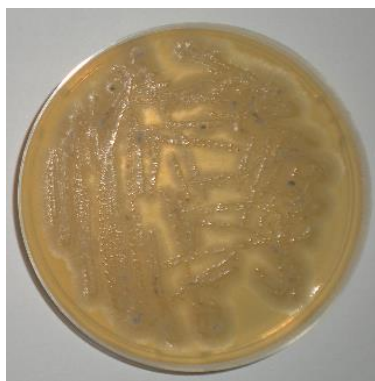
Obrázek 9: *Beauveria bassiana* na médiu BSM



Obrázek 10: *Beauveria bassiana* na médiu PDA



Obrázek 11: *Metarhizium anisopliae* na médiu BSM



Obrázek 12: *Metarhizium anisopliae* na médiu PDA

S postupným stárnutím kultur docházelo u *B. bassiana* k tvorbě velmi vzdušného bílého mycelia pokrývajícího celý povrch média na Petriho misce. U *M. anisopliae* nebylo dosaženo podobného výsledku. Kultura stagnovala ve stádiu, které ukazují obrázky 11 a 12. U některých kultur se pouze na omezených částech Petriho misky vytvořilo bílé mycelium, které zhruba po 14 dnech ztmavlo díky vytvořeným konidiím.

Původní mateřské i vypěstované kultury jsem podrobila mikroskopickému pozorování. U původní kultury *B. bassiana* i *M. anisopliae* jsem pozorovala očekávané

větvení hyf a tvar i velikost spor. Fotografie z tohoto mikroskopování doplňují text kapitoly 3.2 této práce. Vypěstovanou kulturu *B. bassiana* jsem rovněž mikroskopovala a po potvrzení její čistoty jsem ji využila k nákaze dostupných hmyzích zástupců.

6.4 Nákaza modelových organismů houbou *Beauveria bassiana*

Pro ověření patogenity kultivované *B. bassiana* jsem provedla experimentální nákazu těchto vybraných potenciálních hmyzích hostitelů:

Zavíječ voskový (*Galleria mellonella*; Lepidoptera) – larvální stádia, dospělci

Zlatohlávek Smithův (*Eudicella smithi bertherandi*; Coleoptera) – dospělce

Všechny hmyz byl umístěn do Petriho misek s vypěstovanou kulturou *B. bassiana* (obr. 13 – 15) a ponechán ve tmě v místnosti s teplotou 25 °C. Po jednom dni byli poté jedinci hmyzu přemístěni do nových misek s potravou a ponechání opět ve tmě a při teplotě 25 °C. Následně jsem denně sledovala stav hmyzu a především jeho mortalitu.



Obrázek 13: Dospělec zlatohlávka Smithova v kontaktu s kulturou *B. bassiana*



Obrázek 14: Larvy zavíječe voskového v kontaktu s kulturou *B. bassiana*



Obrázek 15: Dospělci zavíječe voskového v kontaktu s kulturou *B. bassiana*

Již po prvních třech dnech jsem pozorovala úmrtí jednoho ze dvou dospělců zavíječe voskového, čtvrtý den pak zemřel i druhý. Po dalších sedmi dnech jsem pomocí pitvy jednoho dospěléce ověřila úmrtí způsobené entomopatogenní houbou. Uvnitř těla jedince jsem našla makroskopicky pozorovatelné mycelium.

Zlatohlávek Smithův nejevil známky života po sedmi dnech od nákazy (obr. 16). Po třech týdnech od nákazy se na povrchu spodní strany těla tohoto usmrčeného jedince objevilo prorůstající bílé mycelium (obr. 17).



Obrázek 16: Usmrcený zlatohlávek Smithův



Obrázek 17: Usmrcený zlatohlávek Smithův s viditelným myceliem *B. bassiana* na spodní straně těla

Larvy zavíječe voskového umíraly postupně, přičemž nejprve docházelo k jejich viditelnému ztmavnutí (melanizaci) a až den poté k smrti daného jedince. První jedinec zemřel po osmi dnech od nákazy, den poté byli usmrceni další dva. Třináctý den od nákazy byly dvě larvy zavíječe stále ještě živé (obr. 18). Ve stejný den bylo již možno na povrchu těla první usmrcené larvy pozorovat pronikající mycelium (obr. 19).



