

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4131 Zemědělství

Studijní obor: 4131R012 Zemědělské biotechnologie - Rostlinné

Katedra: Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**HODNOCENÍ KVALITATIVNÍCH A KVANTITATIVNÍCH
PARAMETRŮ HOUBY *BEAUVERIA BASSIANA* V SOUVISLOSTI S
PRODUKČNÍ TEPLOTOU INOKULA**

Vedoucí bakalářské práce

Ing. Andrea Bohatá, Ph.D.

Autor

Kateřina Rybarová

Konzultantka

Ing. Jana Konopická

České Budějovice
červen 2020

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zemědělská fakulta

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kateřina RYBAROVÁ**
Osobní číslo: **Z17234**
Studijní program: **B4131 Zemědělství**
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie – Rostlinné**
Téma práce: **Hodnocení kvalitativních a kvantitativních parametrů houby *B. bassiana* v souvislosti s produkční teplotou inokula**
Zadávající katedra: **Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné**

Zásady pro vypracování

Entomopatogenní houba *Beauveria bassiana* je schopna vyvolat primární onemocnění na hmyzu. Produkce spor a virulence je hlavním parametrem pro praktické využití entomopatogenní houby v ochraně proti zemědělským i lesním škůdcům. Účinnost houby bude testována na vybraných hostitelích. Cílem bakalářské práce je hodnotit „in vitro“ (klíčivost a produkce spor) a „in vivo“ (virulence) parametry entomopatogenní houby *B. bassiana* v souvislosti s produkční teplotou inokula. Inokulum houby bude produkováno v konstantních teplotách.

1. Vliv živné půdy na růst a vývoj entomopatogenní houby *B. bassiana*.
2. Vliv inokula entomopatogenní houby *B. bassiana* získaného z různých teplot na vitalitu spor po inkubaci houby v různých podmínkách prostředí.
3. Sledování vlivu inokula entomopatogenní houby *B. bassiana* na růst, vývoj a produkci spor pomocí „in vitro“ laboratorních testů (produkce spor na umělých živných půdách a přirozeném substrátu).
4. Vliv inokula houby *B. bassiana* na virulenci testované na larvách potměníka moučného *Tenebrio molitor* pomocí standardního laboratorního biotestu po inkubaci larev v různých teplotách.

Rozsah pracovní zprávy: **30 – 35 stran**
Rozsah grafických prací: **5 stran**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- Bailey A., et al., 2010: Biopesticides. CAB International Cambridge. Butt T.M., Goettel M.S. 2000: Bioassays of Entomopathogenous Fungi. In: Navon A., Ascher K.R.S. (Eds.): Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. CAB International, Wallingford, UK, 95-140.
- Goettel M.S., Inglis G.D., Wraight S.P. 2000: Fungi. In: Lacey L.A., Kaya H.K. (Eds.): Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Kluwer Academic Publishers, 255-282.
- Inglis G.D., Goettel M.S., Butt T.M., Strasser H. 2001: Use of hyphomycetes fungi for managing insect pests. In: Butt T.M., Jackson C., Magan N. (Eds.): Fungi as biocontrol agents – progress, problems and potential. CAB International, Wallingford, UK, 23-69.
- Ekesi S., Maniania N.K. 2007: Use of entomopathogenic fungi in Biological Pest Management. Research Signpost, Indie, p. 333.
- Lieutier F., Day K.R., Battisti A., Grégoire J.C., Evans H.F. 2007: Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis. Springer, Dordrecht, The Netherlands, p. 569.
- Články získané z bibliografické a citační databáze Web of Science a bibliografické databáze CAB, BA, ZR.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Andrea Bohatá, Ph.D.**
Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Konzultant bakalářské práce: **Ing. Jana Konopická**

Datum zadání bakalářské práce: **1. dubna 2020**

Termín odevzdání bakalářské práce: **15. dubna 2020**

JIHOČESKÁ UNIVERZITA 
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentická 1668, 370 05 České Budějovice
LS

Kader v.z.

doc. RNDr. Petr Bartoš, Ph.D.
děkan

JK

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 1. dubna 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě - v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

.....
Datum

.....
Kateřina Rybarová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce Ing. Andree Bohaté, Ph.D za vstřícný přístup, odborné rady, užitečné připomínky a za čas, který mi věnovala. Obrovské dík patří i Ing. Janě Konopické za obětavou pomoc nejen v laboratoři, ale i za připomínky při zpracovávání výsledků a finalizaci bakalářské práce. Další poděkování patří paní Olze Divišové za trpělivou pomoc při zakládání pokusů a pomoc při jejich vyhodnocování. Děkuji také své rodině a přátelům za nesmírnou a dlouholetou podporu.

Abstrakt

Bakalářská práce je zaměřena na kmen GHA entomopatogenní houby *Beauveria bassiana*, který je obsažen v komerčním biopreparátu Botanigard. Botanigard je přípravek, který se používá v biologické ochraně rostlin v mnoha zemích světa v boji proti širokému spektru škůdců různých druhů rostlin. V této bakalářské práci jsou testovány „*in vitro*“ (radiální růst, výtěžnost spor) a „*in vivo*“ parametry (virulence) kmene GHA houby *Beauveria bassiana* a to při různých teplotách za použití různých živných médiích. Nejoptimálnější teplota pro radiální růst kmene GHA byla 25 °C, a to na médiích s poměrem dusíku a uhlíku 20:20. Kmen GHA vyprodukoval největší množství konidií ve 25 °C na médiu, kdy byl dusík a uhlík v poměru 20:40. Naopak, nejmenší produkce konidií byla dosažena na půdě PDA a s poměrem dusíku a uhlíku 5:10. Teplota 25 °C byla nejoptimálnější i pro průběh infekce na larvách potemníka moučného (*Tenebrio molitor*). Část práce se zabývá i porovnáním výtěžnosti blastospor kmene GHA s jinými kmeny *Beauveria bassiana* odizolovanými z různých geografických oblastí. Nejvyšší výtěžnost blastospor měl argentinský kmen na médiu MEB.

Klíčová slova: biologická ochrana, *Beauveria bassiana* kmen GHA, poměr N:C, radiální růst, produkce spor, teplota

Abstract

Bachelor thesis is focusing on the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* strain GHA, which is contained in the commercial bioproduct Botanigard. Botanigard is a product used in biological control in many countries around the world to control a wide range of pests of various plant species. In this thesis, "*in vitro*" (radial growth, spore production) and "*in vivo*" parameters (virulence) of the GHA strain of *Beauveria bassiana* were tested at various temperatures on different nutrient media. The most optimal temperature for radial growth of the GHA strain was 25 °C, on media with a nitrogen to carbon ratio of 20:20. The GHA strain produced the largest amount of conidia on the medium with a nitrogen/carbon ratio of 20:40 at temperature 25 °C. On the contrary, the smallest conidia production was obtained on medium PDA and nitrogen/carbon medium in ratio 5:10. The temperature of 25 °C was also the most optimal for the infection of larvae of *Tenebrio molitor*. Thesis also deals with the comparison of blastospores production of GHA strain with other strains of *B. bassiana* isolated from different geographical areas. The strain isolated in Argentina had the highest production of blastospores on MEB medium.

Key words: biological control, *Beauveria bassiana* GHA strain, ration N:C, radial growth, spore production, temperature

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	10
2.1	Biologická ochrana rostlin	10
2.2	Entomopatogenní houby.....	13
2.3	Vývojový cyklus entomopatogenních hub	14
2.4	Faktory ovlivňující entomopatogenní houby	15
2.4.1	Abiotické faktory	15
2.4.2	Biotické faktory.....	16
2.5	Významný rod entomopatogenních hub <i>Beauveria</i> sp.	16
2.6	Významný druh <i>Beauveria bassiana</i>	17
2.7	Další významné druhy entomopatogenních hub	18
2.8	Produkce spor entomopatogenních hub.....	19
2.9	Povrchová kultivace entomopatogenních hub.....	20
2.10	Submerzní kultivace entomopatogenních hub	21
2.11	Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub	21
3	MATERIÁL A METODIKA	23
3.1	Kmeny entomopatogenní houby <i>B. bassiana</i>	23
3.2	Agarizované živné půdy.....	24
3.3	Tekuté živné půdy.....	24
3.4	Potemník moučný.....	24
3.5	Příprava suspenze.....	25
3.6	Založení středových kultur	25
3.7	Radiální růst.....	25
3.8	Výtěžnost konidií na pevných agarizovaných půdách.....	25
3.9	Produkce blastospor.....	26
3.10	Biotest na larvách potemníka moučného	26
3.11	Statistická analýza	27
4	CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	28
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY.....	29
5.1	Vliv teploty a živné půdy na růst a vývoj entomopatogenní houby <i>B. bassiana</i> kmene GHA29	
5.2	Porovnání výtěžnosti spor kmene GHA entomopatogenní houby <i>B. bassiana</i> na různých živných médiích a v různých teplotních podmínkách.....	37

5.3	Porovnání výtěžnosti blastopor vybraných kmenů entomopatogenní houby <i>B. bassiana</i> na různých živných médiích	42
5.4	Testování účinnosti entomopatogenní houby <i>B. bassiana</i> kmene GHA proti larvám potměníka moučného (<i>Tenebrio molitor</i>) v různých teplotních podmínkách	54
6	DISKUZE	60
7	ZÁVĚRY BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	64
8	PŘEHLED LITERATURY	65
9	PŘÍLOHY	72

1 ÚVOD

V současné době se z důvodu stále se zvyšující populace ve světě rozšiřují potravinové alergie, intolerance a různé stravovací směry jako jsou např. vegetariánství, veganství, makrobiotika, bezlepková strava, bezlaktózová strava a další. Z tohoto důvodu je stále se zvyšující poptávka zejména po rostlinné produkci a tzv. bioproduktech. V současné době jsou biopotraviny světovým trendem ve stravování. Zájem spotřebitelů o biopotraviny stále narůstá. Každá takto označená surovina je produktem ekologického zemědělství. V ekologickém zemědělství se nesmí používat chemické pesticidy a minimalizuje se negativní dopad na životní prostředí, necílové organismy a zdraví lidí. V ekologickém zemědělství je cílem zajistit, aby se nežádoucí látky nedostaly do půdy, vody, ke zvířatům a k lidem. V tomto systému hospodaření je kladen důraz na tzv. biologickou ochranu rostlin, kde se využívají biologické přípravky k redukci škodlivých organismů. Mezi tyto biologické přípravky patří různé mikroorganismy, jako jsou např. entomopatogenní houby, bakterie, hlístice a viry proti škůdcům. Dále se proti škůdcům využívají makroorganismy na bázi parazitoidů a predátorů. Proti chorobám se mohou využívat např. mykoparazitické houby. Nejen v ekologickém zemědělství se klade důraz na používání alternativních metod ochrany rostlin. Od 1.1.2014 je pro každého profesionálního pěstitele povinná integrovaná ochrana rostlin, kde je také snaha redukovat používání chemických pesticidů.

Tato bakalářská práce je zaměřena na biopreparát na bázi entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* kmen GHA Botanigard. Botanigard je biologický přípravek, který se využívá v biologické ochraně rostlin k redukci významných škůdců v mnoha zemích světa. Přípravky na bázi entomopatogenních mikroorganismů jsou většinou půdního charakteru a jejich velkou výhodou je, že se po aplikaci na rostlinu mohou nadále v půdě udržet i několik let po aplikaci. Další výhodou použití entomopatogenních hub konkrétně houby *Beauveria bassiana* je jejich široký hostitelský okruh.

V této bakalářské práci jsou shrnuty základní informace o entomopatogenní houbě *Beauveria bassiana* a přípravku Botanigard. Tento přípravek je zde testován v laboratorních podmínkách. Botanigard byl testován na růstové a produkční parametry v různých teplotních podmínkách a na různých živných médiích. Dále byl tento biopreparát testován na virulenci proti larvám potměníka moučného v různých teplotních podmínkách. A okrajově byly také testovány i jiné kmeny houby *Beauveria bassiana*, kde byla sledována a porovnávána produkce blastospor na různých živných médiích. Výsledky této bakalářské mohou být prospěšné v praktickém využití entomopatogenní houby *Beauveria bassiana*.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Biologická ochrana rostlin

Biologická ochrana rostlin je ochrana zaměřená na udržení přirozené rovnováhy mezi užitečnými a škodlivými organismy. Biologická ochrana je tedy založena na záměrném používání živých organismů proti živým organismům. Výsledkem této ochrany je regulace četnosti všech škodlivých činitelů, ať už se jedná o škůdce kulturních plodin, tak i patogenů rostlin a plevelů (Dufour, 2001).

V biologické ochraně proti škůdcům se využívají přirozené přírodní prostředky na bázi makroorganismů, do nichž řadíme různé druhy hmyzu a dravých roztočů. Přípravky na bázi makroorganismů dělíme na predátory a parazitoidy (Hajek, 2004). Predátoři, jakožto organismy, které konzumují své oběti (kořist), náleží do mnoha řádů hmyzu, např. Diptera, Neuroptera, Coleoptera, Hemiptera, Hymenoptera a zároveň sem patří velká skupina dravých roztočů. Parazitoidi jsou organismy, které jsou na svého hostitele vázány převážně alespoň částí svého vývojového cyklu, tzn., že se vyvíjí uvnitř hostitelských stádií. Parazitoidi jsou úzce specializovaní a vázání vždy na jeden druh/rod popř. čeleď hostitele. Úzká specializace je i ve smyslu stádia, které konkrétní parazitoid parazituje. Někteří parazitoidi jsou vázány pouze na vajíčka, některé na larvy hostitelů. Parazitoidi se nazývají obecně parazitické vosičky, protože náleží do řádu Hymenoptera. Jednoduše lze říci, že přípravky na bázi makroorganismů neohrožují jiné organismy než ty, na něž jsou zaměřené (Landa, 2002; Van Driesche a Heinz, 2004; Honěk a kol., 2008).

Vedle přípravků na bázi makroorganismů se v biologické ochraně rostlin používají i přípravky na bázi mikroorganismů, kam řadíme entomopatogenní viry, entomopatogenní bakterie, entomopatogenní houby a entomopatogenní hlístice, které jsou určeny pro regulaci škůdců (Butt a kol., 2001). V biologické ochraně proti patogenům se používají mykoparazitické a antagonistické houby a antagonistické bakterie (Ghorbanpour a kol., 2018).

Mezi strategie biologické ochrany se řadí konzervace přirozených nepřátel, inokulativní introdukce a augmentace (Eilenberg a kol., 2001). Konzervace přirozených nepřátel má čistě ekologický charakter, a napomáhá podpořit a tím navýšit v přírodě četnost přirozených nepřátel škůdců kulturních rostlin. Přirozeně se vyskytující užitečný hmyz lze podpořit výsevem kvetoucích pásů v blízkosti polí. Zároveň jsou pro užitečný hmyz důležité interakční prvky v přírodě, biokoridory a remízky, kde je hmyz chráněn a zároveň kvetoucí keře a stromy mohou být zdrojem potravy, protože někteří přirození nepřátelé jsou schopni se

živit i alternativní potravou jako je nektar nebo pyl. Zároveň na těchto ekologických prvcích se vyskytují herbivoři, kteří slouží jako potrava pro užitečný hmyz v době, kdy na polích není zatím přítomna jejich kořist nebo hostitel (Honěk a kol., 2008).

