

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA**  
**V NITRE**  
**FAKULTA AGROBIOLÓGIE A POTRAVINOVÝCH ZDROJOV**  
**Katedra ochrany rastlín**

**Druhové spektrum entomopatogénnych húb z radu Hypocreales  
izolovaných z pôdných vzoriek pochádzajúcich z rôznych lokalít  
Slovenska a genetická štruktúra populácií *Beauveria bassiana***

Autoreferát dizertačnej práce  
na získanie vedecko-akademickej hodnosti philosophiae doctor  
v študijnom programe 6.1.16 ochrana rastlín

**Ing. Juraj Medo**

**Nitra, 2009**

Dizertačná práca bola vypracovaná v dennej forme doktorandského štúdia na Katedre ochrany rastlín Fakulty agrobiológie a potravinových zdrojov Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre.

Doktorand: Ing. Juraj Medo  
Katedra ochrany rastlín  
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Vedúci dizertačnej práce: prof. Ing. Ľudovít Cagáň, CSc.  
Katedra ochrany rastlín FAPZ SPU v Nitre

Oponenti: prof. Ing. Ján Praslička, CSc.,  
Katedra zoológie a antropológie,  
FPV UKF v Nitre

prof. Ing. Alojz Kúbek, CSc.  
Katedra genetiky a plemenárskej biológie  
FAPZ SPUNitra

Ing. Andrej Kunca PhD.  
Lesnícky výskumný ústav  
Národné lesnícke centrum Zvolen

Autoreferát bol rozoslaný dňa .....

Stanovisko k dizertácii vypracovala Katedra ochrany rastlín FAPZ SPU v Nitre.

Obhajoba doktorandskej práce sa koná dňa.....o .....h pred komisiou pre obhajobu dizertačných prác študijného programu 6.1.16 ochrana rastlín na Fakulte agrobiológie a potravinových zdrojov SPU v Nitre.

Miesto konania: .....  
Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov  
Slovenská poľnohospodárska univerzita  
Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

Miestnosť: .....

S dizertačnou prácou sa možno oboznámiť na dekanáte Fakulty agrobiológie a potravinových zdrojov SPU v Nitre.

Predseda komisie pre obhajoby v študijnom programe 6.1.16 ochrana rastlín

prof. Ing. Ľudovít Cagáň, CSc.,  
Katedra genetiky a šľachtenia rastlín  
Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov  
SPU Nitra

## Abstrakt

V roku 2008 bolo odobraných 901 vzoriek pôdy z rôznych ekologických podmienok z územia Slovenska. Z týchto boli pomocou *Galleria mellonella* entomopatogénne huby potvrdené v 430 a pomocou selektívneho média v 627 vzorkách. Medzi použitými metódami bol zistený výrazný rozdiel v schopnosti detegovať jednotlivé druhy. Pomocou *G. mellonella* boli zistené 4 druhy - *Beauveria bassiana* (v 31 % vzoriek), *Metarhizium anisopliae* (8 %), *Isaria farinosa* (6 %) a *Isaria fumosorosea* (6 %). Pomocou selektívneho média boli detegované len 3 druhy *B. bassiana* (v 36 % vzoriek), *M. anisopliae* (37 %) a *I. fumosorosea* (9 %). Druh *B. bassiana* preferoval prirodzené prostredie, teda najmä lesný biotop. Vo všetkých ostatných biotopoch sa však tiež vyskytoval pomerne často. Výskyt *I. farinosa* bol striktno obmedzený na lesný biotop. Výskyt druhu *I. fumosorosea* bol najvyšší v pôdnych vzorkách pochádzajúcich z remízok. Druh *M. anisopliae* sa vyskytoval najmä na slnečných stanovištiach, ako sú lúky a polia a neprekážala mu intenzívna poľnohospodárska činnosť. Bola zistená významná závislosť medzi jednotlivými skúmanými faktormi prostredia (nadmorská výška, pH pôdy, typ biotopu a geografická poloha). So stúpajúcou nadmorskou výškou a klesajúcou hodnotou pH sa zvyšoval výskyt *B. bassiana* a *I. farinosa*, pričom výskyt *M. anisopliae* mal opačný charakter. 45 izolátov *B. bassiana*, u ktorých bola zisťovaná účinnosť proti *O. nubilalis* v laboratórnych podmienkach, spôsobovali mortalitu v rozsahu 43 až 97 % v priebehu 14 dní. Vypočítaný letálny čas LT<sub>50</sub> bol pri jednotlivých izolátoch v rozsahu od 3,8 do 17,8 dňa. Nebol zistený vzťah medzi mortalitou lariev *Ostrinia nubilalis* alebo dosiahnutým letálnym časom a podmienkami (biotop, pH pôdy, nadmorská výška), z ktorých pochádzali testované izoláty. PCR-RFLP analýzou jadrovej rDNA v 112 vzorkách *Beauveria bassiana* boli zistené len 2 haplotypy. PCR ISSR analýzou s použitím šiestich primerov bolo identifikovaných 104 haplotypov, ktoré boli zhukovou analýzou rozdelené do 4 vetiev. Vo vetvách P1, P2 a P3 boli zaradené izoláty s PCR RFLP haplotypom A, kým vo vetve R boli izoláty s haplotypom B. Na základe nízkej variability medzi izolátmi vo vnútri vetiev a relatívne veľkej genetickej vzdialenosti medzi vetvami je možné usudzovať, že sa jedná o najmenej 2 kryptické druhy. Izoláty s PCR-RFLP haplotypom A pochádzali predovšetkým z poľných a lúčnych biotopov, zatiaľ čo podstatná časť izolátov s haplotypom B pochádzala z lesných biotopov. Izoláty s haplotypom A pochádzali z lokalít s nižšou nadmorskou výškou a vyššou hodnotou pH pôdy ako izoláty s haplotypom B. Nebol zistený preukazný rozdiel medzi haplotypom a schopnosťou izolátov zabíjať larvy *O. nubilalis*.  
Kľúčové slová: entomopatogénne huby, *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria*, *Ostrinia nubilalis*, ISSR, PCR-RFLP

## Abstract

Samples from 901 sampling sites in Slovakia were collected during year 2008. Entomopathogenic fungi were detected in 430 samples by *Galleria mellonella* bait method (GBM) and in 627 samples by dodine selective medium (SM). There was significant difference between these methods in ability of fungi detection. 4 species, *Beauveria bassiana* (in 31 % of samples), *Metarhizium anisopliae* (8 %), *Isaria farinosa* (6 %) and *Isaria fumosorosea* (6 %) were detected by GBM. Only 3 species *B. bassiana* (in 36 % samples), *M. anisopliae* (37 %), and *I. fumosorosea* (9 %) were detected by SM. *B. bassiana* preferred natural habitats, mainly forests, however it frequently occurred in other habitats too. Occurrence of *I. farinosa* was strictly limited to forest habitats. Occurrence of *I. fumosorosea* was highest in samples from hedgerows. *M. anisopliae* occurred mainly on unshielded areas (fields and meadows) and it was not negatively affected by intensive agriculture. Significant relations among investigated factors (altitude, soil pH, habitat type, geographical location) were found. Occurrence of *B. bassiana* and *I. farinosa* increased, while *M. anisopliae*

decreased with higher altitude and lower pH value. 45 isolates *B. bassiana*, were used for laboratory testing against *Ostrinia nubilalis* larvae. Mortality at 14<sup>th</sup> day was in range 43 - 97 % and lethal time LT50 was in range 3,8 - 17,8 days. There were not significant relations between mortality of *O. nubilalis* and origin of isolates (altitude, soil pH, habitat type, geographical location). PCR-RFLP analysis of rDNA with 111 samples of *B. bassiana* revealed only 2 haplotypes. 104 haplotypes were identified by PCR ISSR analysis using 6 primers. Dendrogram with 4 branches was constructed using hierarchical cluster analysis. Isolates within branches P1, P2 a P3 had PCR RFLP haplotype A, while isolates with haplotype B were in branch R. There was observed low genetic variability within branches and high variability among them. Based on this, we supposed that minimal 2 cryptic species exist within *Beauveria bassiana* s.l. in Slovakia. Isolates with PCR-RFLP haplotype A were mainly from fields and meadows, while large part of isolates with haplotype B originated from forests. There was not significant difference between haplotype and ability of isolate to kill *O. nubilalis* larvae.

Key words: entomopatogenic fungi, *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria*, *Ostrinia nubilalis*, ISSR, PCR-RFLP

## Úvod

Entomopatogénne huby sú významným regulačným faktorom ovplyvňujúcim populácie hmyzu. Už viac ako storočie sa veľa autorov zaoberá ich biológiou, ekológiou ale aj možnosťou využiť ich jedinečné vlastnosti v prospech človeka. V poľnohospodárstve, ale aj v lesníctve, sa vyskytujú druhy hmyzu, ktoré pri svojom premnožení môžu spôsobiť vážne škody. Entomopatogénne huby sú pre človeka zaujímavé hlavne z pohľadu možnosti regulácie týchto druhov. Na tento účel sa v praxi využíva niekoľko druhov entomopatogénnych húb. O úspechu týchto húb pri regulácii škodlivých činiteľov rozhoduje nielen ich schopnosť napádať a zabíjať hostiteľa, ale aj ich schopnosť zotrvať v prostredí a poskytovať tak dlhodobejšiu ochranu. Táto schopnosť je daná predovšetkým adaptáciou na rôzne faktory a prírodné podmienky prostredia. Nakoľko existuje veľa faktorov, ktoré sú špecifické pre konkrétne prostredie je potrebné poznať ich vplyv na prirodzené populácie týchto húb. V celosvetovom meradle sa pozornosť upriamuje predovšetkým na entomopatogénne huby z rodov *Beauveria* a *Metarhizium*. Prirodzeným prostredím týchto húb je pôda, v ktorej často prežívajú podstatnú časť svojho životného cyklu a zároveň je depozitom ich infekčných štruktúr (spór). Preto práve pôda je najčastejšie skúmaným miestom ich výskytu. Informácie o výskyte konkrétnych druhov týchto húb je možné považovať za indikátor schopnosti týchto druhov prežívať v skúmanom prostredí. Podobne je možné, že v rámci jedného druhu existujú rôzne populácie adaptované na odlišné prostredie.

Hodnotenie výskytu entomopatogénnych húb v pôde je predmetom záujmu vedcov v rôznych krajinách sveta, avšak na Slovensku doteraz takáto štúdia nebola urobená. V našej práci sme sa zamerali predovšetkým na výskyt jednotlivých druhov v rôznych ekologických podmienkach. Podobne nás zaujímala genetická štruktúra populácií huby *Beauveria bassiana*, ktorá je v podmienkach mierneho pásma považovaná za najperspektívnejšiu v ohľade potenciálneho využitia ako bioagens. Zároveň sme sa pokúsili v laboratórnych podmienkach vyselektovať izoláty tejto huby s vysokou schopnosťou napádať vijačku kukuričnú (*Ostrinia nubilalis*). Tieto izoláty by po ďalšom skúšaní mohli mať potenciálne využitie ako bioagens proti tomuto významnému škodcovi kukurice.

## Prehľad o súčasnom stave riešenej problematiky

Bolo popísaných najmenej 90 rodov a viac než 700 druhov húb, o ktorých je známe, že sú patogénne pre článkonožce, predovšetkým hmyz, avšak iba niekoľko z nich má potenciál na využitie v ochrane rastlín (Hajek, 1997). Najčastejšie sa vyskytujúce a súčasne z pohľadu

ochrany rastlín najviac skúmané sú predovšetkým asexuálne štádia (anamorfy) húb patriacich do oddelenia Ascomycota a radu Hypocreales. Od 60-tych rokov dvadsiateho storočia bolo do používania uvedených veľa prípravkov určených na ochranu rastlín založených na entomopatogénnych hubách. Táto snaha o čo najintenzívnejšie využívanie entomopatogénnych húb je v kontraste s malým úsilím, ktoré sa venuje výskumu ich základnej ekológie (Meyling a Eilenberg, 2007). Štúdie zaoberajúce sa biodiverzitou v agroekosystémoch a prínosom prirodzených funkcií ekosystému k poľnohospodárskej alebo lesníckej produkcii zvyčajne ignorujú prispievanie entomopatogénnych mikroorganizmov k prirodzenej regulácii škodcov (Tscharrntke *et al.*, 2005).

