

# Navýšení účinnosti entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae* na vybrané druhy hostitelů

Autoři: Konopická J.<sup>1</sup>, Bohatá A.<sup>1</sup>, Vondruška J.<sup>1</sup>, Kročáková J.<sup>1</sup>, Olšan P.<sup>2</sup>, Havelka Z.<sup>2</sup>, Bartoš P.<sup>2,3</sup>, Kříž P.<sup>2,3</sup>, Čurn V.<sup>1</sup>, Špatenka P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, ZF, Katedra speciální produkce rostlinné  
<sup>2</sup> Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, ZF, Katedra dopravní a manipulační techniky  
<sup>3</sup> Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, PF, Katedra aplikované fyziky a techniky

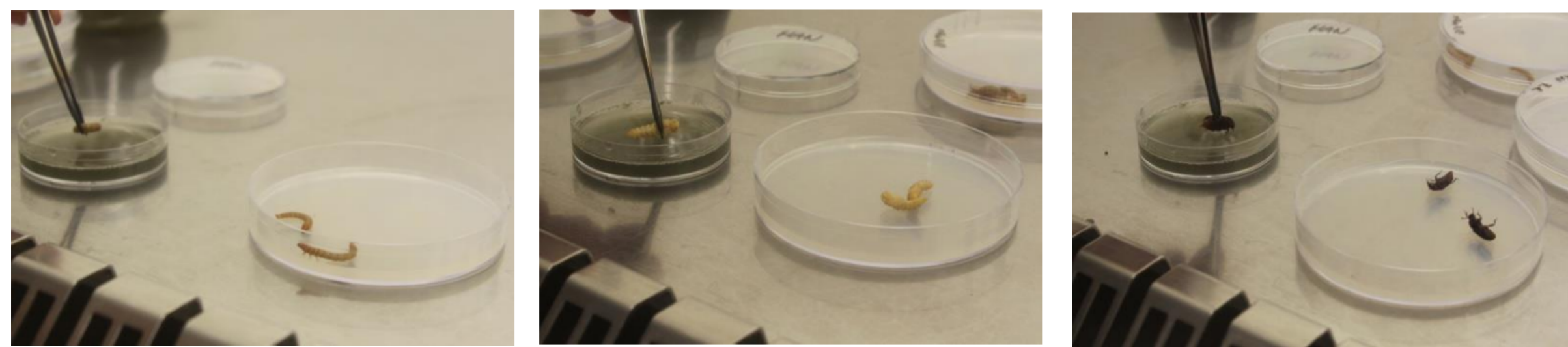
**ABSTRAKT:** Entomopatogenní houba *Metarhizium anisopliae* patří mezi nejrozšířenější druhy využívané v biologické ochraně rostlin. Práce se zaměřuje na účinnost původních a kontinuálně pasážovaných kmenů (BIO1020, MKC110112, Man3B) *M. anisopliae* přes živné substráty a různá vývojová stadia potměníka moučného (*Tenebrio molitor*). **Klíčová slova:** entomopatogenní houby; *Metarhizium anisopliae*; kontinuální pasážování

**ÚVOD:** Entomopatogenní houby vyvolávají nákazy významných hmyzích škůdců a na jejich bázi jsou ve světě vyráběny komerční biopreparáty. Biopreparáty musí splňovat určité parametry, přičemž důležitá je zejména virulence infekčních propagulí, kterými jsou např. konidie nebo blastospor. Virulence entomopatogenních hub, která vyjadřuje stupeň patogenity, je u některých kmenů a izolátů hub variabilní. Stabilita virulence při výrobním procesu je zásadní pro zajištění konzistentní kvality materiálu. Jestliže dojde ke snížení nebo ztrátě virulence, produkt je nekvalitní a stává se neprodejným. Virulence může být posílena tzv. pasážími přes živé hostitele. Metoda kontinuálního pasážování kmene přes cílového hmyziho škůdce se využívá k udržení virulence nebo ke zvýšení virulence entomopatogenních hub, popřípadě k „oživení“ virulence v případě, že dojde k jejímu snížení. Kontinuální pasážování je také označováno termínem pasážování „*in vivo*“.