Obrázek 18: Larvy zavíječe voskového 13. den od nákazy



Obrázek 19: Usmrcená larva zavíječe voskového pokrytá myceliem *B. bassiana*

6.5 Diskuse

Obě kultivační média (BSM i PDA) byla pro experiment zvolena hlavně z důvodu jejich jednoduché přípravy a dobré dostupnosti složek. PDA patří mezi běžná mikrobiologická média používaná pro kultivaci hub i bakterií. Pro efektivnější množení určitých mikroorganismů se však využívají média selektivní. Jedním z nich je BSM, které je vhodné pro kultivaci rodu *Beauveria*. Do tohoto média se přidávají antibiotické látky jako streptomycin, tetracyklin a cykloheximid, které potlačují růst jiných mikroorganismů (Meyling 2007). Ve svém experimentu jsem tyto antibiotika nepoužila a toto médium jsem využila rovněž i pro kultivaci *M. anisopliae*.

Při samotné inokulaci se lépe pracovalo s médiem BSM. PDA bylo i po důkladném zatuhnutí znatelně měkčí než BSM a do jeho povrchu se více bořila inokulační klička. Z tohoto důvodu mohl být znesnadněn nárůst kultury na tomto médiu.

Po pozorování růstu hub na jednotlivých médiích doporučuji ke kultivaci *B. bassiana* médium BSM, využití PDA je také možné. Pro *M. anisopliae* se však obě média za daných kultivačních podmínek jeví jako nevhodná. Jednou z možných příčin nezdařené kultivace tohoto druhu může být zvolená kultivační teplota 25 °C. Teplotní optima některých izolátů *M. anisopliae* jsou nižší než 25 °C (Ouedraogo et al. 1997).

Pro nákazu dostupného hmyzu jsem využila pouze *B. bassiana*. Tato houba usmrtila oba testované hmyzí druhy a v případě zavíječe voskového i obě testovaná vývojová stádia. Důkazem bylo viditelné bílé mycelium prorůstající na povrch těla všech usmrcených jedinců. Při pitvě mrtvých dospělců zavíječe voskového i zlatohlávka Smithova jsem navíc makroskopicky pozorovala mycelium vyplňující celou tělní dutinu. Tento druh tedy považuji za velmi patogenní pro hmyz. Infekčnost *M. anisopliae* nejsem z provedených experimentů schopna posoudit.

7. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo shrnutí dosavadních poznatků o entomopatogenních houbách. Entomopatogenní zástupci se nachází ve větším množství tříd několika houbových kmenů. Z tohoto důvodu je tato problematika velmi rozsáhlá. Tuto práci jsem zaměřila na nejběžnější a zároveň hospodářsky nejvýznamnější skupinu EPF, která shromažďuje jejich druhy s typickým vláknitým myceliem a s nepohlavním rozmnožováním.

Entomopatogenními houbami se v současné době zabývá mnoho vědeckých týmů po celém světě. Výzkumy, jejichž cíli jsou nejčastěji specifikace vlastností kmenů jednotlivých druhů, zjištění vlivu jednotlivých insekticidních látek na konkrétní hostitele či dopad některého vnějšího faktoru na životní cyklus studované houby, přinášejí stále podrobnější a komplexnější poznatky o EPF. Tyto informace pak mohou být využity při vývoji a výrobě ještě účinnějších přípravků určených pro biologickou kontrolu rostlin před škůdci.

Společnost si v dnešní době velmi uvědomuje škodlivost využívání enormního množství chemických látek ve všech sférách lidského života. Postupy biologické kontroly mohou částečně napomáhat řešení tohoto problému hlavně v oblasti zemědělství, přičemž menší míra použití insekticidů by měla méně zatěžovat životní prostředí. Ač se tato myšlenka zdá velmi jednoduchá, některé státy světa stále nejsou biologické kontrole příliš nakloněny.

Díky experimentální části jsem měla možnost pracovat se dvěma druhy EPF, pozorovat jejich růst na živných půdách a následně sledovat průběh nákazy u několika hmyzích jedinců. Ze svých pozorování vyvozují, že využití EPF v biologické kontrole má své místo a dle mého názoru by měla být této skupině organismů věnována ještě větší pozornost.