Inokulativní introdukce (pokrytí) má komerční charakter, kdy je tato strategie založena na záměrném dodání přirozených nepřátel škůdců rostlin za pomoci biopreparátů (přípravků) na bázi makroorganismů. Příkladem inokulativní introdukce je vnesení přirozených nepřátel do systému trvalých kultur, jako jsou sady nebo vinice. Mezi osvědčený systém patří introdukce dravého roztoče *Typhlodromus pyri* proti svilušce chmelové (*Tetranychus urticae*) a svilušce ovocné (*Tetranychus cinnabarina*) do sadů nebo na rostliny révy vinné (Landa, 2002; Van Driesche a Heinz 2004).

Augmentace neboli zvýšení se zakládá opět na záměrném využití přirozených nepřátel, a jedná se o biotechnologický charakter, kdy se přirození nepřátelé produkují ve velkokapacitních chovech komerčních firem. Velkokapacitně se množí nejen makroorganismy, ale i mikroorganismy. Augmentaci lze dělit na dvě strategie, které jsou běžně v praxi zavedené (Landa, 2002).

První je inundativní strategie, kde se využívají přípravky na bázi makroorganismů i mikroorganismů v polních podmínkách k regulaci škůdců, kteří prodělávají jednu až dvě generace do roka. Příkladem je využití dravých vosiček rodu *Trichogramma* spp. proti zavíječi kukuřičnému (*Ostrinia nubilalis*). Parazitické vosičky kladou vajíčka do vajíček zavíječe kukuřičného, a tímto způsobem, je parazitují. Uvnitř vajíček prodělávají celý svůj vývojový cyklus. Na konci vývoje se z vajíčka zavíječe vykousne dospělec parazitoida. V rámci této strategie může být proti zavíječi kukuřičnému využit i mikroorganismus, konkrétně entomopatogenní bakterie *Bacillus thuringiensis* (Eilenberg a kol., 2001).

Druhá strategie v rámci augmentace je sezónní inokulativní strategie, která je zaměřena na skleníky a spočívá v opakované introdukci velkého množství přirozených nepřátel k regulaci populací skleníkových škůdců. Ve sklenících lze kombinovat proti jednomu cílovému škůdci více přirozených nepřátel ať už z kategorie predátor nebo parazitoid. Pro tuto směsnou introdukci je důležité mít znalosti ohledně bionomie nejen přirozených nepřátel, ale i daného škůdce (Helyer a kol., 2014). Pro introdukci přirozených nepřátel do skleníků, je důležité dělat důkladný průzkum výskytu škůdců v porostech pěstovaných plodin. Tomuto průzkumu se říká monitoring, který je velmi důležitý pro zvolení vhodného parazitoida nebo predátora, popřípadě kombinaci vícero druhů přirozených nepřátel. V dávné minulosti, na začátku všech strategií, před komercializací přirozených nepřátel, byla využívána činnost, kdy se přirození nepřátelé sbírali v přírodě a následně se

vnášeli do populací škůdců ve skleníku. Tato strategie je známá pod pojmem klasická ochrana rostlin. Příklad takového počínání bylo a je sbírání sluněček (*Coccinella septempunctata*, *Hippodamia convergens*, aj.) v přírodě a jeho následné vnášení do populací mšic, které je nutné eliminovat (Landa, 2002; Van Driesche a Heinz 2004).

Tabulka 1: Další příklady přípravků využívajících se záměrně v biologické ochraně rostlin

Kategorie	Přirozený nepřítel	Cílový škůdce
Parazitoidi	<i>Aphidius colemani</i> , <i>A. ervi</i> , <i>Aphelinus abdominalis</i>	mšice
	<i>Encarsia formosa</i> , <i>Eretmocerus eremicus</i>	molice
	<i>Diglyphus isaea</i> , <i>Dacnusa sibirica</i>	vrtalky
Predátoři	<i>Amblyseius cucumeris</i> , <i>Amblydromalus limonicus</i> , <i>Orius laevigatus</i>	třásněnky
	<i>Aphidoletes aphidimyza</i>	mšice
	<i>Cryptolaemus montrouzieri</i>	červci
	<i>Stratiolaelaps scimitus</i>	smutnice
	<i>Macrolophus pygmaeus</i> , <i>Amblyseius swirskii</i> , <i>Delphastus pusillus</i>	molice
	<i>Phytoseiulus persimilis</i> , <i>Neoseiulus californicus</i> , <i>Feltiella acarisuga</i> , <i>Amblyseius swirskii</i>	svilušky
Entomopatogenní hlístice	<i>Steinernema carpocapsae</i> , <i>S. feltiae</i> ,	larvy brouků, motýlů, smutnice, třásněnky
	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	bázlivec kukuřičný, lalokonosci,
	<i>Phasmarhabditis hermaphrodita</i>	slimácci, plzáci
Entomopatogenní bakterie	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>israelensis</i>	dvoukřídlí
	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>tenebrionis</i>	brouci
	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i>	motýli
Entomopatogenní viry	Granulózní viry	motýli
	Viry jaderné polyedrie	motýli
Entomopatogenní houby	<i>Beauveria bassiana</i>	brouci, dvoukřídlí, stejnokřídlí, blanokřídlí,
	<i>Isaria fumosorosea</i>	
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	motýli, rovnokřídlí,
	<i>Lecanicillium lecani</i>	třásnokřídlí, roztoči

(Upraveno podle Helyer a kol., 2014; Gani a kol., 2019)

Biologická ochrana rostlin je jednou z metod Integrované ochrany rostlin (IOR). Vedle biologické metody se v rámci IOR používají další metody, které se vzájemně kombinují

s cílem omezit dominantní používání pesticidů a jiných chemických látek, které jsou schopny narušit biodiverzitu a zanechávají rezidua v půdě. Integrovaná ochrana rostlin vešla v platnost od 1. 1. 2014 a každý profesionální uživatel musí dodržovat zásady IOR. IOR se tedy uplatňuje ve všech systémech hospodaření, ať se jedná o konvenční zemědělství, integrovanou produkci, tak i ekologické zemědělství (Hnízdil, 2014a). Hlavní opatření IOR se zaměřují na agrotechnické metody, tj. střídání plodin, správné pěstitelské postupy, odolné odrůdy (vhodné pro danou oblast), vyvážené hnojení, dále se pak uplatňují nechemické „alternativní“ metody, které jsou schopny zamezit šíření škůdců a původců onemocnění rostlin. Chemické metody ochrany rostlin jsou v rámci IOR povoleny, ale musí se dodržovat zásady IOR, které jsou uvedeny ve Vyhlášce 205/2012 Sb. Klíčovou zásadou je monitoring výskytu škůdců a původců onemocnění, protože na základě monitoringu se vybírá metoda ošetření dané plodiny (vyhláška č. 205/2012 Sb.; Hnízdil, 2014b).

Mezi alternativní metody se řadí fyzikální a mechanické metody, kdy se škůdci ničí pomocí fyzikálních veličin nebo pomocí netkaných textilií, lapačů, lepových desek atd. Některé se mohou uplatňovat jen na menších plochách. Příkladem je sběr mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*). Tento způsob je ovšem časově náročný a fyzicky pracný (Dostálek, 2000; Pavela, 2006). Nechemickou metodou napomáhající nejen mechanickému ničení, ale monitoringu výskytu jsou tzv. rostlinné výluhy, využívající se k nalákání rostlinných škůdců (Pavela, 2006). Další alternativní možnost ochrany je za pomoci jiných rostlin sloužících tentokrát jako odpuzovače. Například proti mandelince bramborové se využívá křen selský (*Armoracia rusticana*), proti mšicím se vysazuje lichořeřišnice větší (*Tropaeolum majus*) a proti plošticím rostliny levandule lékařské (Kreuter, 2002; Richbergová, 2010).

2.2 Entomopatogenní houby

Entomopatogenní houby jsou skupinou heterotrofních eukaryotických organizmů asociovaných s hmyzem. Dnes je již známo přes 750 druhů hub schopných působit jako obligátní či fakultativní původci onemocnění široké škály druhů hmyzu (Landa, 2002; De Faria a Wraight, 2007). Mezi hostitele patří řády ploštice (*Hemiptera*), rovnokřídlí (*Orthoptera*), třásnokřídlí (*Thysanoptera*), stejnokřídlí (*Homoptera*), brouci (*Coleoptera*), motýli (*Lepidoptera*) a dvoukřídlí (*Diptera*). Většina entomopatogenních hub funguje jako patogen, ale některé mohou žít s hostiteli v symbióze (Landa, 1994). Velkou výhodou

entomopatogenních hub je schopnost infikovat veškerá vývojová stádia hmyzu, ovšem nejvíce jsou schopny infikovat larvy a kukly (Bailey a kol., 2010). Nejčastěji penetrují do těla hostitele tam, kde jsou méně sklerotizované části těla. Jedná se zejména o místa mezi hlavou a hrudí nebo hrudí a zadečkem, dále houby pronikají přes přirozené otvory (ústní, dýchací a řitní otvor). Po penetraci do patogena dochází k rychlé kolonizaci do jednotlivých tkání a následné smrti (Inglis a kol., 2001).

Některé entomopatogenní houby jsou specifické a mohou napadat pouze určité hostitele, či jen určitá vývojová stádia, příkladem může být houba *Nomuraea rileyi* parazitující pouze na larvách motýlů (Palma a Del Valle, 2015). Houba *Aschersonia* sp. infikuje buď jen červce, nebo molice. Jiné entomopatogenní houby mají naopak širokou škálu hostitelů, mezi takové můžeme řadit houby *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea*, *Lecanicillium muscarium*, *Lecanicillium lecanii* aj. (Shah a Pell, 2003).

Díky jejich vlastnostem způsobovat onemocnění hmyzu, se tyto houby používají v biologické ochraně rostlin. Nejen v půdním prostředí jsou schopny vyvolat epizootie v populacích škůdců. Mnoho druhů entomopatogenních hub je přirozenou součástí půd, ale v přirozeném prostředí se nacházejí v malém množství, a tak nestačí k redukci půdních škůdců (Koubová, 2009).

Ve světě se v rámci biologické ochrany rostlin využívají biopreparáty na bázi druhů entomopatogenních hub proti škůdcům. Mezi tyto druhy patří již zmíněné druhy *B. bassiana* (Mycotrol, BotaniGard), *I. fumosorosea* (Mycomite, NoFly, PFR 97), *M. anisopliae* (Biocane, Met52), *L. lecanii* (Mycotal, Mealikil). Biopreparáty jsou registrovány proti konkrétním škůdcům, tj. mají daný hostitelský spektrum. Příkladem je biopreparát Mycotal, který je registrován proti mšicím, vrtalkám a proti molícím. Jiné biopreparáty mají širší hostitelské spektrum např. Mealikil účinkuje proti mšicím, trásněnkám, moučným červům (Sharma a kol., 2015). Nevýhodou použití entomopatogenních hub v biologické ochraně rostlin je jejich závislost na vhodných podmínkách prostředí, zejména pak na teplotě a vlhkosti. Zároveň i doba účinnosti je ve srovnání s chemickými insekticidy delší (Věchet, 2014).

2.3 Vývojový cyklus entomopatogenních hub

Vývojový cyklus entomopatogenních hub se skládá ze dvou fází, a to z fáze parazitické, kdy houbový organismus proniká do těla hostitele a saprotrofní, která nastává po usmrcení hostitele. První krok je přichycení konidií na povrchu hostitele. Konidie se

přichycují za pomoci adhezivních látek, které jsou na jejich povrchu. Další možnosti přichycení jsou hydrofobní interakce a elektrostatické interakce (Samson a kol., 2001; Schrank a Vainstein 2010).

Po přichycení konidie dochází ke klíčení a tvorbě penetračního hrotu. V této době nepotřebuje konidie externí živiny. Klíčení je nastartováno za pomoci různých abiotických faktorů, jako je vlhkost a teplota. V podmínkách vyšší vzdušné vlhkosti dochází k tomu, že konidie začíná bobtnat a následně se objevuje primární klíček (Helyer a kol., 2014). Postupně se klíček prodlužuje, vytváří hyfu a pomocí hyf je houbový patogen schopen penetrovat přes kutikulu do těla hostitele. Během této fáze překonává obranné reakce hostitele. Vlastní penetrace probíhá přes apresorium, kde probíhá enzymatická aktivita a následně penetrační hrot prorazí kutikulu pomocí tlaku. Po proniknutí entomopatogenní houba přijímá z těla hostitele živiny. Entomopatogenní houby jsou schopny produkovat i primární metabolity, toxické látky, které jsou schopny narušovat chitinovou kutikulu při pronikání (Hajek a St. Leger, 1994). Při dalším kroku parazitické fáze dochází k absorpci živin ve fázi kolonizace jednotlivých tkání a orgánů hmyzího hostitele. Po proniknutí do hemolymfy dochází k přeměně vláknité formy na tzv. kvasničná tělíska (blastospory). Pučením se blastospory rychle dělí a vyplňují tělní dutinu těla hostitele. Po usmrcení houba proliferuje na povrch hostitele, kde se houba rozrůstá myceliem a začíná sporulovat, vytvářet konidie nové generace. Tato fáze po usmrcení hostitele se nazývá saprotrofní, houba čerpá živiny z mrtvého hostitele (Tanada a Kaya, 1993; Zimmermann, 2007a,b).

2.4 Faktory ovlivňující entomopatogenní houby

2.4.1 Abiotické faktory

Pro vypuknutí epizootie v populaci hmyzího hostitele musí být vhodné podmínky prostředí, abiotické faktory, jako jsou teplota, sluneční záření, vlhkost a UV záření (Inglis a kol., 2001). Nejčastější optimální uváděná teplota pro růst entomopatogenních hub je od 20 do 30 °C (*M. anisopliae* má optimum 23 °C, ovšem některé druhy mohou mít optimum v jiných rozmezech). Například izoláty pocházející z Evropy mohou mít široké teplotní rozmezí od 8 do 30 °C a izoláty pocházející například z Indie 32 až 35 °C. Záleží tedy i na geografickém místě izolace kmenů hub (Vestergaard a kol., 1995). Teplota je jedním z nejdůležitějších faktorů. Vyšší teploty mohou urychlit vývoj patogenů, a to může znemožnit

proniknutí entomopatogenních hub, vypovídá to o tom, že teplota je závislá na rychlosti infekce v čase (Inglis a kol., 2001).