Oproti entomopatogénnymi vírusom a baktériám, huby takmer vždy prenikajú do tela hmyzu cez kutikulu. Usmrtenie hostiteľa je kombináciou viacerých faktorov: mechanického poškodenia tkanív, odčerpávania živín a vplyvu toxínov, ktoré huba produkuje. Prežívanie entomopatogénnych húb závisí predovšetkým od vhodného hostiteľa, na ktorom môžu rásť a vytvárať infekčné štruktúry (spóry) (Anderson a May, 1981) Kľúčovou udalosťou pri rozvoji epizootie je predovšetkým tvorba spór a rozširovanie infekčných častíc (Inglis *et al.*, 2001). Infekčné častice entomopatogénnych húb z radu Hypocreales sú rozširované pasívne, pričom najväčší podiel na tomto má počasie, hlavne vietor a zrážky (Hajek, 1997; Shah a Peel, 2003). Entomopatogénne huby môžu byť rozširované aj hmyzom a spóry sa ukladajú v pôde alebo na miestach, ako je napríklad fyloplán rastlín (Meyling a Eilenberg, 2006a) Je známe, že *B. bassiana* môže kolonizovať pletivá rastlín a rásť v nich ako endofyt, význam tohoto štádia v ekológii tejto huby však nie je celkom známy (Meyling a Eilenberg, 2007) Na zisťovanie výskytu entomopatogénnych hub z radu Hypocreales sa najčastejšie využívajú metódy citlivého hmyzu a tiež boli vyvinuté rôzne druhy selektívnych agarových živných pôd. Na základe výskumov (Vänninen, 1996; Meyling a Eilenberg, 2006; Chandler *et al.*, 1997; Bidochka *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2008) je možné konštatovať, že entomopatogénnym hubám sa výrazne viac darí v pôde na neporušených stanovištiach než na intenzívne využívaných. Pestovanie plodín na ornej pôde a predovšetkým intenzívne obrábanie negatívne ovplyvňujú populácie týchto húb. Remízky, ako typický poloprirodzený biotop, sú vo všeobecnosti útočiskom pre faunu a flóru, ktorá nie je schopná prežívať na poľnohospodársky využívaných pôdach (Marshall a Moonen, 2002). Mechanické rozrušovanie povrchu pôdy ovplyvňuje inokulum entomopatogénnych húb tiež tým, že sa spóry dostávajú bližšie k povrchu pôdy, na ktorom nie je vegetačný kryt. Tu môžu byť poškodzované UV žiarením a vysokou teplotou. Chemické látky využívané v ochrane rastlín, najmä fungicídy, môžu tiež negatívne ovplyvniť populácie entomopatogénnych húb, ktoré sa v pôde a na vegetácii vyskytujú (Klingen a Haukeland 2006)

*B. bassiana* má haploidný jadrový genóm o veľkosti 34-44 MB, pozostávajúci zo 7-8 chromozómov, pričom ich počet nie je stály. Podobne ako pre ostatné organizmy sú základné zdroje genetickej variability entomopatogénnych hub mutácie a rekombinácie. V rámci druhu sú tieto procesy doplnené ešte tokom génov medzi geneticky odlišnými populáciami, ktorý môže nastať, ak sa spóry huby z jednej populácie rozšíria do inej populácie (Burdon a Silk, 1997). *B. bassiana* je považovaná za hubu rozmnožujúcu sa klonálne prostredníctvom mitospór (Rehner a Buckley, 2005), aj keď nedávno bolo dokázané jej fyzické aj fylogenetické spojenie s teleomorfo *Cordyceps bassiana* Z. Z. Li, C. R. Li, B. Huang a M. Z. Fan (2001) v Ázii (Li *et al.*, 2001; Rehner a Buckley, 2005). Hoci existenciu teleomorfy, a teda aj sexuálnej rekombinácie, inde ako v Ázii nemožno vylúčiť, doposiaľ nebola na iných miestach identifikovaná. Ku genetickej rekombinácii nepohlavne sa rozmnožujúcich húb, vrátane *B. bassiana* môže dôjsť procesom somatickej hybridizácie, kedy hýfy vegetatívne kompatibilných kmeňov spolu fúzujú a vzniká heterokaryontné mycélium, pričom dochádza aj k výmene mimojadrového genetického materiálu. Výskum populačnej genetickej rodu

*Beauveria* sp. je komplikovaný tým, že chýbajú kritériá a tiež vhodné genetické markery na presnú identifikáciu druhov a populácií, ktoré by umožnili objasniť vnútrodruhové vzťahy (Rehner, 2005). Preto niekedy nie je možné určiť, či skúmané populácie nie sú v skutočnosti súborom rôznych kryptických druhov (Bidochka *et al.*, 2002; Uma Devi *et al.*, 2006), medzi ktorými rekombinácia prirodzene neprebíha. Populačné štúdie entomopatogénnych húb sa často zameriavajú na prirodzený výber, konkrétne na selekčný tlak vyvolaný hositeľom resp. lokálnou adaptáciou (Bidochka *et al.*, 2001; Enkerli *et al.*, 2001; Maurer *et al.*, 1997a).

Zo štúdií ktoré sa venujú štruktúre populácii je možné vyvodit' štyri typy záverov, čo sa týka genetickej príbuznosti kmeňov *B. bassiana*:

1. Kmene z rovnakej geografickej lokality vykazujú vysoký stupeň genetickej podobnosti - RAPD, ISSR, sekvenovanie ITS a EF1- $\alpha$  regiónu, AFLP (Glare a Inwood, 1998; Valderrama *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2005a; Aquino de Muro *et al.*, 2005; Rehner a Buckley, 2005, Fernandes *et al.*, 2009).
2. Genetická príbuznosť kmeňov je spojená s hositeľským druhom hmyzu - RAPD, RFLP, VCG, telomérové próby (Maurer *et al.*, 1997a; Urtz a Rice, 1997; Couteaudier a Viaud, 1997; Castrillo a Brooks, 1998).
3. Nie je evidentná spojitosť genotypu kmeňov s geografickým pôvodom alebo hositeľom - RAPD, izoenzýmy, ITS-RFLP (Riba a Mierzejewska, 1986; St. Leger *et al.* 1992a; Bidochka a Khachatourians, 1994; Rivera *et al.*, 1997; Berretta *et al.*, 1998; Gaitan *et al.*, 2002).
4. Spojitosť určitých genetických skupín a biotopu v ktorom sa vyskytujú - allozýmy, SSR, EF1- $\alpha$ , rDNA ITS (Bidochka *et al.*, 2002; Chandler *et al.*, 2007, Meyling *et al.*, 2009)

Podobné pozorovania vyplývajú aj zo štúdií iných entomopatogénnych húb - *Metarhizium anisopliae* (St Leger *et al.*, 1992b; Bidochka *et al.*, 2001) a *Paecilomyces fumosoroseus* (Tigano-Milani *et al.*, 1995; Cantone a Vandenberg, 1998; Fargues *et al.*, 2002).

Kukurica siata (*Zea Mays*, L.) je jednou z kľúčových poľnohospodárskych plodín. Ochrana tejto plodiny je dôležitá pre ekonomiku, ako aj pre potravinovú bezpečnosť. Infekcia hubou *B. bassiana* sa vyskytuje v populáciách *O. nubilalis* pomerne často a je jedným z prirodzených regulačných faktorov tohto škodcu (Phoofolo *et al.*, 2001). Prvé úspešné pokusy s aplikáciou huby *B. bassiana* proti larvám *O. nubilalis* boli uskutočnené už začiatkom 20. storočia. Pri porovnaní účinnosti suspenzie spór a suchých spór huby *B. bassiana* proti *O. nubilalis* v laboratórnych podmienkach bolo zistené, že huba aplikovaná v suspenzii zabíjala hositeľa preukazne rýchlejšie. Prvé mŕtve jedince boli pozorované už po 48 hodinách. (Cagáň a Uhlík, 1999). Veľa autorov sa zaoberalo štúdiom účinnosti huby *B. bassiana* proti *O. nubilalis* v poľných podmienkach s rôznymi výsledkami. Napriek tomu, že aplikácia *B. bassiana* neprináša pri potláčaní škodlivosti *O. nubilalis* vždy najlepšie výsledky, predpokladá sa, že táto si dokáže vytvoriť len veľmi malú (ak vôbec nejakú) rezistenciu. Toto je považované za hlavný prínos použitia tejto huby v časoch masívneho využívania Bt toxínov, pri ktorých existujú dohady o vytvorení novej rezistencie (Hardin, 1991).

## Ciele práce

- Stanoviť výskyt, druhové spektrum a rozšírenie entomopatogénnych húb z radu Hypocreales v pôdnom prostredí na území Slovenskej republiky s využitím citlivého hmyzu *Galleria mellonella* a selektívneho agarového média.
- Stanoviť množstvo infekčných častíc jednotlivých druhov entomopatogénnych húb identifikovaných v pôdnych vzorkách.

- Posúdiť vplyv vybraných faktorov prostredia (typ biotopu, nadmorská výška, pH pôdy a geografická poloha) na výskyt jednotlivých druhov entomopatogénnych húb v pôdnych vzorkách.
- Stanoviť v laboratórnych podmienkach virulenciu vybraných izolátov *B. bassiana* proti vijačke kukuričnej *Ostrinia nubilalis*.
- Posúdiť vplyv podmienok prostredia z ktorých pochádzajú izoláty *B. bassiana* na ich schopnosť napádať larvy *O. nubilalis*.
- Zhodnotiť genetickú diverzitu vybraných izolátov húb z rodu *Beauveria* pomocou metód PCR- RFLP rDNA a ISSR-PCR.
- Posúdiť možnú spojitosť medzi genotypmi izolátov *B. bassiana*, podmienkami prostredia, z ktorého izoláty pochádzajú a ich virulenciou k larvám *O. nubilalis*.

## **Materiál a metódy**

### **Analýza výskytu entomopatogénnych húb**

Na analýzu prítomnosti entomopatogénnych húb v pôdach Slovenska sme odobrali vzorky z 901 lokalít. Vzorky sme odobrali v období od polovice augusta do konca októbra roku 2008. Lokality boli vyberané náhodne po celom území Slovenska s ohľadom na dodržanie vzdialenosti medzi dvomi vzorkami menšej ako 10 kilometrov. Vzorky sme odobrali z rôznych biotopov (lesný, lúčny, poľný, remízky), pričom bol zvolený vždy biotop typický pre geograficko-klimatické podmienky. Lúčny biotop zahŕňal trvalé trávne porasty, teda lúky a pasienky. Kategóriu remízky predstavovali neobrábané biotopy na nezalesnenom území s výskytom stromov, krovín a burinnej vegetácie, prevažne medzi lúčnymi a poľnými biotopmi. Pri vzorkách z lesných biotopov boli zaznamenané údaje o type lesa (ihličnatý, listnatý, zmiešaný), ako aj o prevládajúcom druhu stromov. Pri vzorkách z poľných biotopov bol špecifikovaný typ pestovanej kultúry a pestovaná plodina. Jednotlivé plodiny pestované na ornej pôde sme zaradili do troch skupín. Hustosiaste plodiny zahŕňali predovšetkým obilniny, repku, ľan, sóju a hrach. Širokoriadkové plodiny predstavovali kukuricu, slnečnicu, cukrovú repu a zemiaky. Skupina viacročné krmoviny pozostávala z lucerny a ďateliny. Každá lokalita bola charakterizovaná zemepisnými súradnicami podľa GPS a nadmorskou výškou.

### **Odber pôdnych vzoriek a ich spracovanie**

Každá vzorka bola zložená z piatich čiastkových vzoriek. Miesta odberu čiastkových vzoriek boli situované v kruhu s priemerom 100 m. Čiastkové vzorky boli odobierané lopatkou z hĺbky 0-15 cm a hmotnosť každej bola približne 200 g. Vzorka použitá na zisťovanie prítomnosti entomopatogénnych húb bola získaná dokonalým zmiešaním čiastkových vzoriek a následným odstránením veľkých častíc (kamene väčšie ako 1 cm, listy, korene). Vzorky boli až do svojho použitia skladované v tme, pri teplote 4 °C. Pre každú vzorku bolo pomocou pH metra zmerané  $pH_{H_2O}$  (10 g pôdy v 25 ml  $H_2O$ ) (Pansu a Gautheyrou, 2006). Z každej vzorky bolo odvážených 10 g, vysušených pri 105 °C 2 hodiny a opätovne zvážených (Pansu a Gautheyrou, 2006). Aktuálna vlhkosť bola stanovovaná v čase, keď sa pripravovala suspenzia pre selektívne agarové médium.