8. INFORMAČNÍ ZDROJE

- BARRON, G. 2001. *Beauveria bassiana*. University of Guelph [online] [vid. 1. únor 2014]. Dostupné z: <http://www.uoguelph.ca/~gbarron/MISCELLANEOUS/nov01.htm>
- BARRON, G. 2013a. *Beauveria bassiana* - on cicada. University of Guelph Library [online] [vid. 2. březen 2014]. Dostupné z: <https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/handle/10214/5994>
- BARRON, G. 2013b. *Beauveria bassiana* - sympodial development on rachis. University of Guelph Library [online] [vid. 2. březen 2014]. Dostupné z: <https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/handle/10214/6018>
- BAVERSTOCK, J., H. E. ROY a J. K. PELL, 2010. Entomopathogenic fungi and insect behaviour: from unsuspecting hosts to targeted vectors. *BioControl*. 2., roč. 55, č. 1, s. 89–102. ISSN 13866141.
- BHADARIA, B. P., P. K. SINGH, S. PANDEY, N. W. ZAIDI a U. S. SINGH, 2013. Characterization and biocontrol potential of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* isolates against *Spilacris obliqua*. *Journal of Environmental Biology*. 9., roč. 34, č. 5, s. 918–921. ISSN 02548704.
- BOYLE, D. a G. Ch. CUTLER, 2012. Effects of insect activity, soil, and cuticular factors on virulence of *Beauveria bassiana* toward *Blissus leucopterus hirtus*. *Journal of Pest Science*. roč. 85, č. 4, s. 505–512. ISSN 16124758.
- BRAGA, G. U. L., D. E. N. RANGEL, S. D. FLINT, A. J. ANDERSON a D. W. ROBERTS, 2006. Conidial Pigmentation Is Important to Tolerance Against Solar-simulated Radiation in the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. *Photochemistry and Photobiology*. 4., roč. 82, č. 2, s. 418–22. ISSN 00318655.
- BRODEUR, J. 2012. Host specificity in biological control: insights from opportunistic pathogens. *Evolutionary Applications*. 7., roč. 5, č. 5, s. 470–480. ISSN 1752-4571.
- CABANILLAS, H. E. a W. A. JONES, 2009. Effects of Temperature and Culture Media on Vegetative Growth of an Entomopathogenic Fungus *Isaria sp.* (Hypocreales: Clavicipitaceae) Naturally Affecting the Whitefly, *Bemisia tabaci* in Texas. *Mycopathologia*. 5., roč. 167, č. 5, s. 263–71. ISSN 0301486X.
- CLOYD, R. 1999. The Entomopathogen *Verticillium lecanii*. University of Illinois [online] [vid. 20. březen 2014]. Dostupné z: <http://www.entomology.wisc.edu/mbcn/kyf612.html>
- COHEN, E., T. JOSEPH a M. WASSERMANN-GOLAN, 2001. Photostabilization of biocontrol agents by berberine. *International Journal of Pest Management*. 1., roč. 47, č. 1, s. 63–67. ISSN 09670874.
- DANIEL, C. a E. WYSS, 2009. Susceptibility of different life stages of the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi*, to entomopathogenic fungi. *Journal of Applied Entomology*. roč. 133, č. 6, s. 473–483. ISSN 1439-0418.
- GOLSHAN, H., M. SABER, F. MAJIDI-SHILSAR, M. BAGHERI a V. MAHDAVI, 2013. Effects of Common Pesticides Used in Rice Fields on the Conidial Germination of Several Isolates of Entomopathogenic Fungus, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Journal of the Entomological Research Society*. 3., roč. 15, č. 1, s. 17–22. ISSN 13020250.
- HAJEK, A. E. a I. DELALIBERA JR., 2010. Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. *BioControl*. roč. 55, č. 1, s. 147–158. ISSN 13866141.