**CÍL:** Práce je zaměřena na navýšení virulence kmenů významného druhu entomopatogenní houby *M. anisopliae* pomocí kontinuálního pasážování přes vybrané substráty a vývojová stadia *T. molitor*.

## MATERIÁL A METODIKA

- Kmeny *M. anisopliae* (BIO1020, MKC110112, Man3B) byly pasážovány přes přirozené substráty (ovesné vločky a PDA) a hostitelský organismus *T. molitor* (larvy, kukly a dospělce).
- U ovesných vloček a živého hostitele vznikla první pasáž ponořením varianty do suspenze z plně vysporulovaných matečných kultur kmenů *M. anisopliae*. Varianta PDA spočívala v přetažení spor z matečné kultury inokulační klíčkou na novou plotnu PDA.
- Následné pasáže byly prováděny „suchou cestou“, tj. dotykem plně vysporulovaného objektu předchozí pasáže.
- Pasážování jednotlivých variant bylo kontinuálně prováděno do 10. cyklu opakování.
- Účinnost pasážovaných kmenů *M. anisopliae* proti larvám *T. molitor* byla sledována u vybraných variant.
- Hodnocení produkce spor kmenů *M. anisopliae* bylo sledováno u všech pasážovaných variant.
- Jako kontrola k pasážovaným kmenům sloužily kmeny původní „nepasážované“ získané z matečných kultur.



## VÝSLEDKY

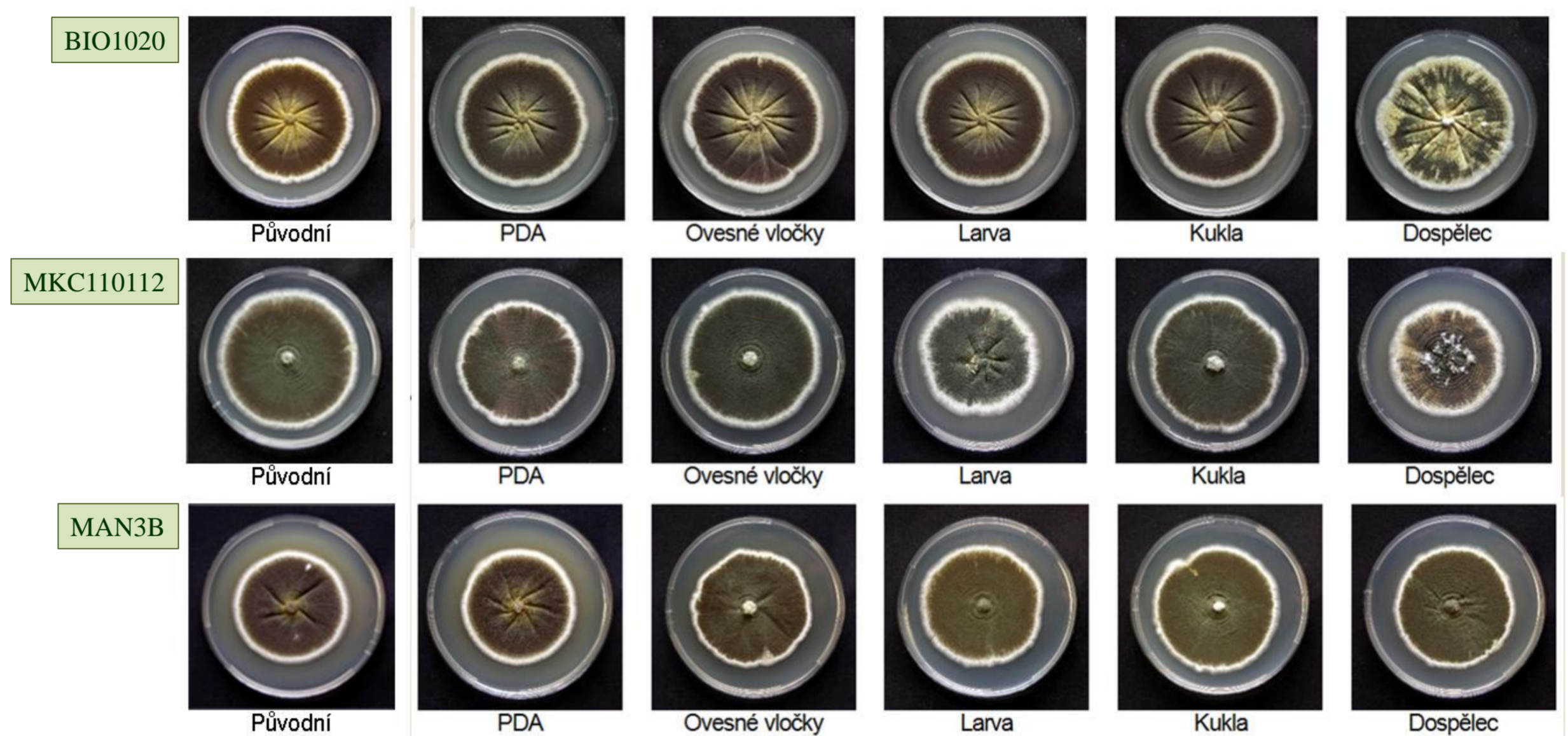
**Tab. 1: Výtěžnost spor na mm<sup>2</sup> pasážovaných kmenů *M. anisopliae* přes substráty a vývojová stadia hostitele *T. molitor***