### **Izolácia húb pomocou citlivého hmyzu**

Na izoláciu entomopatogénnych húb zo vzoriek pôdy bola použitá metóda s využitím citlivého hmyzu *G. mellonella* (galleria bait method – GBM) (Zimmerman, 1986). Larvy boli chované na upravenom médiu podľa autorov Ajanta *et al.* (2008). Do 500 g pôdy v plastovom

boxe s rozmermi 150 x 100 x 60 mm bolo vložených 10 lariev *G. mellonella* štvrtého až piateho instaru (cca 30 mm larvy). Pôda bola následne navlhčená destilovanou vodou pomocou rozprašovača (Meyling, 2007). Boxy boli uzavreté a otočené hore dnom, aby larvy boli nútené preliezať cez pôdu, a teda mať čo najviac možností získať infekciu spórami v pôde. Tento proces prebiehal pri teplote 22 °C a stálej tme. Od piateho dňa boli boxy každý druhý deň kontrolované a mŕtve larvy boli premiestnené do vlhkých komôrok, kde rast mycélia a sporulácia potvrdili prítomnosť entomopatogénnej huby. Entomopatogénne huby boli identifikované podľa makroskopických a mikroskopických znakov. Následne boli tieto huby inokulované na Sabouradov dextrózový agar (Merck KGaA) s prídavkom antibiotík (chloramfenikol, 50 mg.l<sup>-1</sup>)(Calbiochem).

### **Metóda izolácie s využitím selektívneho média**

Nakoľko izolácia s využitím citlivého hmyzu neumožňuje kvantitatívnu analýzu množstva spór entomopatogénnych húb v pôdnej vzorke, bola na tento účel použitá metóda selektívneho agarového média podľa Strasser *et al.*, 1996. Do sterilnej nádoby (200 ml) s viečkom sme navážili 10 g pôdy a následne zaliali po označený objem 100 ml sterilnou destilovanou vodou. Pre dokonalé rozmiešanie bola zmes premiešavaná na trepačke (Biosan OS10, 200 kmitov za minútu) po dobu 20 minút. Do jednej Petriho misky so selektívnym médiom sme napipetovali 0,5 ml suspenzie. Pre každú vzorku boli inokulované 3 Petriho misky. Petriho misky boli inkubované v tme pri teplote 22 °C ± 2 °C po dobu 2 týždne. Po tejto dobe boli identifikované a spočítané vyrastené kolónie. Množstvo kolónií bolo vyjadrené na gram suchej pôdy.

### **Štatistické a mapové hodnotenie**

Údaje o výskyte entomopatogénnych húb zistené pomocou citlivého hmyzu majú kvalitatívny charakter (prítomnosť, resp. neprítomnosť huby) a na ich štatistické hodnotenie bol využitý chí kvadrát test nezávislosti (cross tabulation and chi square). Pre potreby tohto testu sme vytvorili 4 kategórie (intervaly) pre každý z hodnotených faktorov. Pre hodnotu pH<sub>H2O</sub> pôdy to boli kategórie: kyslá do 5,5, mierne kyslá 5,5-6,5, neutrálna 6,5 - 7,5 a zásaditá nad 7,5. Na kategorizáciu nadmorskej výšky sme použili stupne ktoré odražajú pôvodné typy vegetácie. Tieto kategórie boli nasledovné do 200 m n. m., 200 - 350 m n. m., 350 - 650 m n. m. a nad 650 m n. m.. Pre zemepisnú šírku sme zvolili intervaly do 48°, 48 - 48,5°, 48,5 - 49°, viac ako 49°. Zemepisná dĺžka bola kategorizovaná do intervalov (do 18°, 18 - 19,5°, 19,5 - 21°, viac ako 21°). Všetky intervaly ktorých sa to týka boli zľava uzavreté a sprava otvorené. Na hodnotenie vplyvu faktorov na výskyt húb bola použitá metóda logistickej regresie. Pre potreby zistenia vplyvu narušenia biotopu na výskyt entomopatogénnych húb bolo nutné zoradiť tieto kategorické premenné (biotopy) do určitého poradia. My sme tak urobili na základe predpokladanej miery zásahov človeka do týchto biotopov. Výsledné poradie bolo nasledovné 1=lesný-najmenej narušený biotop, 2=remízka, 3=lúčny biotop, 4=poľný, najviac narušovaný biotop.

Údaje získané zo selektívneho média majú charakter kvalitatívny, ale aj kvantitatívny (množstvo kolónií na gram pôdy), preto bola okrem chí kvadrát testu nezávislosti a logistickej regresie použitá aj analýza rozptylu (One way ANOVA). Nakoľko podmienkou použitia analýzy rozptylu je normálne rozdelenie vstupného súboru údajov, boli dáta o množstve CFU.g<sup>-1</sup> transformované podľa vzorca

$$T_{cfu} = \log_{10}(CFU+1).$$

Tieto transformované údaje (T<sub>cfu</sub> namiesto CFU) boli použité pri štatistickej analýze vplyvu skúmaných faktorov na množstvo CFU.g<sup>-1</sup> jednotlivých druhov entomopatogénnych húb v pôde pomocou analýzy rozptylu. Na hodnotenie vzťahov medzi množstvom CFU.g<sup>-1</sup> a hodnotou pH nadmorskou výškou alebo geografickou polohou bola použitá jednoduchá regresia (simple regression). Súradnice pre jednotlivé lokality získané pomocou GPS boli



prevedené do súradnicového systému S-JTSK a ďalej spracovávané v mapovom systéme ArcGIS (ERSI).

Pre potreby genetickej analýzy húb je nutné, aby všetky použité spóry alebo bunky mycélia mali rovnakú genetickú informáciu. Dá sa to dosiahnuť tak, že celá použitá biomasa huby pochádza z jednej spóry (monospórový izolát). Monospórové izoláty boli vytvorené podľa metódy autorov Ho a Ko (1997). Takto získané kultúry boli použité na genetickú analýzu, na zisťovanie mortality *O. nubilalis* a boli uložené do mykotéky katedry ochrany rastlín Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre. 108 izolátov *B. bassiana* sme náhodne vybrali zo súboru izolátov získaných s využitím citlivého hmyzu a podrobili genetickej analýze. Okrem toho boli do analýzy zahrnuté nasledovné izoláty: Ger01, izolované z napadnutej larvy *O. nubilalis* v Nemecku; Pol11 izolované s využitím *G. mellonella* z pôdy získanej z kukuričného poľa južne od mesta Wroclaw, Poľsko; Izolát ARSEF 6011 a izolát ARSEF 6023, ktorý bol predstaviteľom druhu *Beauveria brongniartii*. Izoláty 6011 a 6023 boli poskytnuté zo zbierky entomopatogénnych húb ARSEF (ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures, U.S. Department of Agriculture, ARS Plant Protection Research Unit, Ithaca, NY USA).

### **Genetická analýza vybraných izolátov *Beauveria* spp.**

Všetky huby boli ako čisté kultúry kultivované na Sabouraud dextrózovom agare (Merck KGaA) v Petriho miskách. Spóry týchto húb boli inokulované do tekutého média (Glukóza 20g, Peptón 10g, Kvasničný autolyzát 2g chloramfenikol 100mg, voda 1l) v 100 ml Erlenmeyerových bankách. Objem média v jednej banke bol 60 ml. Médium bolo sterilizované autoklávaním. Po jeho ochladení sme ho inokulovali spórami z Petriho misiek. Submerzná kultivácia prebiehala na trepačke (Biosan OS10) pri teplote 25 °C a frekvencii 160 kmitov za minútu 5 - 7 dní, alebo dovtedy, pokiaľ sa nevytvorilo dostatočné množstvo biomasy na izoláciu DNA (max. 14 dní).

#### **Izolácia DNA**

Po prefiltrovaní cez filtračný papier sme získané mycélium vysušili ďalším filtračným papierom a odvážili. Rozrušenie bunkovej steny sme robili mechanicky, rozdrvením mycélia spolu s prečisteným morským pieskom v trecej miske. Po rozdrvení bol pridaný lyzačný roztok (Doyle a Doyle, 1987). Následne sme 1,5 ml zmesi napipetovali do 1,5 ml mikroskúmaviiek a nechali inkubovať do ďalšieho dňa pri 65 °C vo vodnom kúpeli. Na druhý deň bola zmes centrifugovaná 15 min pri 12 000 g a 1 000 µl supernatantu bolo odpipetovaných do novej označenej mikroskúmavky. Po pridaní 500 µl zmesi fenol/chloroform/izoamylalkohol (25:24:1) a pretrepaní na vortexe bola emulzia centrifugovaná 5 min pri 12 000 g. Nukleové kyseliny boli zo zmesi vyzrážané za použitia 800 µl izopropylalkoholu. RNA sme zo zmesi nukleových kyselín odstránili pridaním 5 µl RN-ázy (A/T1 mix; Fermentas). Výťažok DNA bol overený vizuálne po elektroforéze na 1 %-nom agarózovom géle, a meraním na spektrofotometri. Získaná DNA bola nariedená na koncentráciu 100ng.µl<sup>-1</sup>.

#### **PCR-RFLP regiónu jadrovej rDNA**

Pre RFLP analýzu bola vybraná časť regiónu jadrovej DNA kódujúcej ribozomálnu RNA. Tento región zahŕňal malú časť 18S rDNA, ITS1, 5,8 rDNA, ITS2 a malú časť 28S rDNA. PCR amplifikácia prebiehala s použitím primerov ktoré použili aj Neuvéglise *et al.* (1994), a to:

PN3: 5'CGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATC-3' a

PN16: 5'-TCCCTTCAACAATTTACAG-3'

Nasyntetizované fragmenty boli rozdeľované v 1,5 %-nom agarózovom géli. Ich veľkosť bola určená porovnaním so štandardom GeneRuler low range (Fermentas).

Nasyntetizované fragmenty boli štiepené 4 reštrikčnými enzýmami - AluI, MspI, HaeIII, HhaI (Fermentas)

Amplifikačná reakcia prebiehala v 50  $\mu$ l reakčnej zmesi (10X DreamTaq DNA buffer 5  $\mu$ l, dNTP mix (10 mM) 1  $\mu$ l, DreamTaq DNA polymerase (5 U. $\mu$ l<sup>-1</sup>) 0,25  $\mu$ l, Primer PN3 a Primer PN16 po 0,25  $\mu$ l, DNA (100 ng.  $\mu$ l<sup>-1</sup>) 1  $\mu$ l, Utračistá voda, 42,5  $\mu$ l). Reakcia prebiehala v termocykléri MJ Mini (Biorad) za nasledovných teplotných a časových podmienok (3 minúty 95°C; 40 cyklov po 30s 95°C, 30s 56°C, 90s 72°C; 7 minút 72°C).

Reakčná zmes pre RFLP analýzu pozostávala z 10  $\mu$ l DNA nasyntetizovanej v PCR reakcii, 2  $\mu$ l 10X FastDigest® buffer (Fermentas), 1  $\mu$ l konkrétneho enzýmu (Fermentas) a 17  $\mu$ l ultračistej vody. Reakcia prebiehala pri 37 °C po dobu 5 minút a následne boli rozštiepené fragmenty analyzované na 1,5 %-nom agarózovom géli. Ich veľkosť bola určená porovnaním so štandardom, ktorým bol ladder GeneRuler low range (Fermentas).

### ISSR-PCR

Na amplifikáciu mikrosatelitných medzioblastí boli vybrané 3 ISSR markery, ktoré boli použité v predchádzajúcej štúdií (Estrada *et al.*, 2007) a vykazovali vysoké hodnoty polymorfizmu, a to primery 809, 873, 885 a primery Bis06, Bis12 a Bis16 použité inými autormi (Wang *et al.* 2005a). Sekvencie všetkých primerov sú uvedené v tabuľke (Tabuľka 1).

Tabuľka 1 Sekvencie primerov použitých na PCR ISSR analýzu

Primer	Sekvencia
809	5' AGAGAGAGAGAGAGG 3'
873	5' GACAGACAGACAGACA 3'
885	5' BHBGAGAGAGAGAGAGA 3'
Bis06	5' GAGAGAGAGAGAGAGAGG 3'
Bis12	5' ACACACACACACACT 3'
Bis16	5' ACACACACACACACACYC 3'

B=G+T+C; H=A+T+C; Y=C+T

Amplifikačná reakcia prebiehala v 50  $\mu$ l reakčnej zmesi (10X DreamTaq DNA buffer 2,5  $\mu$ l, dNTP mix (10 mM) 0,5  $\mu$ l, DreamTaq DNA polymerase (5 U. $\mu$ l<sup>-1</sup>) 0,125  $\mu$ l, Primer 0,25  $\mu$ l, DNA (100 ng.  $\mu$ l<sup>-1</sup>) 0.6  $\mu$ l, Utračistá voda, 20,5  $\mu$ l). Reakcia prebiehala v termocykléri MJ Mini (Biorad) za nasledovných teplotných a časových podmienok (3 minúty 95°C; 41 cyklov po 30s 95°C, 30s 52°C, 90s 72°C; 7 minút 72°C).