- HALL, R. A., 1979. Pathogenicity of *Verticillium lecani* conidia and blastospores against the aphid, *Macrosiphoniella sanborni*. *Entomophaga*. 1.6., roč. 24, č. 2, s. 191–198. ISSN 0013-8959, 1573-8248.
- HASAN, S., A. AHMAD, A. PURWAR, N. KHAN, R. KUNDAN a G. GUPTA, 2013. Production of extracellular enzymes in the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Bioinformation*. 2.3., roč. 9, č. 5, s. 238–242. ISSN 0973-8894.
- IRRI – International Rice Research Institute, 2009a. Scientific name: *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. Rice Knowledge Bank [online] [vid. 3. března 2014]. Dostupné z: <http://www.knowledgebank.irri.org/ipm/insect-pathogens/white-muscardine-fungus/scientific-name-beauveria-bassiana-balsamo-vuillemin.html>
- IRRI – International Rice Research Institute, 2009b. Scientific name: *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin. Rice Knowledge Bank [online] [vid. 10. března 2014]. Dostupné z: <http://www.knowledgebank.irri.org/ipm/insect-pathogens/green-muscardine-fungus/scientific-name-metarhizium-anisopliae-metchnikoff-sorokin.html>
- JARONSKI, S. T., 2010. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *BioControl*. 2., roč. 55, č. 1, s. 159–185. ISSN 13866141.
- KALINA, T. a J. VÁŇA, 2005. Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Praha: Karolinum. s. 231-233. ISBN 8024610361.
- KIM, J. S., A. KASSA, M. SKINNER, T. HATA a B. L. PARKER, 2011. Production of thermotolerant entomopathogenic fungal conidia on millet grain. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 6., roč. 38, č. 6, s. 697–704. ISSN 1367-5435.
- KIRK, P. 2014a. *Beauveria bassiana*. Index Fungorum Partnership [online] [vid. 19. března 2014]. Dostupné z: <http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=199430>
- KIRK, P. 2014b. *Metarhizium anisopliae*. Index Fungorum Partnership [online] [vid. 25. března 2014]. Dostupné z: <http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=101834>
- KIRK, P. 2014c. *Verticillium lecanii*. Index Fungorum Partnership [online] [vid. 5. dubna 2014]. Dostupné z: <http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=269143>
- KNUDSEN, G. R., 2013. International Deployment of Microbial Pest Control Agents: Falling Between the Cracks of the Convention on Biological Diversity and the Cartagena Biosafety Protocol? *Pace Environmental Law Review*. roč. 30, č. 2, s. 625–651. ISSN 07386206.
- KOS, K. a F. A. CELAR, 2013. Sensitivity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. to selected herbicides. *Pest Management Science*. roč. 69, č. 6, s. 717–721. ISSN 1526-4998.
- LANDA, Z. 2008. Současný stav a perspektivy využívání *B. bassiana* ve smrčínách NP Šumava. Národní park Šumava [online] [vid. 1. dubna 2014]. Dostupné z: <http://www.npsumava.cz/cz/1598/2186/clanek/soucasny-stav-a-perspektivy-vyuzivani-b-bassiana-ve-smrcinach-np-sumava/>
- LANDA, Z. 2009. Entomopatogenní houby. Katedra rostlinné výroby a agroekologie, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích [online] [vid. 21. února 2014]. Dostupné z: <http://rl.zf.jcu.cz/docs/ruzne/ruz-MOR-P4f-f6c167a163.pdf>