Varianta	BIO1020		MKC110112		Man3B	
	mm <sup>2</sup>	Tukey HSD	mm <sup>2</sup>	Tukey HSD	mm <sup>2</sup>	Tukey HSD
Původní	1,93E+06	b	1,50E+06	b	2,17E+06	b
PDA	2,61E+06	ab	2,08E+06	a	3,01E+06	a
Vločky	2,78E+06	ab	1,64E+06	b	3,27E+06	a
Larvy	2,52E+06	ab	9,89E+05	c	2,46E+06	b
Kukly	2,97E+06	a	1,71E+06	b	2,43E+06	b
Dospělci	7,45E+05	c	8,36E+05	c	2,45E+06	b
	F=51,701; df=5,6; p=0,0001		F=26,170; df=5,6; p=0,0005		F=41,290; df=5,6; p=0,0001	

\*\*a, b, c: průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda,  $\alpha=0,05$ ; Tukey HSD test)

Pasážování kmenů přes substráty a vývojová stadia *T. molitor* mělo významný vliv na produkci spor ve srovnání s jejich původními variantami. Významné rozdíly v produkci spor byly zaznamenány zejména u kmene BIO1020 a kmene Man3B. Pouze u varianty, kde byl kmen BIO1020 pasážován přes dospělé, došlo k potlačení sporulace. U kmene MKC110112 bylo zaznamenáno výrazné navýšení produkce spor pouze u varianty, kde byl kmen subkultivován přes živnou půdu PDA. U ostatních pasáží tohoto kmene byla produkce spor srovnatelná s původní variantou nebo výrazně nižší.

**Obr. 1: Morfotypy středových kultur původních a pasážovaných kmenů *M. anisopliae* po 21 dnech kultivace**



**Tab. 2: Vliv pasážování na mortalitu larev potměníka moučného (*T. molitor*) po 4 dnech biotestu**

Varianta	BIO1020		MKC110112		Man3B	
	Mortalita (%)	Tukey HSD	Mortalita (%)	Tukey HSD	Mortalita (%)	Tukey HSD
Kontrola	0,00±0,00	b	0,00±0,00	a	0,00±0,00	c
Původní	47,17±7,86	a	30,52±10,39	b	63,81±14,16	a
PDA 10. p.	8,32±6,80	b	22,20±7,86	b	36,07±3,93	b
Larva 10. p.	47,17±14,16	a	33,28±13,61	b	27,75±3,93	b
	F=20,0401; df=3,8; p=0,0004		F=14,4456; df=3,8; p=0,0014		F=43,8504; df=3,8; p=0,0000	