Nasyntetizované fragmenty boli rozdeľované v 1 %-nom agarózovom géle. Ich veľkosť bola určená porovnaním so štandardom, ktorým bol ladder GeneRuler 100 bp plus (Fermentas). Na potvrdenie reprodukovateľnosti a zhodnosti elektroforetických profilov boli urobené dve opakovania PCR reakcií pre každý izolát. V prípade odlišností boli do hodnotenia zarátané iba prúžky, ktoré boli nasyntetizované v obidvoch opakovaniach.

### Spracovanie a vyhodnocovanie výsledkov

Elektroforeogramy boli spracované dokumentačným systémom UltraLum a vyhodnotené v programe UltraQuant, pričom výsledky boli manuálne skorigované podľa objektivity prítomnosti, resp. neprítomnosti nasyntetizovaných prúžkov. Výsledný fingerprint bol spracovaný do podoby binárnej matice na základe prítomnosti/neprítomnosti DNA fragmentu na určitej pozícii v dráhe. Z matice bol pre každú dvojicu dráh vypočítaný index genetickej vzdialenosti  $DI_{NL}$  podľa autorov Nei a Li (1979). Štatistické vyhodnotenie genetickej

vzdialenosti izolátov hierarchickou zhlukovou analýzou metódou najbližšieho suseda (neighbour joining) (Saitou a Nei, 1987). Zaradenie izolátov do vetiev dendrogramu bolo analyzované použitím chí kvadrát testu nezávislosti alebo použitím analýzy rozptylu (pre pH pôdy a nadmorskú výšku). Rovnako boli analyzované aj haplotypy získané PCR-RFLP analýzou rDNA. Vzájomná genetická vzdialenosť jednotlivých izolátov bola porovnaná s ich geografickou vzdialenosťou pomocou lineárnej regresie.

### **Zisťovanie účinnosti *B. bassiana* proti *O. nubilalis***

Z izolátov *B. bassiana* získaných pomocou metódy citlivého hmyzu a súčasne geneticky analyzovaných bolo náhodným výberom vybraných 45 izolátov, ktoré sme použili na zistenie ich účinnosti proti vijačke kukuričnej. Na testovanie virulencie a patogenity izolátov sme použili larvy štvrtého instaru získané z laboratórneho chovu. Larvy boli chované na umelom živnom médiu (Nagy, 1974). Z kultúr jednotlivých izolátov *B. bassiana* odobrali spóry, z ktorých bola vytvorená spórová suspenzia s koncentráciou  $10^7$  spór na 1 ml. Larvy vijačky sme do tejto suspenzie ponorili na dobu 30 sekúnd. Experiment sme robili pre každý izolát v troch opakovaníach, pričom v každom opakovaní bolo použitých 10 lariev. Ošetrované larvy sme umiestnili do plastových pohárikov (priemer 60 mm, výška 40 mm, perforované viečko), v ktorých sa nachádzal kúsok (10 x 10 x 10 mm) živného média. Larvy boli chované pri teplote 25 °C a svetelnom režime 16/8 (svetlo/tma). Larvy sme kontrolovali každé 2 dni, pričom mŕtve jedince boli preložené do Petriho misky s vlhkým filtračným papierom, kde sporulácia potvrdila infekciu hubou. Hodnotenie mortality v jednotlivých dňoch bolo štatisticky hodnotené pomocou jednofaktorovej analýzy rozptylu. Letálny čas LT50 bol vypočítaný s použitím probitovej analýzy (Finney, 1971, 1979)

### **Výsledky a diskusia**

Celkom bolo odobraných 901 vzoriek pôdy, z ktorých 231 (25 %) pochádzalo z lesného biotopu, 177 (20 %) z lúčnych biotopov, 448 (50 %) z poľných biotopov a 45 (5 %) z remízok. 85 vzoriek malo pH pôdy nižšie ako 5,5, 187 vzoriek v rozmedzí 5,5 - 6,5, 358 v rozmedzí 6,5 - 7,5 a 271 vzoriek malo pH vyššie ako 7,5. 290 odberných lokalít bolo situovaných v polohách s nadmorskou výškou nižšou ako 200 m n. m., 249 v pásme od 200 do 350 m n. m., 242 medzi 350 a 650 m n. m. a 120 vzoriek bolo odobraných v polohách nad 650 m n. m.

V pôdných vzorkách z územia Slovenskej republiky sme zistili výskyt štyroch druhov entomopatogénnych húb a to: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria farinosa* a *Isaria fumosorosea*. Tieto isté druhy zistili v rôznych krajinách aj iní autori, napr. vo Fínsku (Vänninen, 1996), v Dánsku (Meyling a Eilenberg, 2006), v Anglicku (Chandler *et al.*, 1997), v Severnej Amerike (Bidochka *et al.*, 1998), alebo Číne (Sun *et al.*, 2008). Okrem toho niektorí autori uvádzajú v pôdach aj výskyt iných entomopatogénnych húb (napr. *Lecanicillium* spp., *Tolypocladium* spp., alebo Entomophthorales), avšak ich výskyt v pôde býva výrazne nižší (Klingen *et al.*, 2001; Keller *et al.*, 2003). Zistené množstvo, ako aj druhové spektrum, je závislé od použitej metódy zisťovania a v prípade použitia citlivého hmyzu aj na jeho druhu (Klingen *et al.*, 2001). Pri použití *G. mellonella* ako citlivého hmyzu sme zistili v pôde 4 druhy entomopatogénnych húb, pričom pri použití selektívneho média sme zaznamenali len 3 druhy *B. bassiana*, *M. anisopliae* a *I. fumosorosea*. Je pravdou, že použité selektívne médium bolo vyvinuté predovšetkým na izoláciu huby *B. bassiana*. Jeho potenciál zachytiť v dostatočnej miere aj *M. anisopliae* popísali Keller *et al.* (2003). My sme s použitím *G. mellonella* zistili preukazne nižší výskyt *M. anisopliae* ( $\chi^2=17,639$ ;  $P<0,001$ , Pearsonovo  $R=0,14$ ), je však možné že to závisí od použitej populácie *G. mellonella*, ktorá môže byť menej citlivá na infekciu *M. anisopliae*. Rovnako bola táto huba detegovaná oboma metódami v 582 vzorkách. Podobné rozdielnosti vo výskyte entomopatogénnych húb zistenom rôznymi metódami popísali aj Landa *et al.* (2002) pri skúmaní vzoriek pôdy

z Českej republiky. Rozdielnosť v schopnosti jednotlivých metód zachytiť entomopatogénne huby bola zistená aj pri druhu *B. bassiana* (560 vzoriek rovnako detegovaných;  $\chi^2=21,474$ ;  $P<0,001$ ; Pearsonovo  $R=0,15$ ) a v menšej miere aj pri *I. fumosorosea* (817 rovnako detegovaných;  $\chi^2=82,763$ ;  $P<0,001$ , Pearsonovo  $R=0,30$ ). To, že v niektorých vzorkách boli entomopatogénne huby zistené pomocou *G. mellonella*, pričom neboli zistené použitím selektívneho média, vysvetľujeme vyššou citlivosťou tejto metódy, ktorú udáva viacero autorov (Zimmerman, 1986; Keller *et al.*, 2003). Naopak, detekciu húb pomocou selektívneho média vo vzorkách, ktoré boli s využitím *G. mellonella* negatívne, vysvetľujeme možnosťou zachytenia nepatogénnych alebo menej patogénnych kmeňov týchto húb.

Výskyt entomopatogénnych húb s použitím *G. mellonella* bol zistený v 47 % vzoriek. Iní autori zistili s použitím citlivého hmyzu výskyt entomopatogénnych húb v rozsahu od 15 do 96 %. Veľký rozdiel medzi frekvenciou výskytu zistenou týmito autormi mohol byť spôsobený okrem podmienok prostredia a skutočnej prítomnosti infekčných častíc húb v pôde aj mierne odlišnou metodikou. Metodika, ktorú sme použili my, sa najviac podobala metodike využitej na analýzu výskytu entomopatogénnych húb vo Fínsku (Vänninen, 1996). Výskyt zistený touto metódou bol v našej práci na úrovni 31 % *B. bassiana*, 8 % *M. anisopliae*, 6% *I. farinosa* a 6% *I. fumosorosea*. Nami zistený celkový vyšší výskyt entomopatogénnych húb súvisel predovšetkým s vyšším výskytom druhu *B. bassiana*, ktorý bol súčasne najčastejšie detegovaným druhom. Naopak, prekvapivý je nízky výskyt *M. anisopliae*, ktorý aj v prácach iných autorov v miernom pásme býva na úrovni výskytu *B. bassiana*. Niekoľko autorov však udáva nižší výskyt *M. anisopliae* v pôdach zistený touto metódou (Landa *et al.*, 2002, Meyling a Eilenberg, 2006, Chandler a Davidson, 2007). Napriek tomu, analýza vzoriek pomocou selektívneho média potvrdila, že huba *M. anisopliae* je v pôdach na Slovensku prítomná (37 % pozitívnych vzoriek), a to dokonca častejšie ako *B. bassiana*.

Pomocou selektívneho média bol druh *B. bassiana* zistený v 36 % vzoriek. Pri použití oboch metód bol tento druh vždy detegovaný najčastejšie v lesných biotopoch a tiež bola potvrdená preukazne najvyššia koncentrácia spór tejto huby v lesných pôdach ( $285,34 \text{ cfu.g}^{-1}$   $P<0,001$ ). Priamy vzťah pomocou regresnej analýzy bol potvrdený len pri údajoch zistených selektívnym médiom (odds = 0,823,  $P<0,001$  Hosmer-lemeshow=0,930). Regresia však pracovala s predpokladom, že každý typ biotopu v smere les, remízka, lúka, pole je viac narušený činnosťou človeka než predchádzajúci. Keďže výskyt bol na lúkach, poliach a remízkach podobný, jasná závislosť výskytu tejto huby a stupňa narušenia prirodzeného biotopu nebola potvrdená. Takúto závislosť však uvádza niekoľko autorov (Vänninen, 1996; Chandler *et al.*, 1997; Bidochka *et al.*, 1998; Barker a Barker, 1998; Quesada-moraga *et al.* 2007). Napriek tomu, že regresná analýza pri vzorkách analyzovaných pomocou *G. mellonella* nebola preukazná, je možné s týmto súhlasiť. Súvislosť výskytu tohto druhu a miery zasahovania človeka do biotopu môže byť indikovaná aj tým, že pri menej intenzívnom obrábaní ornej pôdy (viacročné krmoviny) bol výskyt *B. bassiana*, ako aj množstvo  $\text{CFU.g}^{-1}$  v pôde preukazne vyššie (viacročné krmoviny = 493,79; hustosiate plodiny 78,65 širokoriadkové plodiny 52,30; ANOVA,  $P=0,004$ ). Takýto, respektíve podobný jav, popisuje niekoľko autorov, keď pôdoochranné technológie zvyšovali množstvo húb v pôde (Sosa-Gomez a Moscardi, 1994; Bing a Lewis, 1993). Výskyt *B. bassiana* bol najvyšší v pôdach, ktoré mali kyslé pH a so stúpajúcim pH sa znižoval a naopak, so stúpajúcou nadmorskou výškou sa výskyt zvyšoval. Je potrebné pripomenúť, že uvedené podmienky (nižšie pH a vyššia nadmorská výška) sú charakteristické najmä pre lesné biotopy. Bidochka *et al.* (1998) a Vänninen (1996) uvádzajú, že *B. bassiana* je lepšie adaptovaná na chladnejšie podmienky než *M. anisopliae*. Nakoľko v podmienkach Slovenska priemerná ročná teplota klesá o  $0,65 \text{ }^\circ\text{C}$  na každých 100 m nadmorskej výšky, je možné, že aj schopnosť prežívania *B. bassiana* pri nižších teplotách zohráva úlohu pri jej rozšírení vo vyšších polohách. Niektorí autori zistili zmeny vo výskyte entomopatogénnych húb v súlade

s geografickou polohou skúmanej lokality (Vänninen, 1996; Bidochka *et al.* 1998). My sme zistili preukazný vplyv zemepisnej šírky na výskyt *B. bassiana*, pričom so stúpajúcou šírkou bol výskyt častejší, avšak len pri použití selektívneho média. Na druhej strane, korelácia medzi zemepisnou dĺžkou bola preukazná len pri detekcii pomocou *G. mellonella*. Je však opäť možné, že je to spôsobené skôr vzájomnými vzťahmi faktorov, než skutočne geografickou polohou, nakoľko skúmané územie je relatívne malé.