Relativní vzdušná vlhkost je druhým nejdůležitějším faktorem, který ovlivňuje účinnost entomopatogenních hub. Vlhkost je důležitá ve fázi klíčení konidií entomopatogenních hub a pak následně ve fázi proliferace na povrch usmrceného hostitele (Roberts a Campbell, 1977; Daoust a Roberts, 1983; Inglis a kol., 2001). Fargues a Luz (2000) zjistili, že pro tvorbu konidií u *Beauveria bassiana* na povrchu mrtvých jedinců je požadovaná relativní vlhkost nad 93 %.

Mezi entomopatogenními druhy a jejich kmeny existuje široká tolerance vůči slunečnímu záření (Fargues a kol., 1997; Inglis a kol., 2001). Hlavní negativní vlastností slunečního záření (UVA a UVB) je degradace houbových propagulí. Houbové konidie mohou být usmrceny na přímém slunci již po 3 až 4 hodinách. Přímé slunečné záření též zpomaluje klíčení spor. Bylo prokázáno, že druh *B. bassiana* a *M. anisopliae* jsou odolnější ve srovnání s druhem *I. fumorosea* (Jaronski, 2010).

2.4.2 Biotické faktory

Jak již bylo uvedeno výše, entomopatogenní houby mají široké spektrum hostitelů. Mezi biotické faktory patří odolnost hmyzu, kdy entomopatogenní houby musí překonat imunitní systém hostitele (Baverstock a kol., 2010). Entomopatogenní houby překonávají imunitní systém hostitele dvěma způsoby, buď tvorbou imunomodulačních látek, nebo tvorbou kryptických perzistentních forem, které imunitní systém nedokáže rozpoznat (Schrank a Vainstein, 2010). Vývoj a šíření entomopatogenních hub mohou redukovat i jiné mikroorganismy nacházející se v půdě. Mezi ně patří například bakterie rodu *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces* (McCoy a kol., 1988).

2.5 Významný rod entomopatogenních hub *Beauveria* sp.

Rod *Beauveria* patří mezi přirozeně se vyskytující entomopatogenní, ale i saprotrofní houby v půdách a způsobuje infekce u hmyzu (Landa, 2007). Telemorfní stádium se taxonomicky řadí do říše Fungi, oddělení Ascomycota, řádu *Hypocreales* a čeledi

Cordycipitaceae (Tiago a kol., 2014). Dříve se řadila podle anamorfního stádia do pomocného oddělení *Fungi imperfecti*, třídy *Hyphomycetes*, řádu *Moniliales* (Váňa, 1998).

Hostiteli *B. bassiana* mohou být zástupci řádu brouci (např. chrousti, mandelinka bramborová, potěmník moučný, lýkožrout smrkový), rovnokřídlí (např. krtonožky), stejnokřídlí (mšice, molice) a další řády. Tento druh je schopen infikovat všechna vývojová stádia škůdců (Landa, 1994).

Infekce na hostiteli je započata přichycením konidií na povrch kutikuly, po penetraci pod povrch kutikuly se tělem začnou množit oválné blastospor, proudící po těle hemolymfou (Weiser, 1966), jež v konečné fázi vytváří husté mycelium. Mycelium se vytváří i na povrchu za pomoci prorůstajících hyfových vláken, čímž dochází k celkové mumifikaci hostitele, na němž pak vznikají nové konidie schopné započít nový cyklus patogena (Landa, 2007). Mezi nejvýznamnější druhy rodu *Beauveria* sp. patří *Beauveria brongniartii*, *Beauveria bassiana* a *Beauveria tenella* (De Muro a kol., 2003)

2.6 Významný druh *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana byla objevena již v roce 1834 Agostinem Bassim (Dirlbeková, 1991) a od té doby se zjistili její pozitivní vlastnosti na rostlinných škůdcích a nastartovala se výroba biopreparátů na bázi konidií a blastospor, využívající se zatím pouze v zahraničí v biologické ochraně proti polním, rostlinným, hmyzím škůdcům a proti obraně proti lýkožroutu smrkovému (Landa, 2007). *B. bassiana* vytváří na přirozených i umělých půdách (hostitelích) vláknité mycelium bílé barvy. Velikosti u konidií jsou v rozmezí 2-3 μm a u blastospor 7 μm na 2-3 μm (Weiser, 1966). Houba prorůstá do hostitele hlavně přes jeho kutikulu (Zimmermann, 2007a). Od napadení dojde k úhynu hostitele během 6-7 dní, vlivem různých toxických látek, které houba produkuje jako sekundární metabolity (Helyer a kol., 2014). Vylučovanými toxickými sloučeninami jsou sloučeniny typu beauvericinu a bassianolidu, napomáhající k narušení imunity, paralýze a následnému změknutí tkáně (Meca a kol., 2010).

Beauvericin je mykotoxin se 3 dyhydroxyvaleryovými a 3 methylphenylalaninovými zbytky a bylo potvrzeno, že má antimikrobiální i protinádorové účinky a napomáhá aktivitě a tím i rychlejšímu rozptylu *B. Bassiana* v hostiteli. Dále je prokázáno že beauvericin má i pozitivní účinky v započít infekce u tropického komára (*Aedes aegypti*) (Wang a Xu, 2012).

B. bassiana je široce rozšířený polyfágní druh vyskytující se na více jak 700 druzích hostitelů (Meyling a kol., 2007). Do širokého spektra hmyzích hostitelů patří křísi, molice, mšice z řádu *Hemiptera* vyskytující se nejvíce v uzavřených sklenících, dále larvy smutnic z řádu *Diptera* a z řádu *Coleoptera* Mandelinka bramborová (Helyer a kol., 2014).

B. bassiana je nejvíce zastoupena v mírném pásmu či subtropích až tropech (Kubátová, 2019). Nižší (zimní) teploty přežívá jako saprofyt na rozkládajících se částech hostitelského organismu, živící se organickými zbytky, či jako samotné mycelium na uhynulém hmyzu (Coombs a kol., 2013). Dle určitých studií se může podílet i na rozkladu těžkých kovů v půdě (Boyd, 2002). K ideálnímu růstu vyžaduje teplotu od 23-26 °C, ale snese i teploty do 35 °C. Relativní vlhkost se pohybuje okolo 80 až 100 %. V kombinaci těchto dvou podmínek nastává zvětšování přichycené konidie a vzniku jejího penetračního hrotu. Jak již bylo dříve zmíněno, vývin může být ovlivněn nejen teplotou a vlhkostí, ale i UV zářením a prouděním vzduchu (Diribeková, 1991).

2.7 Další významné druhy entomopatogenních hub

Druhy entomopatogenní houby rodu *Metarhizium* sp. jsou typické půdní houby, které mají vysoký potenciál v biologické ochraně rostlin. Druh *M. anisopliae* byl pojmenován podle brouka, z něhož byl poprvé izolován, a to *Anisoplia austriaca*. Tento rod se vyznačuje po vysporulování konidií zelenou barvou (Bischoff a kol., 2009). Dle druhu a kmene se může morfologie barvy pohybovat od bílé přes žlutou, zelenou až do hněda (Tanada a Kaya, 1993). Vnější vrstva konidií obsahuje hydrofobiny, což jsou bílkoviny napomáhající adhezi na povrch hostitele (Bidochka a kol., 2001). Druh *M. anisopliae* produkuje při různých stupních infekce několik proteinů na hostitelích, jako jsou např. kinasa A, ornitinová karboxyláza, chymotrypsin, trypsin a další (Peng a kol., 2009). Druhy rodu *Metarhizium* mají široký okruh hostitelů a některé kmeny mohou eliminovat i populaci např. termitů a kobylek (Rahimzadeh, 2012).

Zástupci rodu *Isaria* sp. jsou půdní přirozeně se vyskytující houby, které se vyznačují výraznými svazky konidioforů s vejčitými konidiemi. Druhy spadající do rodu *Isaria* sp. reprezentují široce polyfágní entomofágní, akarifágní a nematofágní druhy hub, které iniciují nákazy na zástupcích mnoha řádů hmyzu, fytofágních roztočích a některých druzích hád'átek (Landa, 2002). Běžně se vyskytují v mírném i subtropickém pásmu (Kubátová, 2019). Významný druh *Isaria fumosorosea* byl poprvé odizolován z molice bavlníkové (*Bemisia*

tabaci). Tento druh má široký hostitelský okruh. *I. fumosorosea* může za určitých okolností vykazovat i status mykoparazita. Patogen se jako ektoparazit může vyvíjet na rzích a na různých druzích padlí, např. na konidiích padlí okurkového (Landa, 2002; Zimmermann, 2008).

Entomopatogenní houby rodu *Lecanicillium* sp. patří mezi široce rozšířené polyfágy. Zástupci vytvářejí mycelium bílé až krémové barvy. Spory obsahují lepkavou vnější část, která je zapotřebí ke snadnému přilnutí na povrch hostitele (Humber, 1997). Zástupci rodu *Lecanicillium* sp. se vyskytují ve fytoplánu a specializují se především na savý hmyz. Hostiteli mohou být např. molice bavlníková (*Bemisia tabaci*), molice skleníková (*Trialeurodes vaporariorum*), třásněnka západní (*Frankliniella occidentalis*) a různé druhy mšic (Landa, 2008). Nejvýznamnějšími druhy rodu *Lecanicillium* sp. jsou *Lecanicillium muscarium*, *L. lecani* a *L. longisporum* (Güclü a kol., 2010). Tyto druhy mohou obsahovat také sekundární metabolity tzv. destruxiny, které způsobují zčervenání těl napadených hostitelů (Helyer a kol, 2014).

Zástupci rodu *Aschersonia* sp. jsou úzce specializovaní na molice a červce. Jsou to houby, které se vyskytují v tropech a subtropích. Druhy rodu *Aschersonia* sp. napadají hlavně larvální stádia hostitelů (Fransen, 1995). Již na počátku 20. století aplikovaly houby *Aschersonia aleyrodis* američtí pěstitelé citrusů do svých sadů proti molicím. *A. aleyrodis* je nejběžněji se vyskytujícím druhem, která produkuje pyknidy s konidiofory na vnitřní straně. V pyknidách se formují pestrobarevné pyknospory, které jsou následně vytlačovány ve formě žlutého, oranžového nebo červeného exudátu „mucilagenu“ (Landa, 2002). Tento druh má vysokou toleranci vůči vlhkosti a dlouhou perzistenci na listovém povrchu rostliny (Fransen, 1987).

2.8 Produkce spor entomopatogenních hub

Masová produkce entomopatogenních hub je zásadním parametrem pro výrobu komerčních biopreparátů na bázi konidií nebo blastospor. V současné době je na trhu přes 110 komerčních produktů, 40 % z nich je založených na bázi *B. bassiana*, 39 % na bázi *M. anisopliae*, a další jsou na bázi dalších druhů entomopatogenních hub (*Isaria fumosorosea*, *Isaria farinosa*, *Lecanicillium muscarium* a *Lecanicillium longisporum*) (De Faria a Wraight, 2007). Ve světě se využívají i biopreparáty, které jsou složené z různých druhů entomopatogenních hub jako směsi, např. v Ekvádoru jsou takové přípravky běžně dostupné

(Jaronski, 2014). Pro masovou produkci entomopatogenních hub je potřeba dobrá kultivovatelnost na umělých živných médiích. Výhodou těchto hub je, že se dají velmi dobře kultivovat na živných médiích (Humber, 1997). Primární výrobní metodou malých, středních, ale i velkých nadnárodních podniků zaměřujících se na biopreparáty je produkce spor za pomoci vzdušné fermentace pevných substrátů tzv. povrchová kultivace. Může se použít i tzv. bifazická fermentace, při které se využívá k aplikaci na pevném médiu kapalné inokulum. Cílovým produktem jsou pak vzdušné konidie. Další metodou je tzv. submerzní kultivace, při které se produkuje blastospor (Goettel a Inglis, 1997).

Každá z těchto metod produkce spor je závislá na kultivaci za určité teploty, vlhkosti, proudění vzduchu, na chemickém složení kultivačních médií a na druhu použité entomopatogenní houby. Standardní výtěžnost spor by se měla pohybovat v řádech 4×10^{12} - 10^{13} spor na kg pro houby *B. bassiana* a *M. anisopliae* (Bradley a kol., 1992; 2002; Jaronski, 2014; Lopez-Perez a kol., 2015). Živiny v živných půdách jsou klíčovými prvky podporující růst entomopatogenních hub. Fungují jako zdroje energie a kofaktory pro biochemické reakce. Mezi takové živiny patří uhlík, dusík, kyslík, vodík, minerály a vitamíny. Každý druh entomopatogenní houby vyžaduje různé poměry koncentrací těchto látek. Určit vhodný poměr živin je časově náročné a pracné a vyžaduje znalosti o daném druhu entomopatogenní houby. Správné poměry základních živin mohou znatelně zkrátit dobu fermentace/kultivace a zvýšit efektivnost masové produkce entomopatogenních hub (Jackson, 1997; Jaronski, 2014).

2.9 Povrchová kultivace entomopatogenních hub

Povrchová kultivace se provádí v „*in vitro*“ systémech na pevných nebo kapalných médiích, či přirozených substrátech. Nejběžnějšími přirozenými substráty využívanými pro masivní produkci jsou kroupy, pšenice, rýže, proso, vylisovaná cukrová třtina a jiné. Umělé živné půdy se obohacují o agar. Nejčastěji se využívají např. média PDA (Potato Dextrose Agar), SDA (Sabourad Dextrose Agar obohacený o kvasnicový extrakt), MEA (Malt Extract Agar) a další (Landa a Jiranová, 1989). Studie Sahayaraj a Namasivayam (2008), testovala produkci spor několika druhů entomopatogenních hub na různých přirozených substrátech (Tabulka 2).

Tabulka 2: Ukázka produkce spor hub na přirozených substrátech

Přirozený substrát	Koncentrace spor hub ($\times 10^{10}/100$ g) po 15 dnech ve 28 °C		
	<i>B. bassiana</i>	<i>I. fumosorosea</i>	<i>L. lecani</i>
rýže	11,24	8,76	8,43
pšenice	11,76	9,71	9,13
čirok	10,24	10,37	11,31
proso	9,76	10,26	10,17
kukuřice	9,44	10,11	7,54

(Upraveno podle Sahayaraj a Namasivayam, 2008).

Pro houbu *B. bassiana* byla pro produkci spor po přepočtu na 100 g substrátu nejoptimálnější pšenice a pro houby *I. fumosorosea* a *L. lecani* čirok. Každý druh entomopatogenní houby pro produkci spor vyžaduje různé přirozené substráty.

2.10 Submerzní kultivace entomopatogenních hub

Blastospory jsou spory, které se tvoří v semi-aerobních podmínkách v hemolymfě hostitele. Jsou to tenkostěnné kvasinkám podobné útvary (Hegedus a kol., 1990). Tento proces lze simulovat i uměle tzv. submerzní kultivací. Touto kapalnou metodou vzniká více biomasy hub než na pevném substrátu. Pro využití v biopreparátech je nutné, aby byly blastospory tolerantní k vysychání. Sušení se provádí za pomoci konzervačních látek, kdy vznikají granulované formy – pelety (Rombach a kol., 1988). Houby rodu *Metarhizium* sp. mohou produkovat za určitých nutričních podmínek a provzdušňování tzv. mikrosklerocia. Tyto útvary lze lehce sušit na vzduchu, což usnadňuje výrobu pelet do biopreparátů (Jackson a Jaronski, 2009). Výhodou blastospor je, že jsou šetrnější k životnímu prostředí (Jaronski, 2016).