\*\*a, b, c: průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda,  $\alpha=0,05$ ; Tukey HSD test)

V kontrolní variantě u všech testovaných kmenů nebyla zaznamenána mortalita larev. Původní kmen BIO1020 a pasážovaný kmen přes larvy vykázal téměř 50% mortalitu v populaci larev *T. molitor*. Kmen subkultivovaný přes PDA nebyl proti larvám tak účinný. Původní a pasážovaný kmen MKC110112 způsobil mortalitu v rozmezí od 22,20 do 33,28 %. Nejnižší mortalita byla zaznamenána u kmene pasážovaného přes umělou živnou půdu PDA. Původní kmen Man3B způsobil v populaci larev 4. den téměř 64% mortalitu. U pasážovaných variant kmene byla mortalita výrazně nižší. U pasážované varianty přes umělou živnou půdu dosáhla mortalita 36,07 % a u kmene pasážovaného přes larvu *T. molitor* byla zaznamenána pouze 27,75% mortalita.

## DISKuze

Virulence entomopatogenních hub může být ovlivněna opakovanou subkultivací přes umělá živná média nebo přes hmyzí hostitele. Stabilita virulence u entomopatogenních hub je nezbytná vlastnost pro výrobu biopreparátů (Mohammadbeigi 2013). Snížení nebo zvýšení virulence entomopatogenních hub po opakovaných subkultivacích bylo pozorováno v řadě studií (Fargues, Robert 1983; Scharffenberg 1964). Butt *et al.* (2006) uvedl, že virulenci lze zvýšit i po dvou kontinuálních pasážích přes hmyziho hostitele. Zajímavé jsou také práce týkající se houby *M. anisopliae*, kde k výraznému navýšení virulence došlo již po první pasáži (Fargues, Robert 1983; Doaust, Roberts 1982). Na druhou stranu některé studie uvádějí, že subkultivace přes umělá živná média způsobují útlum ve virulenci (Quesada-Moraga, Vey 2003; Schaefferberg 1964). Obecně platí, že na umělém médiu s ideálními výživovými podmínkami entomopatogenní houby postupně degenerují, ztrácí svoji virulenci, popřípadě mohou měnit i fenotyp. Tento jev je daný tím, že houby mají optimální podmínky ve výživě a nejsou negativně ovlivňovány nepříznivými podmínkami prostředí. Naopak, ve stresových podmínkách může být virulence entomopatogenních hub posílena (Mohammadbeigi 2013).

## LITERATURA

- Butt T.M., Wang C., Shah F.A., Hall R. (2006): Degeneration of entomogenous fungi. In: Eilenberg J., Hokkanen H.M.T. (Eds.): *Anecological and societal approach to biological control*. Springer, 213-226.
- Daoust R.A., Roberts D.W. (1982): Virulence of natural and insect passaged strains of *Metarhizium anisopliae* to mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 40: 107-117.
- Fargues J.F., Robert P.H. (1983): Effect of passing through scarabaeid hosts on the virulence and host specificity of two strains of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 29: 575-583.
- Mohammadbeigi A. (2013): Virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) passaged through artificial media and an insect host *Uvarovestia zebra* (Orthoptera: Tettigoniidae). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 6(16): 1147-1152.
- Quesada-Moraga E., Vey A. (2003): Intra-specific variation in virulence and *in vitro* production of macromolecular toxins active against locust among *Beauveria bassiana* strains and effects of *in vivo* and *in vitro* passage on these factors. *Biocontrol Science and Technology*, 13: 323-340.
- Schaefferberg B. (1964): Biological and environmental conditions for the development of mycoses caused by *Beauveria* and *Metarhizium*. *Insect Pathology*, 6: 8-20.

## PODĚKOVÁNÍ

Tento příspěvek vznikl za podpory Technologické agentury České republiky – číslo grantu TA04021252, GAJU 120/2016/Z a GAJU 094/2016/Z.