**Tabuľka 2** Frekvencia výskytu entomopatogénnych húb zistených v jednotlivých biotopoch, kategóriách pH pôdy a nadmorskej výšky lokalít, z ktorých vzorky pochádzali

S využitím citlivého hmyzu <i>G. mellonella</i>								
Biotop	Lesný	Lúčny	Poľný	Remízka	Celkom	DF	chi <sup>2</sup>	P
Celkom	231	177	448	45	901			
Pozitívne vzorky	167 (72 %)	75 (42 %)	164 (37 %)	24 (53 %)	430 (48 %)	3	80,689	<0,001
<i>B. bassiana</i>	108 (47 %)	37 (21 %)	115 (26 %)	16 (36 %)	276 (31 %)	3	41,841	<0,001
<i>M. anisopliae</i>	14 (6 %)	20 (11 %)	36 (8 %)	6 (13 %)	76 (8 %)	3	5,057	0,168
<i>I. farinosa</i>	42 (18 %)	4 (2 %)	8 (2 %)	0 (0 %)	54 (6 %)	3	82,235	<0,001
<i>I. fumosorosea</i>	14 (6 %)	16 (9 %)	16 (4 %)	5 (11 %)	51 (6 %)	3	10,019	0,018
pH <sub>H2O</sub>	< 5,5	5,5-6,5	6,5-7,5	> 7,5	Celkom	DF	chi <sup>2</sup>	P
Celkom	85	187	358	271	901			
Pozitívne vzorky	59 (69 %)	108 (58 %)	160 (45 %)	103 (38 %)	430 (48 %)	3	35,140	<0,001
<i>B. bassiana</i>	37 (44 %)	60 (32 %)	106 (30 %)	73 (27 %)	276 (31 %)	3	8,757	0,033
<i>M. anisopliae</i>	6 (7 %)	19 (10 %)	28 (8 %)	23 (8 %)	76 (8 %)	3	1,105	0,776
<i>I. farinosa</i>	17 (20 %)	17 (9 %)	13 (4 %)	7 (3 %)	54 (6 %)	3	41,922	<0,001
<i>I. fumosorosea</i>	2 (2 %)	19 (10 %)	26 (7 %)	4 (1 %)	51 (6 %)	3	19,439	<0,001
Nadm. výška (m n. m.)	< 200	200-350	350-650	> 650	Celkom	DF	chi <sup>2</sup>	P
Celkom	290	249	242	120	901			
Pozitívne vzorky	116 (40 %)	105 (42 %)	138 (57 %)	71 (59 %)	430 (48 %)	3	24,704	<0,001
<i>B. bassiana</i>	77 (27 %)	79 (32 %)	79 (33 %)	41 (34 %)	276 (31 %)	3	3,580	0,311
<i>M. anisopliae</i>	33 (11 %)	14 (6 %)	24 (10 %)	5 (4 %)	76 (8 %)	3	9,324	0,025
<i>I. farinosa</i>	3 (1 %)	7 (3 %)	23 (10 %)	21 (18 %)	54 (6 %)	3	50,627	<0,001
<i>I. fumosorosea</i>	12 (4 %)	9 (4 %)	25 (10 %)	5 (4 %)	51 (6 %)	3	13,596	0,004
S použitím selektívneho agarového média								
Biotop	Lesný	Lúčny	Poľný	Remízka	Celkom	DF	chi <sup>2</sup>	P
Celkom	231	177	448	45	901			
Pozitívne vzorky	151 (65 %)	124 (70 %)	318 (71 %)	34 (76 %)	627 (70 %)	3	3,131	0,372
<i>B. bassiana</i>	143 (62 %)	47 (27 %)	122 (27 %)	15 (33 %)	327 (36 %)	3	88,876	<0,001
<i>M. anisopliae</i>	7 (3 %)	82 (46 %)	229 (51 %)	15 (33 %)	333 (37 %)	3	159,590	<0,001
<i>I. fumosorosea</i>	7 (3 %)	21 (12 %)	39 (9 %)	10 (22 %)	77 (9 %)	3	22,269	<0,001
pH <sub>H2O</sub>	< 5,5	5,5-6,5	6,5-7,5	> 7,5	Celkom	DF	chi <sup>2</sup>	P
Celkom	85	187	358	271	901			
Pozitívne vzorky	63 (74 %)	135 (72 %)	254 (71 %)	175 (65 %)	627 (70 %)	3	4,954	0,175
<i>B. bassiana</i>	61 (72 %)	91 (49 %)	122 (34 %)	53 (20 %)	327 (36 %)	3	92,221	<0,001
<i>M. anisopliae</i>	1 (1 %)	56 (30 %)	146 (41 %)	130 (48 %)	333 (37 %)	3	67,007	<0,001
<i>I. fumosorosea</i>	3 (4 %)	21 (11 %)	38 (11 %)	15 (6 %)	77 (9 %)	3	9,564	0,023
Nadm. výška (m n. m.)	< 200	200-350	350-650	> 650	Celkom	DF	chi <sup>2</sup>	P
Celkom	290	249	242	120	901			
Pozitívne vzorky	201 (69 %)	180 (72 %)	169 (70 %)	77 (64 %)	627 (70 %)	3	2,543	0,468
<i>B. bassiana</i>	77 (27 %)	107 (43 %)	92 (38 %)	51 (43 %)	327 (36 %)	3	19,016	<0,001
<i>M. anisopliae</i>	146 (50 %)	88 (35 %)	80 (33 %)	19 (16 %)	333 (37 %)	3	47,148	<0,001
<i>I. fumosorosea</i>	12 (4 %)	22 (9 %)	25 (10 %)	18 (15 %)	77 (9 %)	3	14,618	0,002

DF = počet stupňov voľnosti, chi<sup>2</sup> = testovacie kritérium chí kvadrát testu nezávislosti, P = hodnota významnosti (všetko pre riadok).

V žiadnej vzorke sme nezaznamenali výskyt *B. brongniartii*, a to aj napriek tomu že sa uvádza euroázijské rozšírenie tohto druhu. Podobne výskyt tohto druhu nezaznamenali ani iní autori (Vänninen, 1996; Sun *et al.*, 2008 Chandler *et al.*, 1997, Landa *et al.*, 2002) Len malý výskyt tohto druhu zistili Meyling *et al.* (2009). Naproti tomu Keller *et al.* (2003) reportoval vysoký výskyt *B. brongniartii*.

Štatistické skúmanie výskytu druhu *M. anisopliae*, ktorý bol zistený s využitím *G. mellonella* ako citlivého hmyzu, nebolo väčšinou úspešné a rozdielnosti alebo vzťahy neboli preukazné. Mohlo to byť spôsobené nízkym celkovým výskytom s viac-menej náhodným rozdelením alebo jednoducho nízkou schopnosťou tejto metódy zachytiť *M. anisopliae*. Údaje o výskyte získané pomocou selektívneho média boli informatívnejšie. Výskyt *M. anisopliae* bol najvyšší na ornej pôde, následne na lúkach, v remízkach a najnižší v lesoch s výskytom len v 4 % vzoriek. Zistená preferencia obrábaných biotopov zodpovedá zisteniam autorov Bidochka *et al.* (1998) a Chandler *et al.* (1997). Za touto preferenciou môže byť niekoľko faktorov. Spóry *M. anisopliae* sú odolnejšie voči UV žiareniu a teplote ako spóry iných entomopatogénnych húb (Braga *et al.*, 2001a, Bidochka *et al.*, 1998). V podmienkach lesa je pôda celoročne zatienená, zatiaľ čo poľnohospodárska pôda je periodicky počas obrábania odokrytá, takže môže byť priamo slnečne ožarovaná a zohrievaná. To zabráňuje tomu, aby sa tu stabilizovali populácie iných entomopatogénnych húb a dovoľuje druhu *M. anisopliae*, aby využíval všetky dostupné zdroje. Vyšší výskyt *M. anisopliae*, ktorý sme zistili na slnečných stanovištiach, ako sú práve polia a lúky, potvrdzuje túto domnienku. S tým súvisí aj fakt, že spóry *M. anisopliae* vydržia dlhšiu dobu čakať na vhodného hostiteľa, kým spóry iných húb (napr. *B. bassiana*) vyžadujú nového hostiteľa pomerne skoro, inak odumierajú (Latch a Fallon, 1976). Práve na periodicky narušovaných biotopoch môžu zostať určitú dobu bez hostiteľa, takže nemôžu stabilizovať svoje populácie. Okrem toho druh *M. anisopliae* má v pôde lepšiu kompetičnú schopnosť ako *B. bassiana* (Clerk, 1969; Lingg a Donaldson, 1981; Shield *et al.*, 1981). Dlhšia doba životaschopnosti spór *M. anisopliae* v pôde môže byť vysvetlením pre nižší počet spór *M. anisopliae* oproti *B. bassiana*, ktorý sme zistili v pôdach, aj keď počet vzoriek, v ktorých sme identifikovali tieto druhy, bol takmer rovnaký. Pre akceptáciu tohto predpokladu hovorí aj takmer rovnaká frekvencia výskytu a tiež podobné množstvo CFU.g<sup>-1</sup> suchej pôdy zistené analýzou vzoriek z ornej pôdy s rozličným využívaním (typ pestovanej plodiny).

Výskyt *M. anisopliae* bol vyšší v zásaditejších pôdach, pričom s klesajúcim pH sa výrazne znižoval. Je známe, že mikroorganizmy preferujú určité rozmedzie hodnoty pH, ktoré je pre ich rast ideálne, avšak niekoľko autorov (Vänninen, 1996; Chandler *et al.*, 1997; Bidochka *et al.*, 1998; Keller *et al.*, 2003), ktorí skúmali výskyt tejto huby, deklarovalo, že hodnota pH pôdy výskyt tohto druhu neovplyvňovala. Preto je pravdepodobné, že preferencia vysokého pH vychádza skôr z preferencie biotopu alebo je len jedným faktorom z množstva tých, ktoré výskyt tejto huby ovplyvňujú.

Výskyt *M. anisopliae* sa znižoval so stúpajúcou nadmorskou výškou. Je možné, že je to podobne ako pH dané vzájomným vzťahom skúmaných faktorov, avšak určitú úlohu podobne, ako v prípade *B. bassiana* môže mať teplotná preferencia. Oproti *B. bassiana* sa *M. anisopliae* správa vo vzťahu k teplote opačne. Je to druh považovaný za termofilný a s klesajúcou teplotou sa zhoršuje jeho schopnosť rastu, ako aj schopnosť napadnúť hmyz a ďalej sa rozširovať (Vänninen, 1996; Bidochka *et al.*, 1998). Preto môže byť v konkurenčnom prostredí znevýhodnený pred niektorými inými entomopatogénnymi hubami, ako sú *B. bassiana* a *Isaria* spp., ktoré dokážu dobre rásť aj pri nižších teplotách a naopak, vyššie teploty v nížinách ho zvyhodňujú.

Typický príklad vzťahov medzi faktormi reprezentuje nižší výskyt *M. anisopliae* na strednom Slovensku a vyšší v západných a východných častiach krajiny, ktoré sú nižšie položené, sú prevažne využívané na poľnohospodárstvo a pH pôd, ktoré sa tu nachádzajú, je vyššie. Podobne smerom na sever spoločne so zmenou ostatných podmienok výskyt *M. anisopliae* klesal.