2.11 Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub

V současné době je snaha redukovat používání chemických pesticidů v ochraně rostlin a entomopatogenní houby se jeví jako významná alternativa. Mezi registrované biopreparáty na bázi těchto hub patří např. BotaniGard ES, Mycotrol-ESO, Myco-Jaal a Naturalis-L na bázi *B. bassiana*, NoFly WP, Pfr-97 WDG na bázi *I. fumosorosea*, BioCane, Metarril, Ory-X, Met52 EC na bázi *M. anisopliae* a *M. brunneum*, Phule Bugicide, Mycotal na bázi *L. lecani* a další (Dara, 2017). Aplikace přípravků na bázi hub může být přímo postřikem na listy nebo do půdy, máčením kořenů rostlin nebo za pomoci vektorů. Nejoptimálnější je aplikace

pomocí postřiku přímo na cílového škůdce (Kim a kol., 2010). Při máčení kořenů se účinnost projeví až v průběhu času, ale výhodou je, že jsou konidie chráněny před UV zářením a vysokými teplotami (Sinha a kol., 2016).

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Kmeny entomopatogenní houby *B. bassiana*

V pokusech byly použity kmeny entomopatogenní houby *Beauveria bassiana*, které byly odizolovány v různých zemích, respektive světadílech. Všechny kmeny jsou uloženy ve formě alginátových pelet při -20 °C na Katedře genetiky a speciální produkce rostlinné, Zemědělské fakulty, JU v Českých Budějovicích. Pro vlastní pokusy byly kmeny z alginátových pelet aktivovány a jako čisté kultury byly kultivovány na živné půdě PDA a inkubovány při teplotě 25±1 °C.

Kmen GHA

Kmen GHA je kmen, který je součástí komerčního biopreparátu BotaniGard vyráběný americkou společností Certis USA Llc. Biopreparát je založen na bázi kmene GHA. Pro vlastní pokus byl kmen reizolován přímo z produktu.

Kmen CCM 8382 (ČR)

Kmen CCM 8382 byl odizolován přímo z infikovaného dospělého lýkožrouta smrkového nalezeného na lokalitě Prameny Vltavy, NP Šumava. V grafech je kmen označen jako ČR. V současné době je kmen patentován a jako patentová kultura uložen v České sbírce mikroorganismů (CCM) v Brně.

Kmen Argentina

Kmen označený Argentina byl odizolován v roce 2019 z půdního vzorku odebraného na pozemku Zemědělské fakulty, University of Buenos Aires. Kmen byl odizolován pomocí selektivní živné půdy na bázi dodine.

Kmen Izrael

Kmen označený Izrael byl odizolován v roce 2018 z půdního vzorku odebraného na poli s česnekem v kibucu Sde Eliyahu v Izraeli. Kmen byl opět odizolován pomocí selektivní živné půdy na bázi dodine.

Kmen USA

Kmen označený USA byl odizolován v roce 2011 na Floridě v USA na lokalitě výzkumného ústavu MREC (Mid-Florida Research and Education Center), University of Florida. Izolace kmene byla též provedena pomocí selektivní živné půdy na bázi dodine.

3.2 Agarizované živné půdy

Pro středové kultury byly použity živné půdy PDA (Potato Dextrose Agar), SDA (Sabouraud Dextrose Agar), SLA (sladinový agar), které se komerčně získávají ve formě polotovarů. Zároveň byly testovány živné půdy s různým poměrem N:C, které byly připraveny ze dvou složek a to peptonu (zdroj N) a glukózy (zdroj C) s přídavkem agaru.

Tabulka 3: Poměr složek N a C

	N:C (g/l)	
5:10	5:20	5:40
10:10	10:20	10:40
20:10	20:20	20:40

3.3 Tekuté živné půdy

Pro pokusy založených na produkci blastospor byly použity opět komerčně dostupné polotovary živných pūd, a to PDB (Potato Dextrose Broth), SDB (Sabouraud Dextrose Broth), MEB (Malt Extract Broth) a zároveň byly použity další dvě tekuté živné půdy, které byly připraveny z peptonu (N) a glukózy (C) v poměru 2:2 a 4:1. Poměr zastoupených látek je uveden v gramech na litr (g/l).

3.4 Potemník moučný

Potemník moučný (*Tenebrio molitor*) je chován v laboratorních podmínkách při teplotě 23±2 °C na Katedře genetiky a speciální produkce rostlinné. Jako zdroj potravy se používají pšeničné otruby, ovesné vločky a granule pro psy. Jednotlivá stádia potemníka jsou chována odděleně. Pro vlastní biotest byly použity pouze larvy potemníka moučného.

3.5 Příprava suspenze

Z plně vysporulované 10. denní kultury každého kmene byla připravena konidiová suspenze. Postup spočíval v tom, že vysporulovaná kultura byla přelita sterilním 0,05 % roztokem destilované vody s Tween 80. Spory byly z povrchu uvolněny pomocí inokulační kličky a následně vzniklá suspenze byla slita přes sterilní čtverce gázy do 100 ml Erlenmeyerovy baňky. Gáza byla použita z toho důvodu, aby se oddělily klastry spor, které houba *B. bassiana* vytváří. V každé suspenzi byl spočítán titr pomocí Neubauerovy počítací komůrky a následně byl titr adjustován na koncentraci 1×10^7 konidií na 1 ml. Suspenze o dané koncentraci byla použita jak v „*in vitro*“, tak i v „*in vivo*“ testech.

3.6 Založení středových kultur

Středové kultury byly založeny pouze z kmene GHA pomocí sterilní inokulační kličky, a to nanesením kapky adjustované suspenze na střed různých typů vysterilizovaných agarizovaných půd v plastových Petriho miskách o průměru 90 mm. Po zaschnutí suspenze byly Petriho misky vloženy do plastových sáčků a vloženy do termostatů s různě nastavenými teplotami. Inkubace kmenů probíhala tedy při 10, 15, 20, 25 a 30 °C po dobu 21. dní. Pro každou variantu (teplota/živná půda) byly připraveny 4 opakování.

3.7 Radiální růst

Principem testu bylo stanovení velikosti kultur kmene GHA narostlých na různých agarizovaných živných půdách a v různých teplotních podmínkách. Měření velikosti narostlé kultury bylo provedeno po 7., 14. a 21. dnech, a to na základě dvou vzájemně kolmých průměrů určující šířku dané kultury. Naměřené průměrné hodnoty byly následně použity pro přepočet na plochu kultury v mm^2 .

3.8 Výťažnost konidií na pevných agarizovaných půdách

Principem testu bylo zjistit množství konidií vyprodukovaných při kultivaci kmene GHA na různých druzích živných médiích a v různých teplotách prostředí. Po 21. dnech kultivace byly středové kultury jednotlivě homogenizovány v mixéru s adekvátním množstvím 0,05% roztoku Tween 80. V suspenzi vzniklé po homogenizaci byla stanovena

koncentrace konidií v 1 ml pomocí Neubauerovy počítací komůrky. Získaný výsledek byl vynásoben množstvím suspenze a tím bylo stanoveno množství konidií na 1 středovou kulturu. Pro každou variantu kmene byla provedena dvě opakování. Průměrná hodnota produkce konidií byla použita na stanovení produkce spor na 1mm^2 . Celkové množství konidií ze středové kultury bylo vyděleno plochou kultury. Výsledky produkce na 1mm^2 ze všech variant byly následně mezi sebou porovnávány.

3.9 Produkce blastospor

Principem testu bylo zjistit jaké množství blastospor jsou schopny vyprodukovat jednotlivé kmeny houby *B. bassiana* kultivované v různých tekutých živných médiích. Pro každý kmen byly připraveny 3 standardní živné půdy (PDB, SDB, MEB) a dvě půdy s různým obsahem N:C (4:1 a 2:2) o objemu 95 ml. Živná média byla připravena ve 250 ml Erlenmayerových baňkách, které se daly vysterilovat po dobu 45 minut při $121\text{ }^\circ\text{C}$. Pro každou půdu byla připravena 3 opakování. Do vychlazeného média bylo následně nainokulováno 5 ml suspenze o koncentraci 1×10^7 konidií v 1 ml. Takto připravené Erlenmayerovy baňky byly vloženy na orbitální třepačku a kmen byl kultivován po dobu 7 dní při 150 rpm (otáčkách za minutu) ve $25\text{ }^\circ\text{C}$. První hodnocení bylo provedeno 4. den a pak následně každý den byla stanovena koncentrace blastospor na 1 ml pomocí Neubauerovy počítací komůrky. Následně byla porovnána produkce blastospor u všech testovaných kmenů.

3.10 Biotest na larvách potměníka moučného

Biotest je standardní „*in vivo*“ laboratorní test umožňující evidenci nákazy hostitele pomocí entomopatogenní houby v laboratorních podmínkách. Biotest byl vyhodnocený pomocí stupnice FDI (Fungus Development Index) určující vývoj infekce na těle hostitele. V biotestu bakalářské práce byla testována účinnost kmene GHA entomopatogenní houby *B. bassiana* na larvách potměníka moučného (*Tenebrio molitor*). Pro biotest byly připraveny vlhké komůrky. Biotest probíhal v 5 teplotách ($10\text{ }^\circ\text{C}$, $15\text{ }^\circ\text{C}$, $20\text{ }^\circ\text{C}$, $25\text{ }^\circ\text{C}$ a $30\text{ }^\circ\text{C}$). Celkem do 30 vysterilizovaných destiček o 12 jamkách byly vloženy, vždy po dvou, čtverce filtračního papíru ($1,5 \times 15\text{ mm}$) které byly následně navlhčeny 250 μl 0,05 % roztokem Tween 80. Pro ošetřenou variantu bylo připraveno celkem 15 destiček, tj. 180 larev. Každá

larva byla ponořena po dobu 3 sekund do suspenze kmene o koncentraci 1×10^7 konidií na 1 ml. Po namočení byly larvy umístěny na filtrační papír, aby se odsála přebytečná suspenze. Po odsátí byly larvy vkládány do jednotlivých buněk destiček. Do každé buňky byla vložena 1 larva. V kontrolní variantě byly larvy namáčeny do sterilního 0,05 % roztoku Tween 80. Celkem bylo opět založeno 15 destiček. Po založení biotestu byly destičky vloženy po 3 do neprodyšného sáčku a jedna ošetřená sada a jedna kontrolní sada byla vložena do 10 °C. Stejným způsobem byly rozděleny ostatní destičky a ty byly vloženy do zbývajících teplot. Inkubace probíhala po dobu 10 dnů. První hodnocení bylo provedeno 3. den a následně se sledovala účinnost každý den až do 7. dne a poslední hodnocení bylo provedeno 10. den. Projevy nákazy byly řádně zaznamenány podle stupnice FDI.

Tabulka 4: Hodnotící indexová stupnice (FDI) pro larvy potměníka moučného

Index	Specifikace
0,0	není přítomna žádná známka infekce
0,5	na hostiteli jsou přítomny melanizační skvrny
1,0	tento index vyjadřuje smrt hostitele
1,5	začíná se objevovat vláknité mycelium na povrchu těla hostitele
2,0	tvorba kompaktního mycelia na povrchu těla hostitele
2,5	na konci hyf se začínají objevovat sporulující konidiofory, počínající sporulace
3,0	plně vysporulované mycelium na povrchu těla hostitele

3.11 Statistická analýza

Data vyjádřená v hodnotách procent byla normalizována pomocí arcsinové transformace. Data produkce spor stanovených ze středových kultur byly normalizovány za využití logaritmické transformace $\log_{10}(x + 1)$. Data radiálního růstu nebyly normalizovány. Data byla následně podrobena analýze rozptylu (ANOVA) pomocí softwaru pro statistickou analýzu (StatSoft Inc. 2007). Rozdíly mezi středními hodnotami byly porovnány pomocí Tukeyho testu ($P < 0,05$).

4 CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo hodnotit "*in vitro*" (radiální růst a produkce spor) a "*in vivo*" (virulence) parametry entomopatogenní houby *B. bassiana*. Práce je z velké části zaměřena na růstové a produkční parametry houby *B. bassiana* kmene GHA, který byl reizolován z komerčního biopreparátu Botanigard. Cíle bakalářské práce jsou shrnuty v následujících bodech.

1. Vliv teploty a živné půdy na růst a vývoj entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA.
2. Porovnání výtěžnosti spor kmene GHA entomopatogenní houby *B. bassiana* na různých živných médiích a v různých teplotních podmínkách.
3. Porovnání výtěžnosti blastopor vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na různých živných médiích.
4. Testování entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA na larvách potměníka moučného *Tenebrio molitor* pomocí standardního laboratorního biotestu po inkubaci larev v různých teplotních podmínkách.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

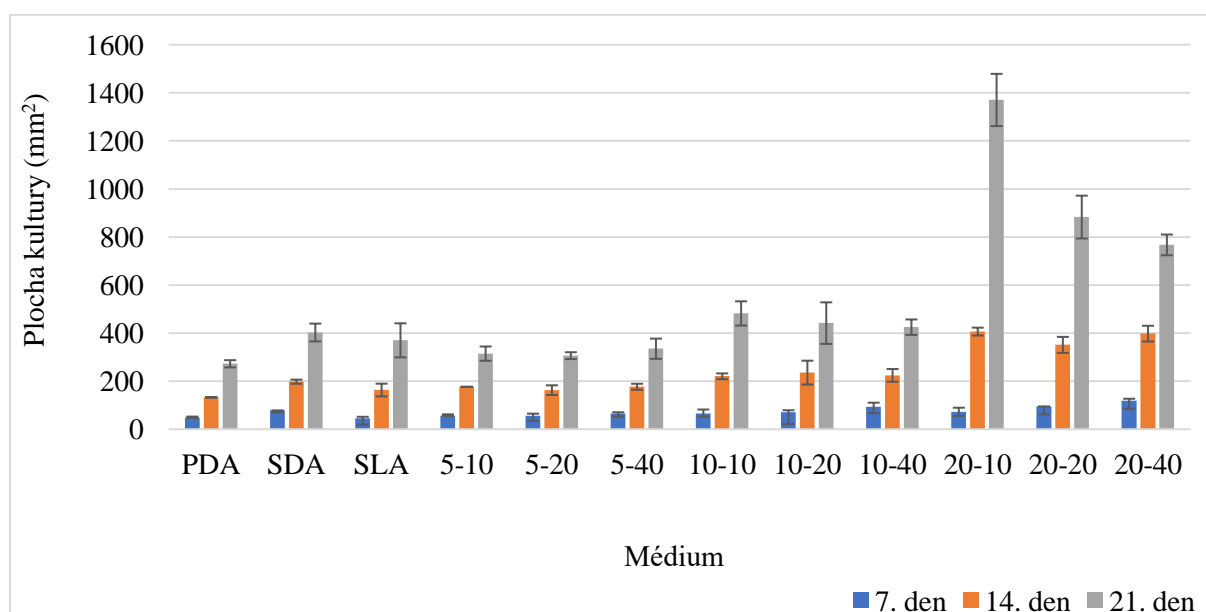
5.1 Vliv teploty a živné půdy na růst a vývoj entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA

Tabulka 5: Vliv živné půdy na plochu kultury kmene GHA entomopatogenní houby *B. bassiana* při kultivaci v teplotě 15 °C

Médium	7. den		14. den		21. den	
	Průměr±SE	Tukey HSD	Průměr±SE	Tukey HSD	Průměr±SE	Tukey HSD
PDA	47,32±5,45	ef	132,73±0,00	e	272,63±15,04	h
SDA	78,54±0,00	bc	198,02±8,61	cd	402,81±37,10	defg
SLA	45,85±6,10	f	163,26±26,59	de	370,22±70,91	efgh
5-10 (N:C)	55,27±6,91	def	176,71±0,00	d	314,75±29,82	gh
5-20 (N:C)	55,47±9,53	def	162,87±20,19	de	306,50±14,18	gh
5-40 (N:C)	65,48±5,28	cd	176,91±12,60	d	335,27±42,10	fgh
10-10 (N:C)	64,80±17,50	cde	220,50±12,00	c	482,23±50,44	d
10-20 (N:C)	71,08±7,98	cd	235,82±49,66	c	441,88±86,53	de
10-40 (N:C)	93,56±17,11	b	224,33±26,45	c	425,10±32,09	def
20-10 (N:C)	71,86±17,86	cd	406,64±16,36	a	1370,91±108,72	a
20-20 (N:C)	95,03±0,00	b	351,17±33,39	b	883,38±89,17	b
20-40 (N:C)	118,01±9,09	a	398,20±32,73	a	767,53±43,23	c

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

Graf 1: Vliv živné půdy na plochu kultury kmene GHA entomopatogenní houby *B. bassiana* při kultivaci v teplotě 15 °C v čase



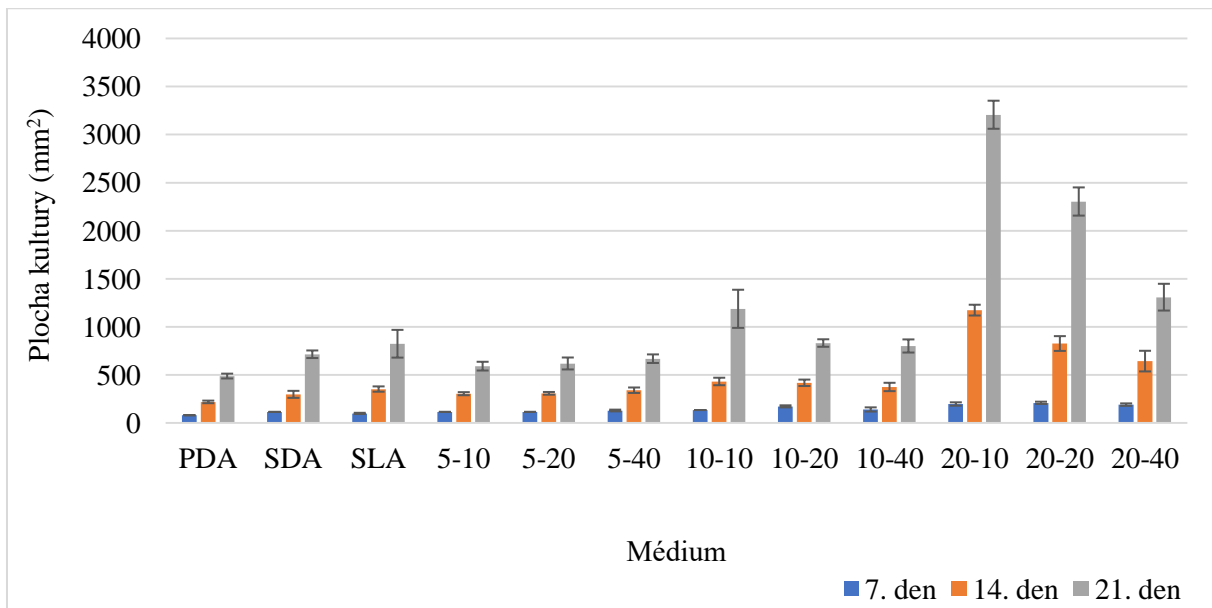
Radiální růst kmene GHA entomopatogenní houby *B. bassiana* byl měřen v průběhu 21 dní. Kolonizace Petriho misek s různými živnými médii byla po 7 dnech inkubace významně statisticky průkazná ($F=34,282$; $df=11,84$; $p=0,00$). Plocha kultury houby *B. bassiana* byla v rozsahu od 45,85 (SLA) do 118,01 mm² kultury (20-40). Nejrychleji houba rostla na médiu složeném z peptonu a glukózy (N:C) v poměru 20-40 (118,01 mm²). Médium v poměru N:C 20-20 bylo kolonizováno také velmi dobře, plocha kultury byla 95,03 mm². Nejpomaleji houba rostla na médiích SLA (45,85 mm²) a PDA (47,32 mm²). Po 14 dnech hodnocení byly nejrychleji kolonizovány média s poměry N:C 20-10 a opět 20-40. Plocha kultury dosahovala 398,20 mm², respektive 406,64 mm². Houba *B. bassiana* po 14 dnech téměř totožně rostla na médiích s poměry základních živin N:C - 10-10, 10-40 a 10-20. Plocha kultury se pohybovala v rozmezí od 220,50 do 235,82 mm². Nejpomaleji houba rostla na živném médiu PDA. Rychlost kolonizace Petriho misek s různými živnými médii byla i po 14 dnech významně statisticky průkazná ($F=121,247$; $df=11,84$; $p=0,00$). Po 21 dnech inkubace byla největší plocha houby *B. bassiana* zaznamenána na médiu s poměry N:C 20-10. Plocha byla 1370,91 na mm² kultury. Tento poměr živin je pro růst entomopatogenní houby *B. bassiana* optimální. Další média pro tento kmen houby tak optimální nebyla. Nejméně houba rostla opět na živném médiu PDA. Plocha kultur byla po 21 dnech hodnocení významně statisticky průkazná ($F=238,235$; $df=11,84$; $p=0,00$).

Tabulka 6: Vliv živné půdy na plochu kultury kmene GHA entomopatogenní houby *B. bassiana* při kultivaci v teplotě 20 °C

Médium	7. den		14. den		21. den	
	Průměr±SE	Tukey HSD	Průměr±SE	Tukey HSD	Průměr±SE	Tukey HSD
PDA	78,54±0,00	g	217,26±13,41	g	486,26±25,06	f
SDA	113,10±0,00	ef	295,80±36,48	fg	713,24±39,38	de
SLA	97,29±6,39	f	350,97±27,58	def	822,51±144,33	d
5-10 (N:C)	113,10±0,00	ef	302,67±15,85	f	589,34±45,59	ef
5-20 (N:C)	113,10±0,00	ef	306,50±14,18	f	617,13±62,21	ef
5-40 (N:C)	127,82±9,09	de	338,70±28,43	ef	666,90±44,49	def
10-10 (N:C)	132,73±0,00	d	429,91±38,92	d	1186,15±198,42	c
10-20 (N:C)	171,02±10,54	c	416,06±33,45	de	829,97±39,04	d
10-40 (N:C)	138,62±21,80	d	372,67±43,34	def	799,24±68,23	d
20-10 (N:C)	195,17±17,62	ab	1172,30±56,08	a	3205,89±146,16	a
20-20 (N:C)	207,54±12,00	a	824,77±76,82	b	2302,88±146,77	b
20-40 (N:C)	188,89±13,01	b	641,87±107,50	c	1307,29±139,19	c

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

Graf 2: Vliv živné půdy na plochu kultury kmene GHA entomopatogenní houby *B. bassiana* při kultivaci v teplotě 20 °C v čase



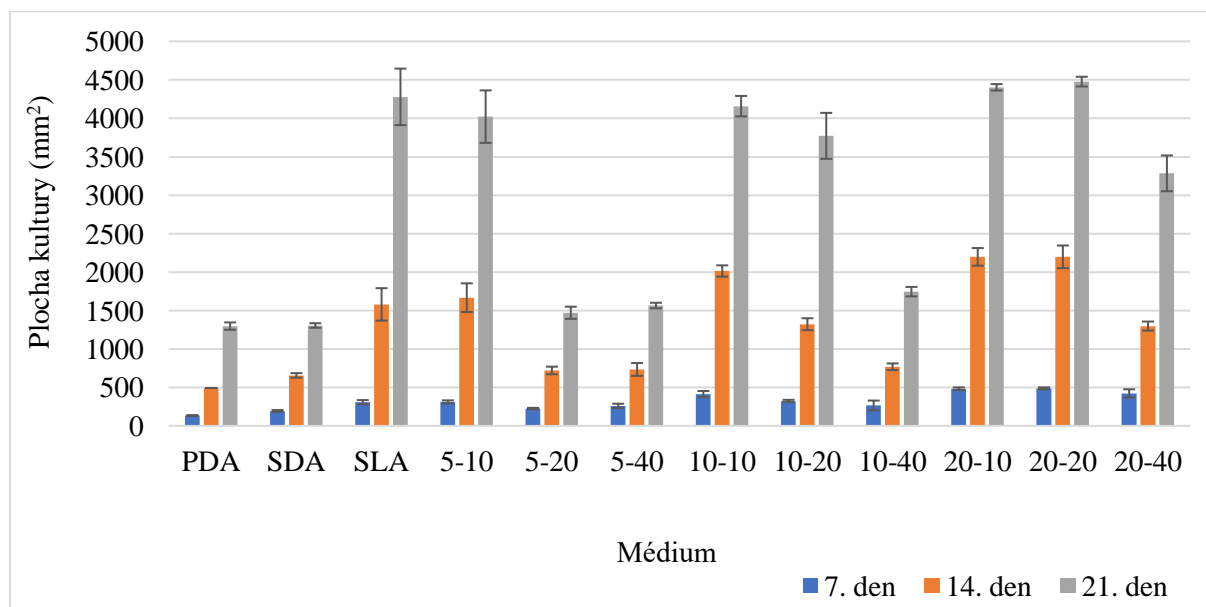
Po 7 dnech hodnocení byla největší plocha kultury na mm² u média s poměrem N:C 20-20 (207,54 mm²). Obecně byla média s poměry N:C kolonizována rychleji v porovnání s komerčně vyráběnými médii. Plocha médií s přidanými živinami dusíku a uhlíku se pohybovala v rozmezí od 113,10 (5-10 a 5-20) do 207,54 mm² (20-20). Nejméně houba rostla na médiu PDA. Plocha byla pouze 78,54 na mm² kultury. Komerčně vyráběné živné médium SDA bylo kolonizováno houbou srovnatelně jako média s poměrem N:C 5-10 a 5-20. Po 7 dnech hodnocení byl radiální růst mezi sledovanými médii významně statisticky průkazný (F=123,90; df=11,84; p=0,00). Kolonizace kultury houbou *B. bassiana* po 14 dnech byla také významně statisticky průkazná (F=256,795; df=11,84; p=0,00). Nejrychleji houba rostla na médiích s poměrem N:C 20-10 a 20-20, plocha na mm² kultury dosahovala 1172,30, respektive 824,77 mm². Radiální růst na médiích s poměrem N:C 5-10 až 5-40 byl nižší v porovnání s médii komerčně vyráběnými s výjimkou PDA. Plocha kultury na živném médiu PDA byla opět nejnižší (217,26 mm²). Tento trend byl zachován i po 21 dnech od založení experimentu. Plocha kultury na médiu PDA byla velmi nízká v porovnání s ostatními použitými médii (486,26 mm²). Optimální média pro růst *B. bassiana* byla v poměru N:C od 20-10 do 20-40. Plocha na médiu s poměrem N:C 20-40 dosahovala až 3205,89 na mm² kultury. Média se v rychlosti radiálního růstu entomopatogenní houby *B. bassiana* významně statisticky lišila (F=463,59; df=11,84; p=0,00).

Tabulka 7: Vliv živné půdy na plochu kultury kmene GHA entomopatogenní houby *B. bassiana* při kultivaci v teplotě 25 °C

Médium	7. den		14. den		21. den	
	Průměr±SE	Tukey HSD	Průměr±SE	Tukey HSD	Průměr±SE	Tukey HSD
PDA	132,73±0,00	h	490,87±0,00	f	1296,59±47,75	g
SDA	191,93±12,60	g	655,12±29,09	ef	1304,35±29,45	g
SLA	306,89±27,03	cde	1579,04±211,07	c	4278,85±367,65	abc
5-10 (N:C)	310,53±20,03	cd	1666,42±186,85	c	4021,82±341,37	c
5-20 (N:C)	223,74±9,16	fg	719,42±49,43	e	1470,07±79,22	fg
5-40 (N:C)	258,69±28,04	ef	732,78±83,47	e	1564,22±36,18	fg
10-10 (N:C)	411,84±40,10	b	2013,46±73,35	b	4157,70±133,06	bc
10-20 (N:C)	322,21±14,91	c	1321,23±77,54	d	3771,68±298,71	cd
10-40 (N:C)	264,68±63,20	def	767,53±43,23	e	1744,66±61,66	f
20-10 (N:C)	481,25±17,81	a	2197,05±114,95	a	4403,23±41,37	ab
20-20 (N:C)	486,06±13,61	a	2198,03±147,29	a	4477,16±63,39	a
20-40 (N:C)	421,46±53,08	b	1296,79±58,96	d	3283,85±232,57	e

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

Graf 3: Vliv živné půdy na plochu kultury kmene GHA entomopatogenní houby *B. bassiana* při kultivaci v teplotě 25 °C v čase



Rychlost kolonizace živných médií entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA byla ve všech hodnocených dnech statisticky průkazná (7. den: $F=108,13$; $df=11,84$; $p=0,00$, 14. den: $F=268,28$; $df=11,84$; $p=0,00$, 21. den: $F=415,16$; $df=11,84$; $p=0,00$). Nejrychleji houba *B. bassiana* rostla po 7 dnech na médiu s poměrem N:C 20-20 (486,06 mm²). Téměř

totožně bylo kolonizováno médium s poměrem 20-10, plocha byla 481,25 na mm² kultury. Velmi vhodná média pro růst tohoto kmene houby byla s poměrem živin N:C 20-40 a 10-10. Nejpomaleji houba rostla na médiích PDA a SDA, plocha kultury byla pouze 132,73 mm² a 191,93 mm². Tato média byla nejméně vhodná pro radiální růst entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA i v následujících hodnocených dnech. Po 14 dnech hodnocení byla nejvíce kolonizována média s poměrem N:C 20-10 (2197,05 mm²) a 20-20 (2198,03 mm²). Po 21 dnech inkubace se tento stav udržel, média s poměry 20-10 a 20-20 poskytovaly houbě *B. bassiana* neoptimálnější podmínky pro růst, plocha houby přepočtená na mm² kultury byla na těchto médiích nejvyšší. Hodnoty plochy dosahovaly 4477,16 mm², respektive 4403,23 mm². Velmi dobře houba rostla i na médiu SLA (4278,85 mm²).