- LIU, Q., S. YING a M. FENG, 2011. Characterization of *Beauveria bassiana* neutral trehalase (BbNTH1) and recognition of crucial stress-responsive elements to control its expression in response to multiple stresses. *Microbiological Research*. 20.5., roč. 166, č. 4, s. 282–293. ISSN 0944-5013.
- LIU, S., A. RAO a S. BRADLEIGH VINSON, 2014. Biological Control in China: Past, present and future – An introduction to this special issue. *Biological Control*. roč. 68, s. 1–5. ISSN 1049-9644.
- MAHR, S. 1997. The Entomopathogen *Beauveria bassiana*. University of Wisconsin- Madison [online] [vid. 22. únor 2014]. Dostupné z: <http://www.entomology.wisc.edu/mbcn/kyf410.html>
- MEYER, J. R., 2006. The Exoskeleton. Department of Entomology NC State University [online] [vid. 13. únor 2014]. Dostupné z: <http://www.cals.ncsu.edu/course/ent425/tutorial/integ.html>
- MEYLING, N. V., 2007. Methods for isolation of entomopathogenic fungi from the soil environment - laboratory manual [online] [vid. 20. listopad 2013]. Dostupné z: <http://orgprints.org/11200/>
- MEYLING, N. V. a J. EILENBERG, 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control*. roč. 43, č. 2, s. 145–155. ISSN 1049-9644.
- MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ, 2013. Integrovaná ochrana rostlin. ÚKZÚZ [online] [vid. 17. březen 2014]. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/skodlive-organizmy/integrovana-ochrana-rostlin/>
- MOLNÁR, I., D. M. GIBSON a S. B. KRASNOFF, 2010. Secondary metabolites from entomopathogenic Hypocrealean fungi. *Natural Product Reports*. 18.8., roč. 27, č. 9, s. 1241–1275. ISSN 1460-4752.
- NAVRÁTILOVÁ, M. 2013. Kategorizace základních metod BO, strategie. Biologická ochrana rostlin [online] [vid. 3. duben 2014]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=1801
- ORMOND, E. L., A. P.M. THOMAS, J. K. PELL, S. N. FREEMAN a H. E. ROY, 2011. Avoidance of a generalist entomopathogenic fungus by the ladybird, *Coccinella septempunctata*. *FEMS Microbiology Ecology*. roč. 77, č. 2, s. 229–237. ISSN 1574-6941.
- OUEDRAOGO, A., J. FARGUES, M. S. GOETTEL a C. J. LOMER, 1997. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Mycopathologia* [online]. roč. 137, č. 1, s. 37–43. ISSN 0301486X.
- ROBERTS, D. W., S. GUPTA a R. J. ST. LEGER, 1992. Metabolite production by entomopathogenic fungi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. roč. 27, s. 325–347.
- SHARIFIFAR, M., M.S. MOSSADEGH a B. VAZIRIANZA, 2012. Effects of Temperature and Humidity on the Pathogenicity of the Entomopathogenic Fungi in Control of the *House Fly*, *Musca domestica* L. (Diptera:Muscidae) under Laboratory Conditions. *Journal of Entomology*. 1.5., roč. 9, č. 5, s. 282–288. ISSN 18125670.
- SCHRANK, A. a M. H. VAINSTEIN, 2010. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*. roč. 56, č. 7, s. 1267–1274. ISSN 0041-0101.

- SRIVASTAVA, Ch. N., P. MAURYA, P. SHARMA a L. MOHAN, 2009. Prospective role of insecticides of fungal origin: Review. *Entomological Research*. roč. 39, č. 6, s. 341–355. ISSN 1748-5967.
- ST. LEGER, R. J., 2008. Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. *Journal of Invertebrate Pathology*. roč. 98, č. 3, s. 271–276. ISSN 0022-2011.
- TNAU – Tamil Nadu Agricultural University, 2013a. Mass production: Fungus. TNAU Agritech Portal [online] [vid. 13. březen 2014]. Dostupné z: http://agritech.tnau.ac.in/crop_protection/crop_prot_bio_mass_fungus.html
- TNAU – Tamil Nadu Agricultural University, 2013b. Preparation od Culture Media. TNAU Agritech Portal [online] [vid. 10. listopad 2013]. Dostupné z: http://agritech.tnau.ac.in/farm_enterprises/Farm%20enterprises_%20Mushroom_Culture%20media.html
- TZEAN, S. S. a L. S. HSIEH, 1997. Characteristics of conidiophores. Taiwan Fungal Flora Knowledge [online] [vid. 20. březen 2014]. Dostupné z: http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802250025
- TZEAN, S. S. a J. L. CHEN, 1997. *Verticillium lecanii*. Taiwan Fungal Flora Knowledge [online] [vid. 23. březen 2014]. Dostupné z: http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802290019
- XIA, Y. a Ch. WANG, 2010. *Metarhizium acridum* fungus, that only infects locusts (pictured) or grasshoppers [online]. červen 2010. [vid. 30. březen 2014]. Dostupné z: [http://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Metarhizium_acridum_infecting_locust_\(PLoS\).jpg&oldid=108195774](http://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Metarhizium_acridum_infecting_locust_(PLoS).jpg&oldid=108195774)
- YAGINUMA, D., H. HIROMORI a M. HATSUKADE, 2006. Virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii* to several life stages of the yellowish elongate chafer *Heptophylla picea* Motschulsky (Coleoptera: Scarabaeidae). *Applied Entomology and Zoology*. roč. 41, č. 2, s. 287–293. ISSN 0003-6862.
- YING, S. a M., FENG, 2011. A conidial protein (CP15) of *Beauveria bassiana* contributes to the conidial tolerance of the entomopathogenic fungus to thermal and oxidative stresses. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 6., roč. 90, č. 5, s. 1711–20. ISSN 01757598.