Druh *I. fumosorosea* bol identifikovaný s využitím *G. mellonella* v 6 % a pomocou selektívneho média v 9 % vzoriek. Obidvomi metódami bol tento druh častejšie detegovaný na lúkach a remízkach než v ostatných biotopoch. Výskyt tohto druhu zvyčajne nedosahuje

frekvenciu, s akou sa vyskytuje napr. *B. bassiana* alebo *M. anisopliae*. Rozliční autori (Kleespies *et al.*, 1989; Vänninen, 1996; Meyling a Eilenberg, 2006) uvádzajú výskyt v rozmedzí 1 až 81 %, podľa skúmaných vzoriek a podľa spôsobu zisťovania. Druh *I. fumosorosea* bol izolovaný z pôd pochádzajúcich z rozličných biotopov. Tento druh bol najčastejšie sa vyskytujúci druh entomopatogénnej huby v remízkach (Meyling a Eilenberg, 2006). Ideu, že remízky sú prirodzeným depozitom tejto huby, je možné považovať za reálnu, nakoľko aj my sme zistili najvyšší výskyt *I. fumosorosea* práve v tomto biotope. Na základe toho, že táto huba sa takto často vyskytuje v remízkach, odkiaľ sa môže rozširovať na polia, Meyling a Eilenberg (2006) navrhujú venovať jej osobitú pozornosť najmä z hľadiska možnosti využitia v ochrane rastlín, s čím možno súhlasiť. Napriek tomu, že Braga *et al.*, (2001c) uvádzajú výrazne vyššiu citlivosť spór tejto huby na UV žiarenie, jej výskyt nebol najnižší na slnečných miestach (lúky a polia).

Druh *I. farinosa* bol detegovaný vo vzorkách pôdy len pri použití citlivého hmyzu *G. mellonella*. Zaujímavá je nemožnosť zachytiť tento druh na selektívnom médiu napriek tomu, že príbuzné druhy (*I. fumosorosea*, *P. lilacinus*) na ňom vytvárali kolónie. Výskyt tohto druhu bol zaznamenaný v 6 % vzoriek. Frekvencia výskytu stúpala s nadmorskou výškou, so znižujúcou sa hodnotou pH a tiež sa jeho výskyt zvyšoval smerom na sever, čím sa opäť potvrdila vzájomná previazanosť skúmaných faktorov. Oblasti výskytu tohto druhu tvoria najmä lesy stredného Slovenska. Výskyt druhu *I. farinosa* bol úzko viazaný na lesný biotop. Podobný vzťah lesného biotopu a výskytu tejto huby popísali Vänninen (1996) a Chandler *et al.* (1997). Iní autori takýto úzky vzťah neudávajú (Meyling a Eilenberg, 2006), pričom výskyt tejto huby býva najviac do 20 % analyzovaných vzoriek.

Na analýzu PCR-RFLP rDNA sme použili metódu, primery a enzýmy, ktoré už predtým boli použité na skúmanie variability v rámci rodu *Beauveria*. Neauvéglise *et al.* (1994), ako aj Wada *et al.* (2003) použili túto istú metódu na analýzu *B. brongniartii*, pričom zistili rôznu mieru polymorfizmu. Neauvéglise *et al.* (1994) rozdelili analyzované izoláty *B. brongniartii* až do 6 haplotypov. Wada *et al.* (2003) pomocou tejto metódy identifikovali 2 haplotypy v rámci *B. brongniartii* a zároveň vlastný haplotyp pre každý z druhov *B. bassiana* a *B. amorfa*. Coates *et al.* (2002a) použili niekoľko reštrikčných endonukleáz na analýzu ITS1 a ITS2 regiónu rDNA (v našom prípade sme analyzovali 1 väčší úsek zahŕňajúci časť 18S-ITS1-5,8S-ITS2 a časť 28S úseku rDNA). Identifikoval pritom 24 haplotypov medzi 96 vzorkami *B. bassiana*, avšak hodnotenie veľkosti fragmentov muselo byť uskutočnené pomocou PAGE elektroforézy, nakoľko naštiepené fragmenty mali príliš malú veľkosť. Naše izoláty zaradené do haplotypu A mali vzor ako *B. bassiana* a izoláty, ktoré sme zaradili do haplotypu B, mali vzor, ktorý Wada *et al.* (2003) pridelili izolátom z druhu *B. brongniartii*. Naše izoláty však nespĺňali morfológické kritériá na zaradenie do tohto druhu, a navyše referenčná vzorka *B. bassiana* ARSEF6011 bola zaradená do toho istého haplotypu ako referenčná vzorka *B. brongniartii* ARSEF6023. Okrem toho sme analýzou štiepných miest pre enzýmy AluI a HaeIII pomocou databázy Genbank zistili prítomnosť týchto štiepných miest u izolátov z druhu *B. bassiana*. Je však možné, že s použitím viacerých reštrikčných enzýmov by bolo zistených viac haplotypov. Rehner (2005) uvádza, že druh *B. bassiana* je zmes kryptických druhov, teda druhov, ktoré majú rovnaké morfológické charakteristiky, ale sú reprodukčne izolované a navzájom sa nekrížia. V tomto kontexte by sme teda mali pri analýze vzoriek získaných na Slovensku hovoriť skôr o *Beauveria bassiana sensu lato*.

Podobné náznaky existencie aspoň dvoch kryptických druhov boli zistené aj pri analýze ISSR-PCR, keď boli izoláty rozdelené do 3 samostatných vetiev (O, P, R), pričom vetvu O tvoril len izolát *B. brongniartii* ARSEF6023. Vetva R bola príbuznejšia k *B. brongniartii* ako vetva P. Vetva P bola ďalej rozdelená na vetvy P1, P2 a P3. Izolátom zaradeným do vetvy P prislúchal PCR-RFLP haplotyp A, kým vzorkám vo vetvách R a O PCR-RFLP haplotyp B.

Napriek tomu, že použité metódy nie sú určené na fylogenetickú analýzu, získané výsledky naznačujú existenciu kryptických druhov v rámci analyzovaných izolátov a preto boli niektoré parametre a vzťahy hodnotené pre každú hlavnú vetvu dendrogramu zvlášť. Skúmaním vzájomnej genetickej vzdialenosti izolátov a geografickej vzdialenosti lokalít, odkiaľ boli získané, nebol zistený žiaden vzťah. Tento vzťah nebol potvrdený ani v rámci jednotlivých vetiev. Je možné, že skúmané územie je príliš malé na to, aby sa takáto závislosť potvrdila.

**Tabuľka 3** Frekvencia výskytu izolátov pochádzajúcich z rôznych biotopov v jednotlivých vetvách dendrogramu získaného na základe ISSR-PCR

<b>Biotoop</b>	<b>Lesný</b>	<b>Lúčny</b>	<b>Polný</b>	<b>Remízka</b>	<b>Celkom</b>	<b>DF</b>	<b>chi<sup>2</sup></b>	<b>P</b>
Celkom	40	13	49	6	108			
Vetva P1	2 (29%)	0 (0%)	4 (57%)	1 (14%)	7 (100%)	9	53,645	<0,001
Vetva P2	2 (4%)	12 (27%)	29 (64%)	2 (4%)	45 (100%)			
Vetva P3	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)	3 (100%)			
Vetva R	36 (68%)	1 (2%)	13 (25%)	3 (6%)	53 (100%)			

DF = počet stupňov voľnosti, chi<sup>2</sup> = testovacie kritérium chí kvadrát testu nezávislosti, P = hodnota významnosti.

Primery, ktoré sme použili na skúmanie genetickej príbuznosti izolátov v ISSR-PCR, boli predtým použité a vykazovali vysokú mieru polymorfizmu (809, 873, 885 – Estrada *et al.*, 2007; Bis06, Bis12, Bis16 - Wang *et al.*, 2005). Primer 873 (GACA)<sub>4</sub> dosiahol v práci Estrada *et al.* (2006) 100 % polymorfizmus pri rozpoznávaní 11 kmeňov z Kuby, Indie, Bulharska, Guadalupe a USA, kým tento istý primer pri analýze izolátov z Ázie, USA a Srbska dosiahol len 50 % polymorfizmus (Wang *et al.*, 2005). Tiež sa líšil počet fragmentov nasyntetizovaných s týmto primerom (11 verzus 8 fragmentov). Množstvo nasyntetizovaných fragmentov s použitím jednotlivých primerov bolo vyššie ako množstvo fragmentov, ktoré udávajú vyššie uvedení autori, avšak to závisí od použitých vzoriek, nastavenia PCR reakcie (reakčná zmes a podmienky), ako aj od subjektívnosti hodnotenia. Rozlišovacia schopnosť, ako aj miera príbuznosti, závisí predovšetkým od pôvodu skúmaných vzoriek a nie je preto možné porovnávať výsledky zistené jednotlivými autormi. Je možné povedať, že izoláty, ktoré boli analyzované v našej práci, sú pomerne blízko príbuzné oproti súborom izolátov, ktoré použili Estrada *et al.* (2007), Wang *et al.* (2005) a Takatsuka (2007), ktorí porovnávali príbuznosť pomocou tejto istej metódy, alebo autorov, ktorí použili iné metódy Hegedus a Khachatourians (1996), Maurer *et al.* (1997a), Wang *et al.* (2003). Estrada *et al.* (2006) zistili príbuznosť jednotlivých izolátov na základe geografickej vzdialenosti, kým Wang *et al.* (2005) okrem geografickej vzdialenosti identifikovali aj rad hostiteľa ako faktor ovplyvňujúci podobnosť izolátov. Podobné skúmanie hostiteľa v našej práci nebolo možné, nakoľko izoláty boli získané z pôdy. Je však možné si všimnúť, že 3 najúčinnšie izoláty proti *O. nubilalis* boli zaradené do tej istej vetvy (P1) získanej pomocou ISSR-PCR analýzy.

Výsledky skúmania DNA závisia okrem použitej metódy predovšetkým od zvoleného súboru analyzovaných vzoriek. Podobný súbor vzoriek ako sme použili my, teda vzorky získané zo stredne veľkého územia a z rôznych ekologických podmienok, použili Bidochka *et al.* (2002) pri analýze *B. bassiana* pomocou izoenzymov alebo English *et al.* (2008) pri AFLP analýze *M. anisopliae*.

Je zaujímavé, že vzorky s haplotypom A získaným pomocou PCR-RFLP rDNA pochádzali prevažne z poľných (65 %) a lúčnych (22 %) biotopov, kým z lesného biotopu boli iba 4 vzorky. Je teda zrejma adaptácia izolátov s týmto haplotypom na podmienky, ktoré sa vyskytujú na takýchto stanovištiach. Naopak, izoláty s haplotypom B pochádzali predovšetkým z lesov (68 %), hoci medzi nimi boli zastúpené aj vzorky z polí (25 %). Tiež bolo zistené, že izoláty s haplotypom A pochádzali z lokalít s vyššou nadmorskou výškou a nižším pH, pričom sa opäť objavuje vzájomné previazanie skúmaných faktorov. Toto isté bolo potvrdené aj pri ISSR-PCR analýze, keď hlavné dve vetvy P a R zodpovedali



haplotypom A a B. Vetva P2 pritom bola tvorená predovšetkým izolátmi z lúk a polí (92 %) a vetva P3 obsahovala všetky 3 izoláty z polí. Podobné výsledky zistili aj Bidochka *et al.* (2002), keď izoláty *B. bassiana* boli rozdelené do 4 vetiev, pričom každá vetva bola charakteristická prítomnosťou izolátov z iného biotopu a izoláty do nich zaradené mali odlišné teplotné preferencie a odolnosť voči UV žiareniu. Odlišné genetické skupiny izolátov pochádzajúce z rozličných biotopov odhalili aj Chandler a Davidson (2007). Meyling *et al.* 2009 zistili adaptáciu na podmienky poľného biotopu u určitej genetickej skupiny izolátov, ktorá sa hojne vyskytovala v pôde na poliach, kým iné skupiny sa v pôdnych vzorkách z polí nevyskytovali.

Mortalita lariev vijačky kukuričnej po vystavení inokulu *B. bassiana* dosiahla na štrnásty deň 43 až 97 %. Bola tiež zaznamenaná pomerne vysoká úmrtnosť v kontrolnom variante (27 %). Nakoľko nebola u týchto mŕtvych lariev potvrdená infekcia hubou, je pravdepodobné že zomreli na následky mechanického poškodenia pri manipulácii alebo ide o prirodzenú mortalitu. Cagaň a Švercel (2001) pri podobnom pokuse takéto javy nepopisujú. Celková dosiahnutá mortalita uvádzaná v ich práci bola na úrovni najlepších nami použitých izolátov. Pritom je treba brať do úvahy, že použité izoláty boli získané z napadnutých jedincov *O. nubilalis* v prírode a účinnosť takýchto izolátov býva zvyčajne vyššia. Dosiahnutý letálny čas LT50 (3,8 – 5,3 dňa) najlepších troch izolátov bol lepší ako letálny čas (8,4 – 28 dni) uvádzaný autormi Riba *et al.* (1983). Infekcia touto hubou je v prírode na larvách *O. nubilalis* najčastejšia. To spoločne s vysokými hodnotami mortality a relatívne krátkym časom LT50 vytvára predpoklady na potenciálne využitie niektorého z najúčinnějších izolátov (O12, O21, A83) v poľných podmienkach.