Tabulka 8: Vliv živné půdy na plochu kultury kmene GHA entomopatogenní houby *B. bassiana* při kultivaci v teplotě 30 °C

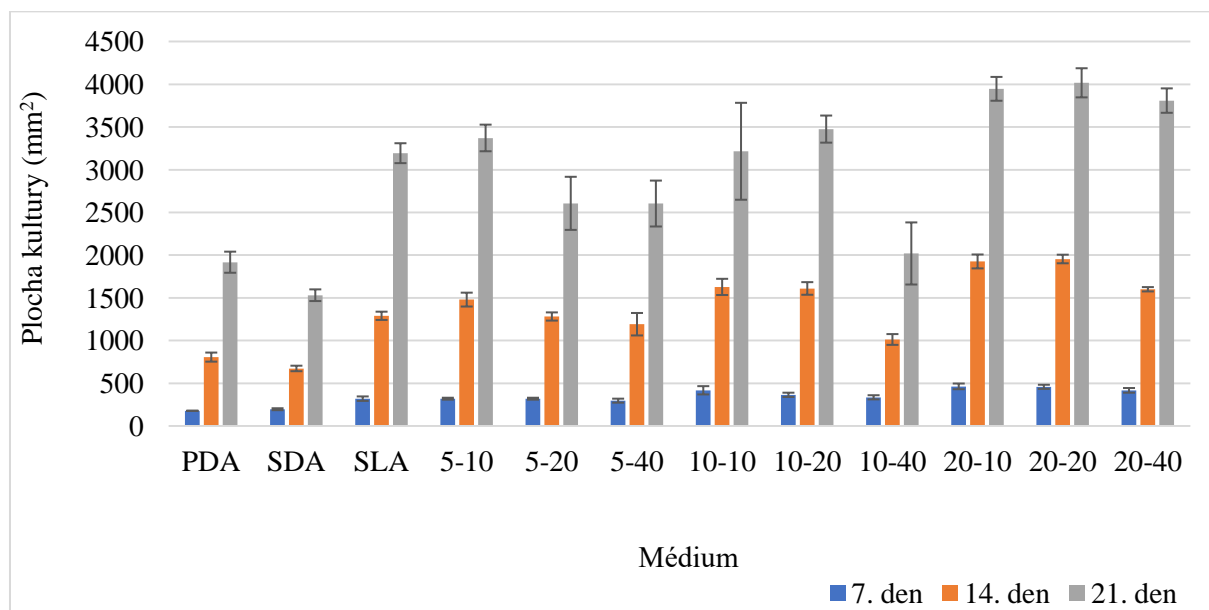
Médium	7. den		14. den		21. den	
	Průměr±SE	Tukey HSD	Průměr±SE	Tukey HSD	Průměr±SE	Tukey HSD
PDA	176,71±0,00	e	805,03±53,11	f	1916,47±123,56	ef
SDA	194,97±11,27	e	672,30±32,37	g	1529,86±68,51	f
SLA	318,58±26,27	d	1288,64±48,54	d	3192,84±116,59	c
5-10 (N:C)	318,18±11,38	d	1478,61±81,26	c	3371,12±155,79	c
5-20 (N:C)	318,18±11,38	d	1280,69±47,82	d	2605,56±310,78	d
5-40 (N:C)	295,21±23,28	d	1190,37±131,54	d	2603,20±268,65	d
10-10 (N:C)	416,65±48,34	b	1627,15±94,87	b	3215,22±567,40	c
10-20 (N:C)	363,44±25,09	c	1608,89±73,82	b	3474,79±158,60	bc
10-40 (N:C)	334,48±24,38	cd	1011,69±63,09	e	2018,67±363,52	e
20-10 (N:C)	462,40±33,48	a	1925,21±81,55	a	3946,33±139,58	a
20-20 (N:C)	457,40±24,27	ab	1953,97±50,23	a	4016,72±170,47	a
20-40 (N:C)	415,87±27,31	b	1599,36±25,27	b	3808,49±142,87	ab

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

Jako v předchozích hodnocených teplotních podmínkách i ve 30 °C byla média PDA a SDA nejméně vhodná pro růst entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA. Ve všech hodnocených dnech byla plocha houby na těchto médiích nejnižší. Opět se rychlost kolonizace houbou *B. bassiana* ve všech hodnocených dnech významně statisticky lišila (7. den: $F=105,26$; $df=11,84$; $p=0,00$, 14. den: $F=261,57$; $df=11,84$; $p=0,00$, 21. den: $F=85,98$; $df=11,84$; $p=0,00$). Téměř totožnou plochu vykazovala po 7 dnech média SLA, 5-10 a 5-20. Plocha byla v rozmezí od 318,18 do 318,58 na mm² kultury. Nejrychleji houba kolonizovala

média s poměrem N:C 20-10 (462,40 mm²) a 20-20 (457,40 mm²). V ostatních hodnocených dnech byla tato média pro růst houby opět nejoptimálnější. Plocha byla v porovnání s ostatními médii největší. Média s poměrem živin N:C 20-10, 20-20, 20-40, 10-10 a 10-20 byla ve všech hodnocených dnech pro růst entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA nejoptimálnější.

Graf 4: Vliv živné půdy na plochu kultury kmene GHA entomopatogenní houby *B. bassiana* při kultivaci v teplotě 30 °C v čase



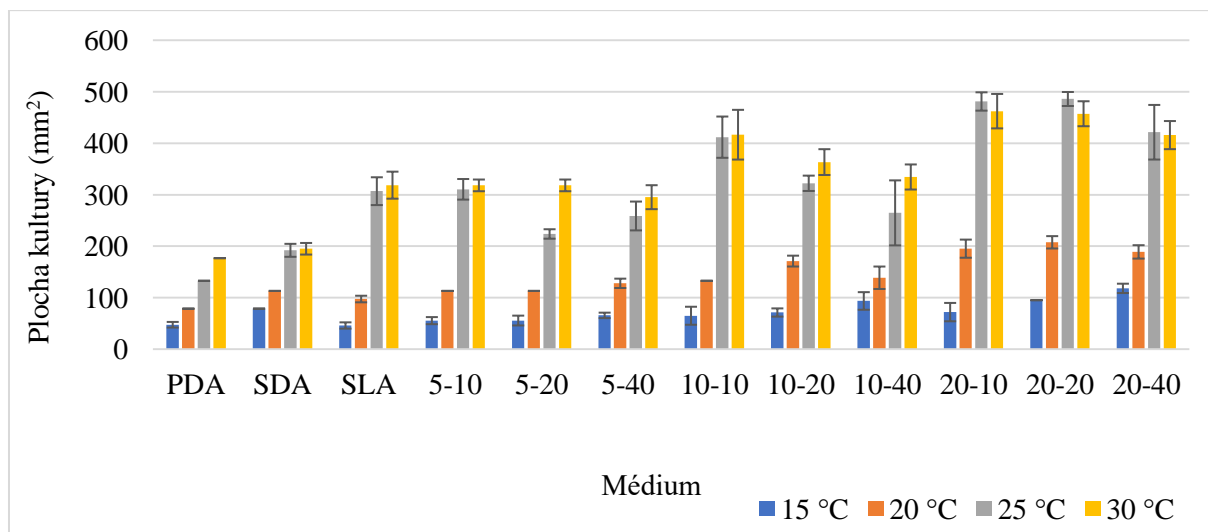
Tabulka 9: Statistické vyhodnocení rychlosti radiálního růstu houby *B. bassiana* kmene GHA v různých teplotách kultivace

Faktory	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C
Médium	F=152,5; df=11,84; p=0,00	F=619; df=11,84; p=0,00	F=924; df=11,84; p=0,00	F=394;df=11,84; p=0,00
Čas	F=6506,1; df=2,168; p=0,00	F=12296; df=2,168; p=0,00	F=19123; df=2,168; p=0,00	F=19317; df=2,168; p=0,00
Čas*Médium	F=22,9; df=22,168; p=0,00	F=39; df=22,168; p=0,00	F=32; df=22,168; p=0,00	F=11; df=22,168; p=0,00

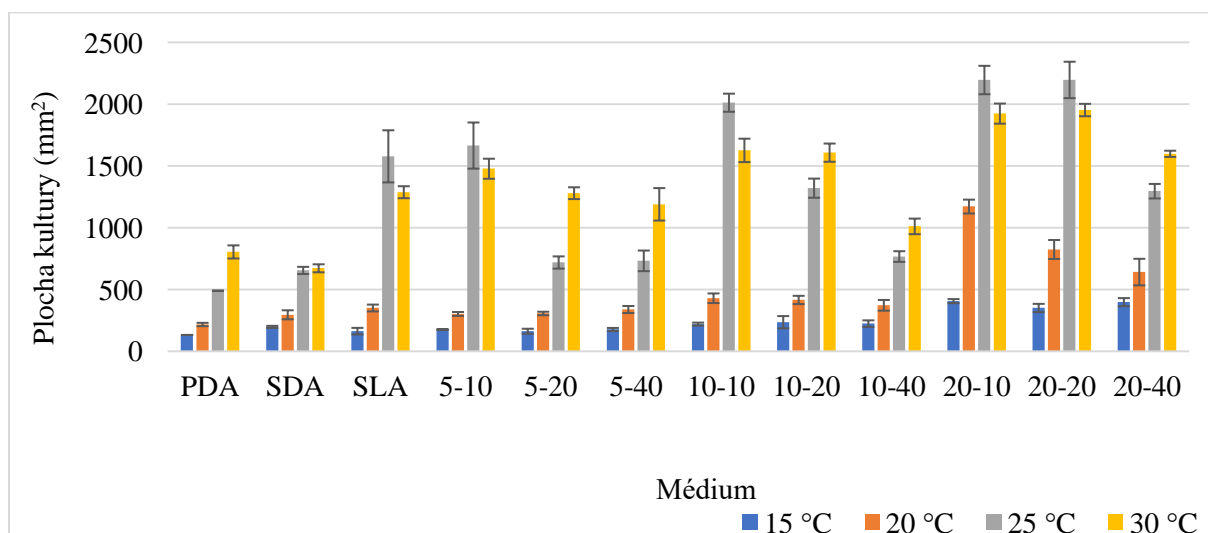
ANOVA pro opakovaná měření ($\alpha=0,05$)

Při statistickém zhodnocení radiálního růstu entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA v různých teplotách kultivace v průběhu 21 dní byla použita další metoda: ANOVA pro opakovaná měření. Byl sledován vliv média, doby kultivace a interakce mezi nimi navzájem. Data byla významně statisticky průkazná (viz Tabulka 9).

Graf 5: Vliv živné půdy a teploty na plochu kultury kmene GHA entomopatogenní houby *B. bassiana* po 7 dnech



Graf 6: Vliv živné půdy a teploty na plochu kultury kmene GHA entomopatogenní houby *B. bassiana* po 14 dnech

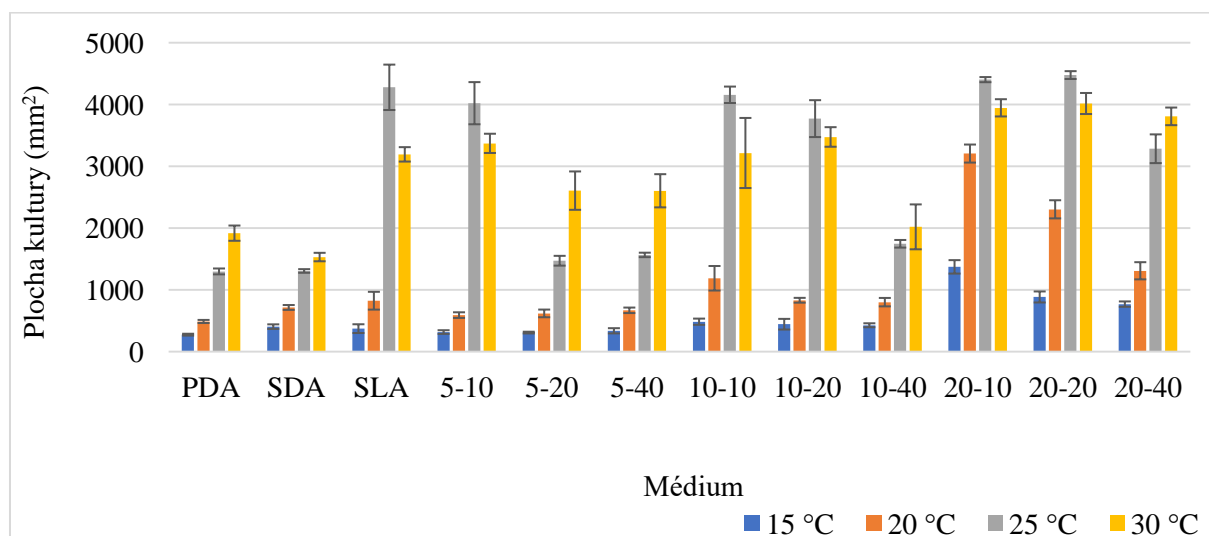


Po 7 dnech hodnocení radiálního růstu entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA v různých teplotách je na první pohled zřejmé, že houba rostla nejpomaleji v 15 °C, a to na všech živných médiích. Tato teplota není pro kolonizaci *B. bassiana* kmene GHA vhodná. Ve 20 °C rostla *B. bassiana* mnohem rychleji v porovnání s teplotou 15 °C. Teplota 25 °C byla neoptimálnější pro média v poměru N:C od 20-10 až 20-40. Plocha kultury byla při teplotě 25 °C na těchto médiích nejvyšší ze všech hodnocených médií. Plocha se pohybovala v rozmezí od 421,46 mm² (20-40) až 486,06 mm² (20-20). Ostatní testovaná média byla nejrychleji kolonizována při teplotě 30 °C.

Po 14 dnech hodnocení byla kolonizace Petriho misek s různými živnými médii opět nejpomalejší v teplotních podmínkách 15 a 20 °C. Teploty 25 a 30 °C byly pro růst entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA neoptimálnější. Z grafu 6 je zřetelně vidět, že na růst *B. bassiana* kmene GHA má vliv nejen teplota, ale i živné médium. Na živných médiích PDA, SDA, 5-20, 5-40, 10-20, 10-40 a 20-40 roste houba nejrychleji ve 30 °C. Naopak na médiích SLA, 5-10, 10-10, 20-10 a 20-20 byla kolonizace houbou nejrychlejší ve 25 °C.

Po 21 dnech hodnocení je trend kolonizace Petriho misek houbou *B. bassiana* kmene GHA s různými živnými médii téměř shodný jako v předchozích dnech. Teploty 15 a 20 °C nejsou pro růst této houby vhodné. Naopak teploty 25 a 30 °C jsou pro růst houby *B. bassiana* kmene GHA neoptimálnější, ale kolonizace houbou *B. bassiana* je dále závislá také na výběru média.

Graf 7: Vliv živné půdy a teploty na plochu kultury kmene GHA entomopatogenní houby *B. bassiana* po 21 dnech



Závěr

Neoptimálnější teploty pro růst entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA byly 25 a 30 °C. V ostatních testovaných teplotách byla kolonizace Petriho misek s různými živnými médii nejpomalejší. Média, na kterých houba dosahovala největší plochy, byla média s poměry základních živin N:C 20-10 a 20-20. Všechna data byla podrobena celkové analýze: ANOVA pro opakovaná měření. Na rychlost radiálního růstu měly vliv živné médium ($F=1261$; $df=11,336$; $p=0,00$), teplota ($F=19733$; $df=3,336$; $p=0,00$) a doba kultivace ($F=49439$; $df=2,672$; $p=0,00$). Dále měly vliv na rychlost kolonizace interakce:

médium*teplota (F=100; df=33,336; p=0,00), čas*médium (F=54; df=22,672; p=0,00), čas*teplota (F=72; 6,672; p=0,00) a čas*médium*teplota (F=16; df=66,672; p=0,00).

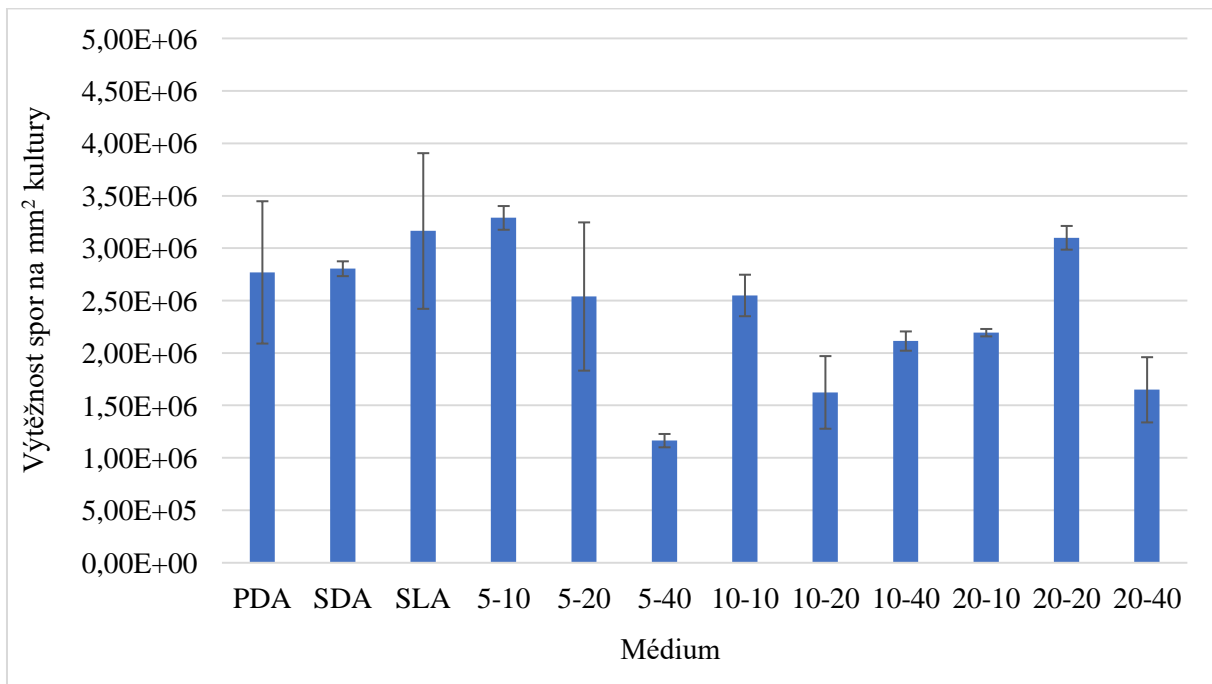
5.2 Porovnání výtěžnosti spor kmene GHA entomopatogenní houby *B. bassiana* na různých živných médiích a v různých teplotních podmínkách

Tabulka 10: Vliv živné půdy na výtěžnost spor kmene GHA entomopatogenní houby *B. bassiana* při kultivaci v různých teplotách po 21 dnech kultivace

Médium	15 °C		20 °C		25 °C		30 °C	
	Průměr±SE	Tukey HSD	Průměr±SE	Tukey HSD	Průměr±SE	Tukey HSD	Průměr±SE	Tukey HSD
PDA	2,77±0,68x10 ⁶	bcd	1,77±0,02x10 ⁶	de	1,53±0,23 x10 ⁶	ef	1,10±0,06x10 ⁶	ca
SDA	2,55±0,38x10 ⁶	a	2,94±0,12x10 ⁶	ab	2,21±0,04x10 ⁶	bcd	2,41±0,21x10 ⁶	ab
SLA	3,17±0,74x10 ⁶	b	2,98±0,33x10 ⁶	a	1,99±0,01x10 ⁶	cde	2,86±0,01x10 ⁶	ab
5-10 (N:C)	3,29±0,11x10 ⁶	b	2,63±0,07x10 ⁶	abc	1,19±0,03x10 ⁶	f	9,17±0,08x10 ⁵	d
5-20 (N:C)	2,54±0,71x10 ⁶	bcd	1,36±0,00x10 ⁶	e	1,77±0,24x10 ⁶	de	2,43±0,22x10 ⁶	ab
5-40 (N:C)	1,17±0,06x10 ⁶	e	1,57±0,08x10 ⁶	e	2,15±0,13x10 ⁶	bcd	2,32±0,26x10 ⁶	ab
10-10 (N:C)	2,25±0,20x10 ⁶	bcd	2,00±0,02 x10 ⁶	bcde	1,59±0,05x10 ⁶	def	1,03±0,01x10 ⁶	cd
10-20 (N:C)	1,63±0,35x10 ⁶	de	3,06±0,15 x10 ⁶	a	2,66±0,19x10 ⁶	bc	2,15±0,01x10 ⁶	ab
10-40 (N:C)	2,12±0,09x10 ⁶	bcde	1,83±0,04 x10 ⁶	cde	2,67±0,08x10 ⁶	bc	2,97±0,21x10 ⁶	a
20-10 (N:C)	2,20±0,04x10 ⁶	bcde	3,69±1,09 x10 ⁶	a	1,98±0,27x10 ⁶	cde	2,29±0,23x10 ⁶	ab
20-20 (N:C)	3,10±0,11x10 ⁶	bc	3,46±0,22 x10 ⁶	a	2,96±0,38x10 ⁶	ab	1,39±0,00x10 ⁶	c
20-40 (N:C)	1,65±0,31x10 ⁶	cde	2,62±0,16 x10 ⁶	abcd	4,13±0,01x10 ⁶	a	2,07±0,45x10 ⁶	b

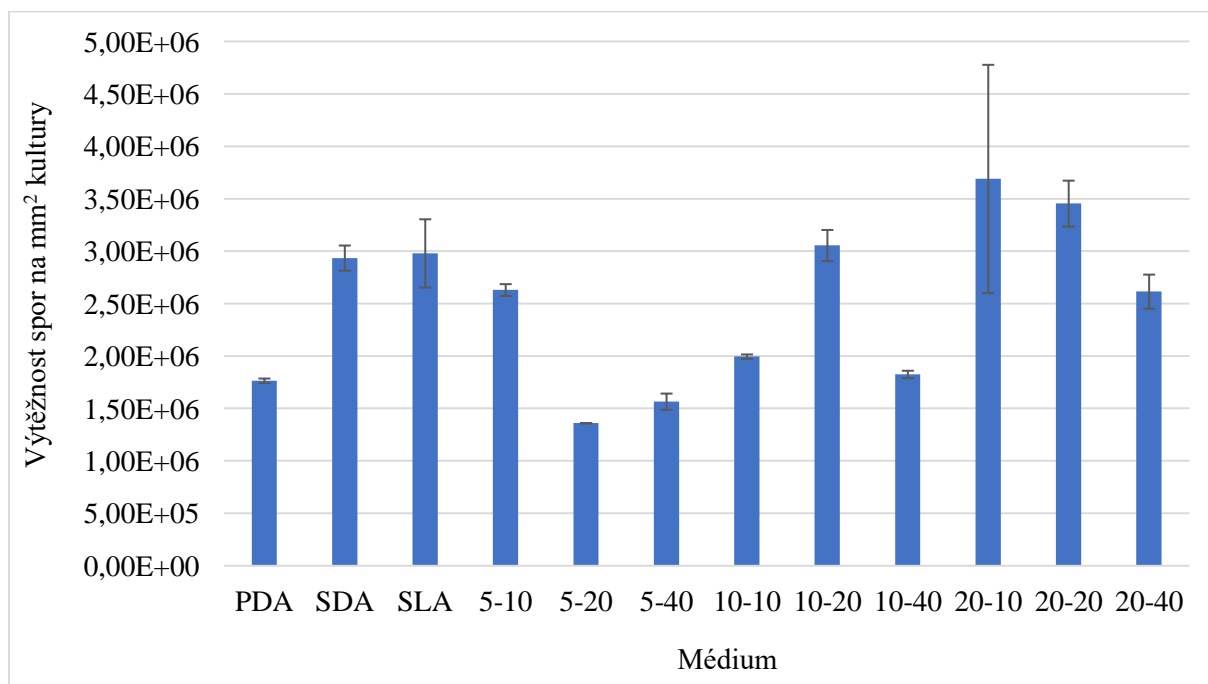
*a,b,c: hodnoty ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (One way ANOVA, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Graf 8: Produkce spor kmene GHA entomopatogenní houby *B. bassiana* na různých živných médiích při kultivaci v 15 °C



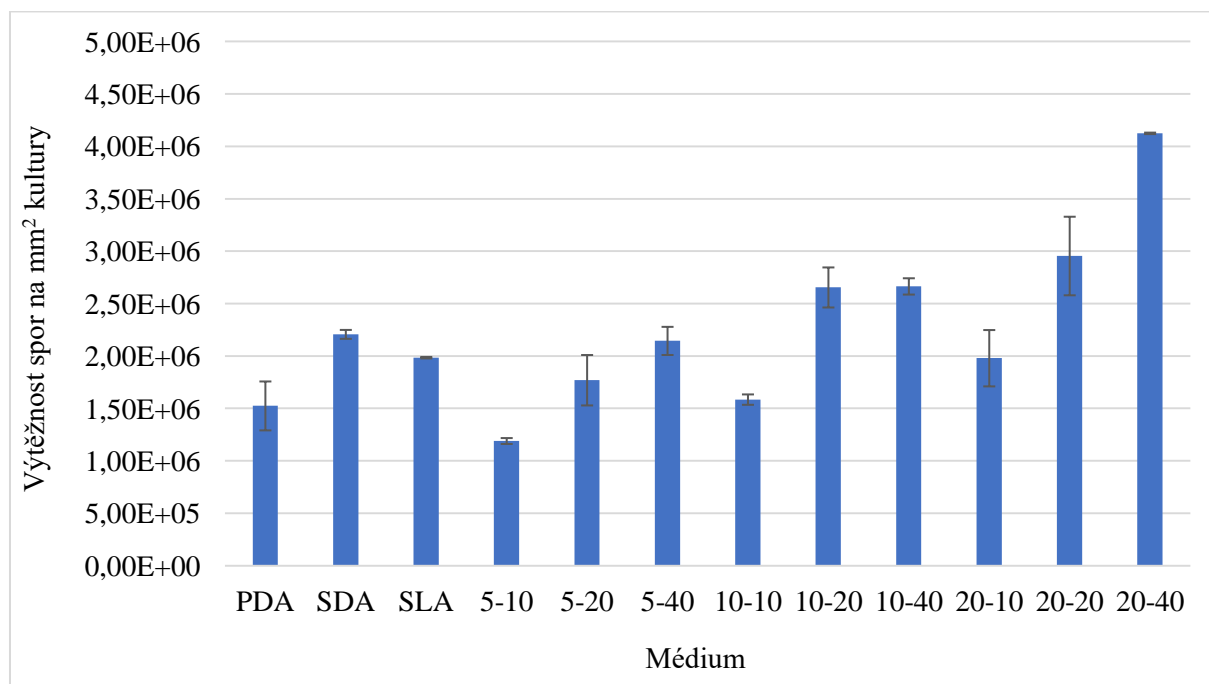
Výtěžnost spor kmene GHA entomopatogenní houby *B. bassiana* byla hodnocena u všech teplot po 21 dnech. Při teplotě 15 °C se výtěžnost spor pohybovala v rozmezí od $1,17 \times 10^6$ (5-40) do $3,29 \times 10^6$ (5-10) spor na mm² kultury. Produkce spor entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA se na různých médiích významně statisticky lišila ($F=44,5$; $df=11,12$; $p=0,000000$). Nejvyšší produkce spor byla zaznamenána na médiu s poměrem N:C 5-10. Výtěžnost byla $3,29 \times 10^6$ na mm² kultury. Další velmi vhodná média pro tvorbu spor *B. bassiana* kmene GHA byla SLA a médium s poměrem živin 20-20. Výtěžnost spor byla $3,17 \times 10^6$, respektive $3,10 \times 10^6$ spor na mm² kultury. Živná média PDA a SDA poskytovala téměř totožné podmínky pro tvorbu spor *B. bassiana* kmene GHA. Výtěžnost byla $2,77 \times 10^6$, respektive $2,55 \times 10^6$ spor na mm² kultury. Nejméně vhodné médium pro produkci spor entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA bylo médium s poměrem N:C 5-40. Výtěžnost spor byla pouze $1,17 \times 10^6$.

Graf 9: Produkce spor kmene GHA entomopatogenní houby *B. bassiana* na různých živných médiích při kultivaci v 20 °C



Produkce spor houby *B. bassiana* byla na sledovaných médiích ve 20 °C významně statisticky průkazná ($F=21,7$; $df=11,12$; $p=0,000003$). Nejvyšší výtěžnost spor byla zaznamenána na médiu s poměrem N:C 20-10, výtěžnost byla $3,69 \times 10^6$ spor na mm² kultury. Další velmi vhodná média pro produkci spor entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA byla média s poměrem N:C 20-20, 10-20 a komerčně vyráběná média SLA a SDA. Výtěžnost spor *B. bassiana* se pohybovala na těchto vhodných médiích v rozmezí od $2,94 \times 10^6$ (SDA) do $3,46 \times 10^6$ (20-20) spor na mm² kultury. Nejméně vhodná média pro tvorbu spor houby *B. bassiana* kmene GHA byla 5-20 ($1,36 \times 10^6$ spor na mm²) a 5-40 ($1,57 \times 10^6$ spor na mm²).