## Záver

Z našich výsledkov vyplýva, že na území Slovenska sa v pôdach nachádzajú predovšetkým tieto 4 druhy entomopatogénnych húb: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria farinosa* a *Isaria fumosorosea*. Ďalej sme zistili výrazný rozdiel medzi metódami, ktoré sme použili na izoláciu týchto húb z pôdy, a to tak v množstve ako aj druhovom zložení. S použitím selektívneho agarového média boli entomopatogénne huby zistené vo väčšom počte vzoriek, avšak boli detegované len 3 druhy.

Zistili sme, že druh *B. bassiana* preferuje prirodzené prostredie, teda najmä lesný biotop, avšak vo všetkých ostatných biotopoch sa tiež vyskytoval pomerne často. Výskyt *I. farinosa* je v podmienkach Slovenska striktno obmedzený na lesný biotop. Druh *M. anisopliae* sa vyskytuje najmä na slnečných stanovištiach, ako sú lúky a polia a neprekáža mu ani intenzívna poľnohospodárska činnosť. Bola zistená významná závislosť medzi jednotlivými skúmanými faktormi prostredia (nadmorská výška, pH pôdy, typ biotopu a geografická poloha). So stúpajúcou nadmorskou výškou a klesajúcou hodnotou pH sa zvyšuje výskyt *B. bassiana* a *I. farinosa*, pričom výskyt *M. anisopliae* má opačný charakter. Z hľadiska adaptácie na poľné biotopy sa pri výbere bioagens treba zamerať predovšetkým na druhy *B. bassiana* a *M. anisopliae*. Výskyt druhu *I. fumosorosea* bol najvyšší v pôdnych vzorkách pochádzajúcich z remízok, ktoré sú významným stabilizačným prvkom v poľnohospodárskej krajine. Súčasne môžu slúžiť ako zdroj inokula entomopatogénnych húb v prirodzenej regulácii populácií hmyzu, ktoré sa vyskytujú na poľnohospodárskej pôde v ich blízkosti.

PCR-RFLP analýzou jadrovej rDNA v 112 vzorkách *Beauveria* spp. sme zistili len 2 haplotypy. ISSR-PCR analýzou s použitím šiestich primerov bolo identifikovaných 104 haplotypov, ktoré boli zhukovou analýzou rozdelené do 5 vetiev. Na základe nízkej variability medzi izolátmi vo vnútri vetiev a relatívne veľkej genetickej vzdialenosti medzi vetvami je možné usudzovať, že sa jedná o najmenej 2 kryptické druhy v rámci *Beauveria bassiana sensu lato*. Tieto populácie (kryptické druhy) sú viazané predovšetkým na typ biotopu, v ktorom sa prirodzene vyskytujú.

Nezistili sme vzťah medzi mortalitou lariev *O. nubilalis* alebo dosiahnutým letálnym časom a podmienkami (biotop, pH pôdy, nadmorská výška), z ktorých pochádzali testované izoláty. Takisto sa nepotvrdil vzťah medzi haplotypom a schopnosťou izolátov zabíjať larvy *O. nubilalis*, avšak všetky 3 preukazne najúčinnnejšie izoláty patrili do vetvy P1 dendrogramu zostrojeného na základe ISSR-PCR analýzy.

## Návrh na praktické využitie výsledkov a ďalší rozvoj vedy

V poľnohospodárskej a lesníckej praxi je možné získané informácie o druhovej štruktúre a distribúcii entomopatogénnych húb využiť pri navrhovaní vhodného spôsobu regulácie škodcov. Informácie o prirodzenom výskyte konkrétneho druhu v konkrétnych podmienkach umožňujú posúdiť jeho prínos v prirodzenej regulácii populácie škodcov, ako aj vhodnosť použitia konkrétneho druhu ako introdukovaného bioagens. Pri hodnotení vhodnosti kmeňov použitých ako bioagens rozhoduje okrem schopnosti huby napádať hostiteľa aj jej schopnosť prežívať a stabilizovať svoje populácie v novom prostredí, a tým poskytovať dlhodobejšiu ochranu. Je veľmi pravdepodobné, že druhy entomopatogénnych húb, ktoré sa v konkrétnych podmienkach prirodzene nevyskytujú, nedokážu v týchto podmienkach dlhodobo prežívať, takže ich účinnosť bude obmedzená. Preto napríklad na základe našich výsledkov nemôžeme odporučiť využitie druhu *I. farinosa* na reguláciu škodcov v poľných podmienkach. Použitie bioagens založených na druhoch *B. bassiana* a *M. anisopliae* môže byť v poľných podmienkach úspešné. Dlhšia perzistencia bioagens z druhu *B. bassiana* je pravdepodobná v lesných ekosystémoch, kde sme zistili najvyšší výskyt práve tohto druhu. Pri výbere vhodného bioagens je však potrebné brať do úvahy aj pôvod izolátu, na ktorom je bioagens založený. Zistili sme, že v rámci *B. bassiana* existujú geneticky príbuzné skupiny (možno kryptické druhy), ktoré preferujú určité podmienky. Izoláty z jednej skupiny pochádzali prevažne z poľných a lúčnych biotopov, a teda boli lepšie adaptované na podmienky, ktorými sú tieto biotopy charakteristické ako izoláty z druhej skupiny, z ktorých väčšina pochádzala z lesa. Je otáznе, ako by sa izolát z lesného biotopu správal v poľných podmienkach, a to najmä z hľadiska zníženia účinnosti vplyvom UV žiarenia alebo vysokej teploty a aká dlhá by bola jeho perzistencia v tomto prostredí.

Na tieto otázky by mohlo dať odpoveď sledovanie osudu kmeňov (izolátov) introdukovaných do nového prostredia pomocou analýzy DNA. Pri tomto sledovaní by mohli byť použité metódy využívajúce polymorfizmus mikrosatelitných úsekov (SSR), ale aj špecifický profil izolátov ktorý sa nám podarilo získať pomocou ISSR (dĺžkový polymorfizmus úsekov DNA medzi mikrosatelitmi) primerov až pre 98 zo 112 sledovaných izolátov.

Ďalšou analýzou vybraných izolátov (odolnosť voči UV žiareniu, schopnosť prežívať a rásť v rôznych tepelných režimoch) by bolo možné zistiť, ktoré faktory stoja za preferenciou prírodných podmienok pre jednotlivé druhy alebo genotypy.

Zo súboru analyzovaných izolátov sme v laboratórnom skúmaní u troch zistili vysokú schopnosť spôsobovať mortalitu *Ostrinia nubilalis*. Túto schopnosť by bolo vhodné overiť v poľných podmienkach a pri priaznivých výsledkoch neskôr komerčne využiť. Pri overovaní účinnosti by bolo možné tiež zhodnotiť ich prežívanie v prostredí pomocou analýzy DNA.

Analýza výskytu entomopatogénnych húb v pôdach priniesla tiež veľké množstvo pôvodných slovenských izolátov, z ktorých časť je uložená v zbierke Katedry ochrany rastlín SPU v Nitre. Tieto izoláty je možné ďalej využívať na vedecké účely.

## Zoznam použitej literatúry

AJANTA, B. et al. 2008. Mass rearing of greater wax moth (*Galleria mellonella* L.) on artificial diet. In *Indian Journal of Entomology*, 2008, vol. 70, no. 4.

- ANDERSON, R.M., MAY, R.M. 1981. The population dynamics of microparasites and their invertebrate hosts. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society London B*, 1981. vol. 291, pp. 451–524.
- AQUINO DE MURO, M. *et al.* 2005. Molecular characterisation of *Beauveria bassiana* isolates obtained from overwintering sites of Sunn Pests (*Eurygaster* and *Aelia* species). In *Mycological Research*, 2005, vol. 109, no. 3, pp. 294-306.
- BARKER, C. W., BARKER, G. M. 1998. Generalist entomopathogens as biological indicators of deforestation and agricultural land use impacts on Waikato soils. In *New Zealand Journal of Ecology*, 1998, vol. 22, no. 2, pp. 189-196.
- BERRETTA, M. F. *et al.* 1998. Genotyping isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* by RAPD with fluorescent labels. In *Journal of Invertebrate Pathology*, 1998, vol. 71, pp. 145-150.
- BIDOCHKA, M. J., KASPERSKI, J. E., WILD, G. A. M. 1998. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. In *Canadian Journal of Botany*, vol. 76, pp. 1198-1204.
- BIDOCHKA, M. J., MENZIES, F. V., KAMP, A. M. 2002. Genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* are associated with habitat and thermal growth preferences. In *Archives of Microbiology*, 2002, vol. 178, pp. 531-537.
- BIDOCHKA, M. J. *et al.* 2001. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? In *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, vol. 67, no. 3, pp. 1335-1342.
- BIDOCHKA, M. J., KHACHATOURIANS, G. G. 1994. Protein hydrolysis in grasshopper cuticles by entomopathogenic fungal extracellular proteases. In *Journal of Invertebrate Pathology*, 1994, vol. 63, no. 1, pp. 7-13.
- BING, L. A., LEWIS, L. C. 1993. Occurrence of the entomopathogen *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in different tillage regimes and in *Zea mays* L. and virulence towards *Ostrinia nubilalis* (Hübner). In *Agriculture, Ecosystems & Environment*, vol. 45, pp. 147-156.
- BRAGA, G. U. L. *et al.* 2001a. Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. In *Photochemistry and Photobiology*, 2001, vol. 74, no. 5, pp. 734-739.
- BRAGA, G. U. L. *et al.* 2001c. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61 deg N to 54 deg S. In *Journal of Invertebrate Pathology*, 2001, vol. 78, no. 2, pp. 98-108.
- BURDON, J. J., SILK, J. 1997. Sources and Patterns of Diversity in Plant-Pathogenic Fungi. In *Phytopathology*, 1997, vol. 87, no. 7, pp. 664-669.
- CAGÁN, E., ŠVERCEL, M. 2001. The influence of ultraviolet light on pathogenicity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin to the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hbn. (Lepidoptera: Crambidae). In *Journal of Central European Agriculture*, 2001, vol. 2, no. 3-4, pp. 227-233.
- CAGÁN, E., UHLÍK, V. 1999. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* strains isolated from *Ostrinia nubilalis* Hbn. (Lepidoptera: Pyralidae) to original host larvae and to ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae). In *Plant Protection Science*, 1999, vol. 35, no. 3, pp. 108-112.
- CANTONE, F. A., VANDENBERG, J. D. 1998. Intraspecific diversity in *Paecilomyces fumosoroseus*. In *Mycological Research*, 1998, vol. 102, pp. 209-215.
- CASTRILLO, L. A., BROOKS, W. M. 1998. Differentiation of *Beauveria bassiana* isolates from the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*, using isozyme and RAPD analyses. In *Journal of Invertebrate Pathology*, 1998, vol. 72, p. 190–196.
- CLERK, G. C., MADELIN, M. F. 1969. The longevity of three insect-parasitizing Hyphomycetes. In *Transactions of the British Mycological Society*, 1969, vol. 48, pp. 193-209.

- COATES, B. S., HELLMICH, R. L., LEWIS, L. C. 2002a. *Beauveria bassiana* haplotype determination based on nuclear rDNA internal transcribed spacer PCR-RFLP. In *Mycological Research*, 2002, vol. 106, pp. 40-50.
- COUTEAUDIER, Y., VIAUD, M. 1997. New insights in population structure of *Beauveria bassiana* with regard to vegetative compatibility groups and telomeric restriction fragment length polymorphisms. In *FEMS Microbiol Ecology*, 1997, vol. 22, pp. 175-182.
- DOYLE, J. J., DOYLE, J. L. 1987. CTAB DNA extraction in plants. In *Phytochemistry Bulletin*, 1987, vol. 19, pp. 11-15
- ENKERLI, J. *et al.* 2001. Strain-specific microsatellite markers in the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii*. In *Mycological Research*, 2001, vol. 105, pp. 1079-1087.
- ESTRADA, M. E., CAMACHO, M. V., BENITO, C. 2007. The molecular diversity of different isolates of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. as assessed using inter-microsatellites (ISSRs). In *Cellular and Molecular Biology Letters*, 2007, vol. 12, pp. 240-252.
- FARGUES, J. *et al.* 2002. Genetic variability among *Paecilomyces fumosoroseus* isolates from various geographical and host insect origins based on the rDNA-ITS regions. In *Mycological Research*, 2002, vol. 106, pp. 1066-1074.
- FERNANDES, E. K. K. *et al.* 2009. Genetic diversity among Brazilian isolates of *Beauveria bassiana*: comparisons with non-Brazilian isolates and other *Beauveria* species. In *Journal of Applied Microbiology*, 2009, doi 10.1111/j.1365-2672.2009.04258.x.
- GAITAN, A. *et al.* 2002. Genetic variability of *Beauveria bassiana* associated with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* and other insects. In *Mycological Research*, 2002, vol. 106, pp. 1307-1314.
- GLARE, T. R., INWOOD, A. J. 1998. Morphological and genetic characterisation of *Beauveria* spp. from New Zealand. In *Mycological Research*, 1998, vol. 102, no. 2, pp. 250-256.
- HAJEK, A. E. 1997 Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. In *Advances in Microbial Ecology*, 1997, vol. 15, pp. 193-249.
- HARDIN, B. 1991: Natural enemies gang up on corn pests - natural method of controlling the European corn borers. In: *Agricultural Research*, August 1991
- HEGEDUS, D. D., KHACHATOURIANS, G. G. 1996. Identification of molecular variants in mitochondrial DNAs of members of the genera *Beauveria*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium*, and *Metarhizium*. In *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, vol. 59, no. 12, pp. 4283-4288.
- CHANDLER, D., DAVIDSON, G. 2007. *Population Biology of Beauveria*. Presentation at the 40th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology in Quebec, August 2007. <[http://www2.warwick.ac.uk/fac/soc/pais/biopesticides/papers/quebec\\_fungal\\_biogeography.ppt](http://www2.warwick.ac.uk/fac/soc/pais/biopesticides/papers/quebec_fungal_biogeography.ppt)> [cited 12 April 2009].
- CHANDLER, D., HAY, D., REID, A. P. 1997. Sampling and occurrence of entomopathogenic fungi and nematodes in UK soils. In *Applied Soil Ecology*, 1997, vol.5, pp. 133-141.
- INGLIS, D. G. *et al.* 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In *Fungi as Biocontrol Agents* (Butt, T. M. *et al.*). Wallingford : CAB International, 2001, pp. 23-69.
- INGLIS, G. D. *et al.* 2008. Genetic diversity of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* in southwestern British Columbia. In *Journal of Invertebrate Pathology*, 2008, vol. 98, pp. 101-113.
- KELLER, S., KESSLER, P., SCHWEIZER, C. 2003. Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. In *BioControl*, 2003, vol. 48, no. 3, pp. 307-319.

- KLEESPIES, R., BATHON, H., ZIMMERMANN, G. 1989. Investigations on the natural occurrence of entomopathogenic fungi and nematodes in different soils in the surroundings of Darmstadt. In *Gesunde Pflanzen*, 1989, vol. 41, no. 10, pp. 350-355.
- KLINGEN, I. 2001. *Natural occurrence of insect pathogenic fungi and their pathogenicity on different host species* [Dissertation thesis]. As : Agricultural University of Norway, 2001, 256 p.
- KLINGEN, I., HAUKELAND, S. 2006. The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes. In *An Ecological and Societal Approach to Biological Control*. (Eilenberg, J., Hokkanen, H. M. T. eds.). Dordrecht, The Netherlands : Springer, 2006, pp. 145-211.
- LANDA, Z. *et al.* 2002. Distribution, occurrence and potential use of entomopathogenic fungi in arable soils in Czech Republic. In *ISTRO-Conference*, Brno, Session II, 2002, pp. 195-201.
- LATCH, G. C. M., FALLON, R.E. 1976. Studies on the use of *Metarhizium anisopliae* to control *Oryctes rhinoceros*. In *Entomophaga*, 1976, vol. 21, pp. 39-48.
- LI, Z. *et al.* 2001. Discovery and demonstration of the teleomorph of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., an important entomogenous fungus. In *Chinese Science Bulletin*, 2001, vol. 46, pp. 751-753.
- LINGG, A. J., DONALDSON, M. D. 1981. Biotic and abiotic factors affecting stability of *Beauveria bassiana* conidia in soil. In *Journal of Invertebrate Pathology*, 1981, vol. 38, pp. 191-200.
- MARSHALL, E. J. P., MOONEN, A. C. 2002. Field margins in northern Europe: their functions and interactions with agriculture. In *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2002, vol. 89, pp. 5-21.
- MAURER, P. *et al.* 1997a. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. In *Mycological Research*, 1997, vol. 101, pp. 159-164.
- MEYLING, N. V., EILENBERG, J. 2006a. Isolation and characterisation of *Beauveria bassiana* isolates from phylloplanes of hedgerow vegetation. In *Mycological Research*, 2006, vol. 110, no. 2, pp. 188-195.
- MEYLING, N. V., EILENBERG, J. 2006b. Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. In *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2006, vol. 113, no. 1/4, pp. 336-341.
- MEYLING, N. V., EILENBERG, J. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. In *Biological Control*, 2007, vol. 43, pp. 145-155.
- MEYLING, N. V. *et al.* 2009. Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. In *Molecular Ecology*, 2009, vol. 18, no. 6, pp. 1282-1293.
- NAGY, B. 1974. Rearing of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) on a simplified artificial diet. In *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 1974, vol. 5, pp. 73-79.
- NEI, M., LI, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in term of restriction endonucleases. In *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 1979, vol. 76, no. 10, pp. 5269-5273.
- NEUVEGLISE, C. *et al.* 1994. Comparative analysis of molecular and biological characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolated from insects. In *Mycological Research*, 1994, vol. 98, no. 3, pp. 322-328.
- PANSU, M., GAUTHEYROU, J. 2006. *Handbook of Soil Analysis: Mineralogical, Organic and Inorganic Methods*. Berlin : Springer, 2006, 993 p.

- PHOOFOLO, M. W., OBRYCKI, J. J., LEWIS, L. C. 2001: Quantitative assessment of biotic mortality factors of the European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) in field corn. In *Journal of Economic Entomology*, 2001, vol. 94, pp. 617-622
- QUESADA-MORAGA, E. *et al.* 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. In *Mycological Research*, 2007, vol. 111, no. 8, pp. 947-966
- REHNER, S. A. 2005. Phylogenetics of the insect pathogenic genus *Beauveria*. In *Insect-Fungal Associations, Ecology and Evolution*. (Vega, F. E., Blackwell, M. eds.) New York : Oxford University Press, 2005, pp. 3-27.
- REHNER, S.A., BUCKLEY, E. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. In *Mycologia*, 2005, vol. 97, pp. 84-98.
- RIBA, G., MIERZEJEWSKA, E. 1986.  $\alpha$ -Esterases of twenty Polish strains of *Beauveria bassiana*. In *Bulletin of the Polish Academy of Sciences Biological Sciences*, 1986, vol. 34, pp. 1-3.
- RIBA, G. *et al.* 1983: Sensibilite de la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*) (Lep.: Pyralidae) aux Hyphomycetes entomopathogenes. In *Entomophaga*, 1983, vol. 28, no. 1, pp. 55-64.
- RIVERA, A., BRIDGE, P. D., BUSTILLO, A. E. 1997. Caracterizacion bioquimica y molecular de aislamientos de *Beauveria bassiana* procedentes de la broca del cafe, *Hypothenemus hampei*. In *Revista Colombiana de Entomologia*, vol. 23, 1997, p. 51-57
- SAITOU, N., NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction of phylogenetic trees. In *Molecular Biology and Evolution*, 1987, vol. 4, pp. 406-425.
- SHAH, P. A., PELL, J. K. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. In *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, vol. 61, pp. 413-423.
- SHIELD, M.S., LINGG, A.J., HEIMSCH, R.C. 1981. Identification of a *Penicillium urticae* metabolite which inhibits *Beauveria bassiana*. In *Journal of Invertebrate Pathology*, 1981, vol. 38, pp. 374-377.
- SOSA-GOMEZ, D. R., MOSCARDI, F. 1994. Effect of till and no-till soybean cultivation on dynamics of entomopathogenic fungi in the soil. In *Florida Entomologist*, 1994, vol. 77, pp. 284-287.
- St. LEGER, R. J. *et al.* 1992a. World-wide distribution of genetic variation among isolates of *Beauveria* spp. In *Mycological Research*, 1992, vol. 96, pp. 1007-1015.
- St. LEGER, R. J. *et al.* 1992b. Genetics differences in allozymes and formation of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. In *Journal of Invertebrate Pathology*, 1992, vol. 60, pp. 89-101.
- STRASSER, H., FORER, A., SCHINNER, F. 1996. Development of media for the selective isolation and maintenance of virulence of *Beauveria brongniartii*. In *Microbial Control of Soil Dwelling Plants* (Jackson, T. A. *et al.* eds.). New Zealand : AgResearch, 1996, pp. 125-130.
- TAKATSUKA, J. 2007. Characterization of *Beauveria bassiana* isolates from Japan using inter-simplesequence- repeat-anchored polymerase chain reaction (ISSR-PCR) amplification. In *Applied Entomology and Zoology*, 2007, vol. 42, pp. 563-571.
- TIGANO-MILANI, M. S., GOMES, A. C. M. M., SOBRAL, B. W. S. 1995. Genetic variability among Brazilian isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. In *Journal of Invertebrate Pathology*, 1995, vol. 65, no. 2, pp. 206-210.
- TSCHARNTKE, T. *et al.* 2005. Landscape perspectives on agricultural intensification and biodiversity—ecosystem service management. In *Ecological Letters*, 2005, vol. 8, pp. 857-874.

- UMA DEVI, K. *et al.* 2006. Genetic diversity, reproductive biology, and speciation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. In *Genome*, 2006, vol. 49, pp. 495-504.
- URTZ, B. E., RICE, W. C. 1997. RAPD-PCR characterisation of *Beauveria bassiana* isolates from the rice water weevil *Lissorhoptrus oryzophilus*. In *Letters in Applied Microbiology*, 1997, vol. 25, p. 405–409.
- VALDERRAMA, F. A. M., CRISTANCHO, A. M. A., CHAVES, C. B. 2000. Analisis de la variabilidad genetica del hongo entomopatogeno *Beauveria bassiana* con marcadores RAPD. In *Revista Colombiana de Entomologia*, 2000, vol. 26, p. 25–29.
- VÄNNINEN, I. 1996. Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type. In *Mycological Research*, 1996, vol. 100, pp. 93-101.
- WADA, S. *et al.* 2003. Discrimination of Japanese isolates of *Beauveria brongniartii* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) by RFLP of the rDNA-ITS regions. In *Applied Entomology and Zoology*, 2003, vol. 38, no. 4, pp. 551–557.
- WANG, S. *et al.* 2005a. Genetic diversity and population structure among strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). In *Mycological Research*, 2005, vol. 109, pp. 1364-1372.
- ZIMMERMANN, G. 1986. The *Galleria* bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. In *Journal of Applied Entomology*, 1986, vol. 102, p. 213-215.

## Zoznam publikovaných prác

- Juraj Medo**, Eva Candráková. 2008. Vplyv vybraných agro-environmentálnych faktorov na tvorbu úrody ľanu siateho olejného (*Linum usitatissimum* L.) = Influence of selected agro-environmental factors on yield formation of linseed (*Linum usitatissimum* L.) In *Acta fytotechnica et zootechnica* (Scientific journal for phytotechnics and zootechnics). - Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita. - ISSN 1335-258X. - Roč. 11, č. 1 (2008), s. 1-8
- Ľudovít Cagáň, Jaroslav Števo, **Juraj Medo**. 2008. Ochrana proti kukuričiarovi koreňovému (*Diabrotica virgifera virgifera*) v Slovenskej republike. In *Ochrana kukurice proti kukuričiarovi koreňovému Diabrotica virgifera virgifera LeConte – Zborník referátov z odborného seminára ÚKSUP 2008*.
- Ľudovít Cagáň, Kristína Staníková, **Juraj Medo**. 2009. Maize production systems in Slovakia before and after *Diabrotica* invasion and possible role of Bt hybrids in future development. Potential and prospective use in Europe, Kiel 2009, March 26 – 27, Germany. Book of abstracts
- Ľudovít Cagáň, **Juraj Medo**, Kristína Staníková. 2009. Feeding and survival of cereal pest beetles on Bt maize (oral presentation), Bt-toxins against *Diabrotica*. In Potential and prospective use in Europe, Kiel 2009, March 26 – 27, Germany. Book of abstracts