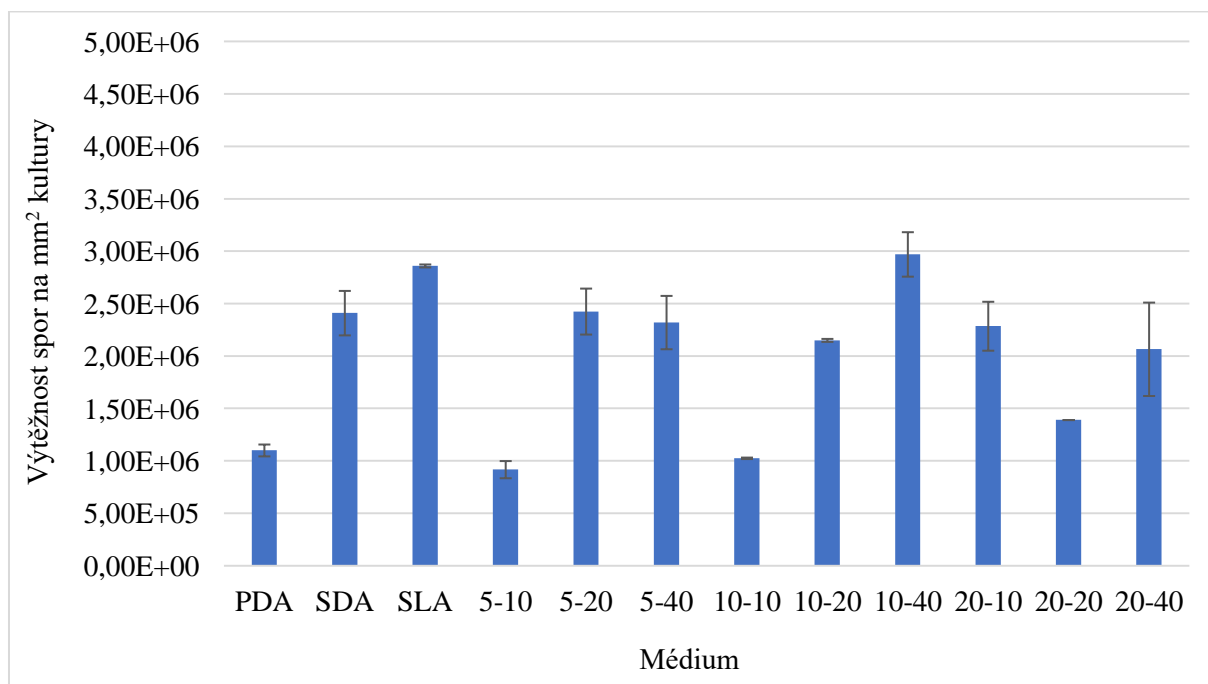
Graf 10: Produkce spor kmene GHA entomopatogenní houby *B. bassiana* na různých živných médiích při kultivaci v 25 °C



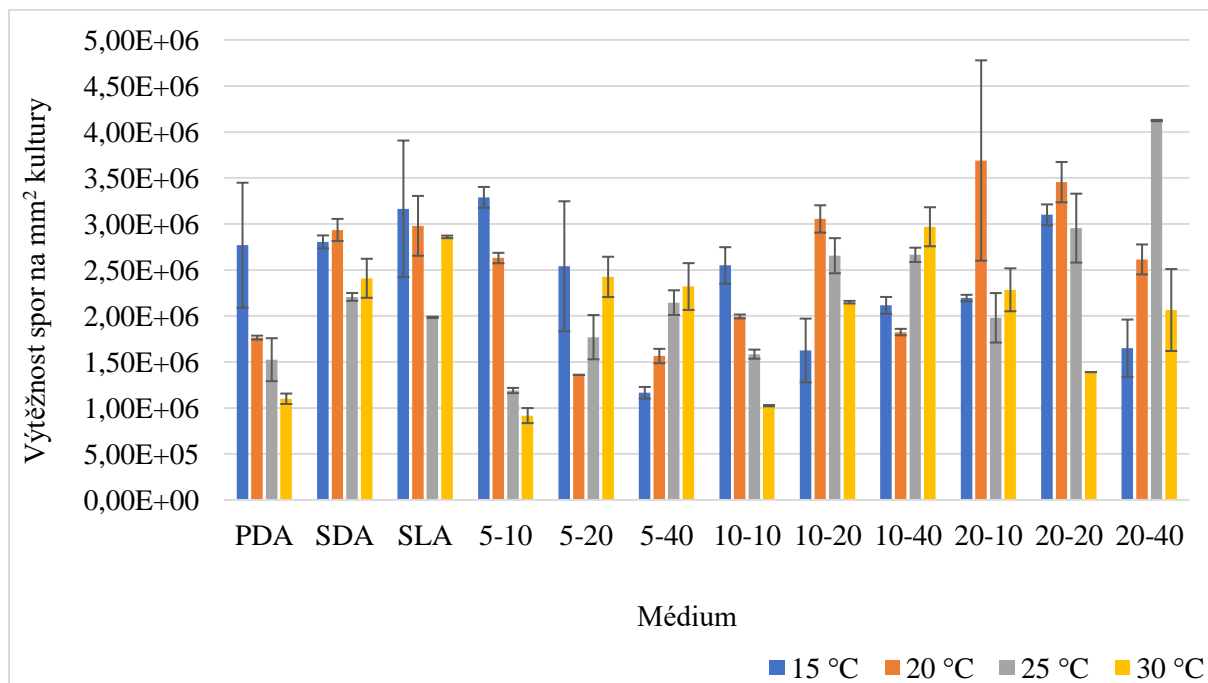
Ve 25 °C kultivace byla nejvyšší výtěžnost spor entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA na médiu s poměrem N:C 20-40 ($4,13 \times 10^6$ spor na mm² kultury). Ostatní hodnocená média nebyla pro produkci spor houby *B. bassiana* kmene GHA tak vhodná. Produkce spor na médiích byla v porovnání s médiem s poměrem N:C 20-40 markantně nižší. Nejmenší výtěžnost spor byla zaznamenána na médiu s poměrem základních živin dusíku a uhlíku 5-10. Produkce spor byla pouze $1,19 \times 10^6$ spor na mm² kultury. Výtěžnost spor se na použitých živných médiích statisticky významně lišila ($F=30,2$; $df=11,12$; $p=0,000000$).

Výtěžnost spor entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA na živných médiích ve 30 °C značně kolísala. Produkce spor se pohybovala v rozmezí od $9,17 \times 10^5$ (5-10) do $2,97 \times 10^6$ (10-40). Nejvyšší produkce spor byla zaznamenána na živném médiu s poměrem N:C 10-40. Komerčně vyráběné médium SLA bylo také velmi vhodné pro produkci spor houby *B. bassiana* kmene GHA ($2,86 \times 10^6$ spor na mm² kultury). Produkce spor houby *B. bassiana* se na různých živných médiích ve 30 °C kultivace významně statisticky lišila ($F=40,3$; $df=11,12$; $p=0,000000$).

Graf 11: Produkce spor kmene GHA entomopatogenní houby *B. bassiana* na různých živných médiích při kultivaci v 30 °C



Graf 12: Vliv živné půdy na výtěžnost spor kmene GHA entomopatogenní houby *B. bassiana* při kultivaci v různých teplotách



Na rozdíl od radiálního růstu byla pro entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA optimální na mnoha médiích teplota 15 °C. Média PDA, SLA, 5-10, 5-20 a 10-10 poskytovaly v 15 °C kultivace neoptimálnější podmínky pro produkci spor houby

B. bassiana kmene GHA. Nejvyšší produkce spor byla zaznamenána na médiu s poměrem N:C 5-10 ($3,29 \times 10^6$ na mm^2 kultury). Velmi vhodná teplota byla také 20 °C. Pro produkci spor *B. bassiana* bylo neoptimálnější médium s poměrem živin 20-10 a teplota 20 °C. Ostatní teploty byly pro růst houby také vhodné, ale zde je jasně vidět, že teplota není jediný parametr, na kterém závisí produkce spor entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA. Volba živného média hraje také velmi klíčovou roli při tvorbě spor. Produkce spor na komerčních médiích je neoptimálnější v 15 °C kultivace. Produkce spor na médiích se základními poměry živin vyžaduje různé teplotní podmínky.

Závěr

Výtěžnost spor je velmi významný hodnotící parametr pro výrobu komerčních biopreparátů, proto je velmi důležité porozumět teplotním a nutričním požadavkům entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA. Celkově byla data podrobena faktoriální analýze rozptylu s interakcemi. Nejen médium ($F=48$; $df=11,48$, $p=0,000000$) a teplota ($F=53$; $df=3,48$; $p=0,000000$) mají statisticky významný vliv na výtěžnost spor houby *B. bassiana* kmene GHA, ale také interakce mezi nimi ($F=34$; $df=33,48$; $p=0,000000$).

5.3 Porovnání výtěžnosti blastospor vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na různých živných médiích

Tabulka 11: Vliv živné půdy na výtěžnost blastospor entomopatogenní houby *B. bassiana* odizolované z Argentiny v čase

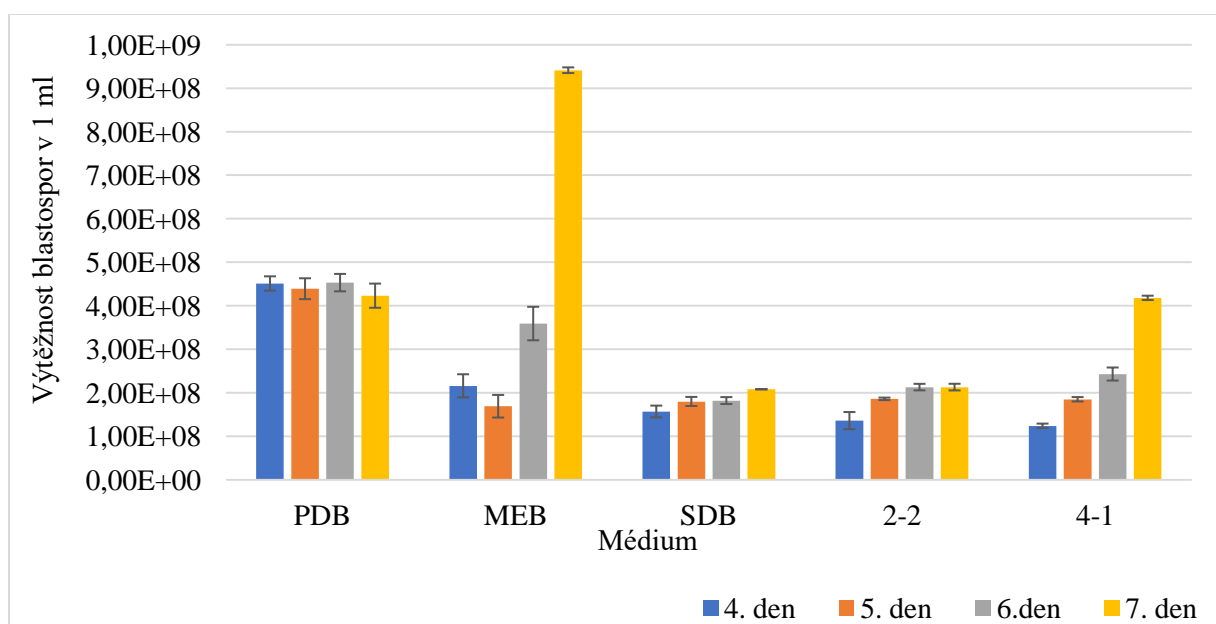
Médium	4. den		5. den		6. den		7. den	
	Průměr±SE	Tukey HSD	Průměr±SE	Tukey HSD	Průměr±SE	Tukey HSD	Průměr±SE	Tukey HSD
PDB	4,51±0,17x10 ⁸	a	4,39±0,24x10 ⁸	a	4,53±0,20x10 ⁸	a	4,23±0,28x10 ⁸	b
MEB	2,16±0,27x10 ⁸	b	1,69±0,26x10 ⁸	b	3,59±0,39x10 ⁸	b	9,41±0,07x10 ⁸	a
SDB	1,57±0,14x10 ⁸	c	1,80±0,10x10 ⁸	b	3,59±0,08x10 ⁸	d	2,08±0,00x10 ⁸	c
2-2 (N:C)	1,36±0,20x10 ⁸	c	1,86±0,03x10 ⁸	b	2,13±0,08x10 ⁸	cd	2,13±0,08x10 ⁸	c
4-1 (N:C)	1,24±0,05x10 ⁸	c	1,85±0,05x10 ⁸	b	2,43±0,15x10 ⁸	c	4,18±0,05x10 ⁸	b

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

Po 4 dnech kultivace entomopatogenní houby *B. bassiana* odizolované z Argentiny byla nejvyšší produkce blastospor na živném médiu PDB. Výtěžnost dosahovala $4,51 \times 10^8$ blastospor v 1 ml. Druhé živné médium, kde byla vysoká produkce blastospor bylo MEB ($2,16 \times 10^8/1\text{ml}$). Ostatní média poskytla pro produkci blastospor argentinského kmene

téměř totožné podmínky, výtěžnost byla v úzkém rozmezí od $1,24 \times 10^8$ (4-1) do $1,57 \times 10^8$ (SDB) v 1 ml. Po 4 dnech hodnocení byly pozorovány statisticky významné rozdíly v produkci blastospor na různých živných médiích ($F=90$; $df=4,10$; $p=0,000000$). Po 5 dnech kultivace *B. bassiana* z Argentiny byla opět nejvyšší výtěžnost spor na živném médiu PDB. Produkce blastospor byla $4,39 \times 10^8/1\text{ml}$. Výtěžnost blastospor *B. bassiana* na ostatních médiích byla téměř totožná (rozmezí od $1,69 \times 10^8$ do $1,86 \times 10^8/1\text{ml}$). Výsledky produkce blastospor byly po 5 dnech hodnocení statisticky průkazné ($F=76,8$; $df=4,10$; $p=0,000000$). Výtěžnost blastospor byla po 6 dnech stále nejvyšší na živné půdě PDA ($4,53 \times 10^8$ v 1 ml), ale na ostatních testovaných médiích produkce výrazně vzrostla. Na médiích MEB a SDB byla produkce blastospor argentinského kmene *B. bassiana* shodná ($3,59 \times 10^8$ blastospor v 1 ml). Po 6 dnech hodnocení byla prokázána statisticky významná rozdílnost ve výtěžnosti blastospor na různých živných médiích ($F=104$; $df=4,10$; $p=0,000000$). Po 7 dnech inkubace *B. bassiana* v tekutých živných půdách byla nejvyšší produkce blastospor na médiu MEB. Výtěžnost blastospor byla až $9,41 \times 10^8$ v 1 ml. Ostatní média tak vhodná pro produkci blastospor v tomto dni hodnocení nebyla. Markantně v produkci blastospor zaostávaly. Data byla po 7 dnech významně statisticky průkazná ($F=1002$; $df=4,10$; $p=0,000000$).

Graf 13: Výtěžnost blastospor entomopatogenní houby *B. bassiana* odizolované z Argentiny na různých živných médiích v čase



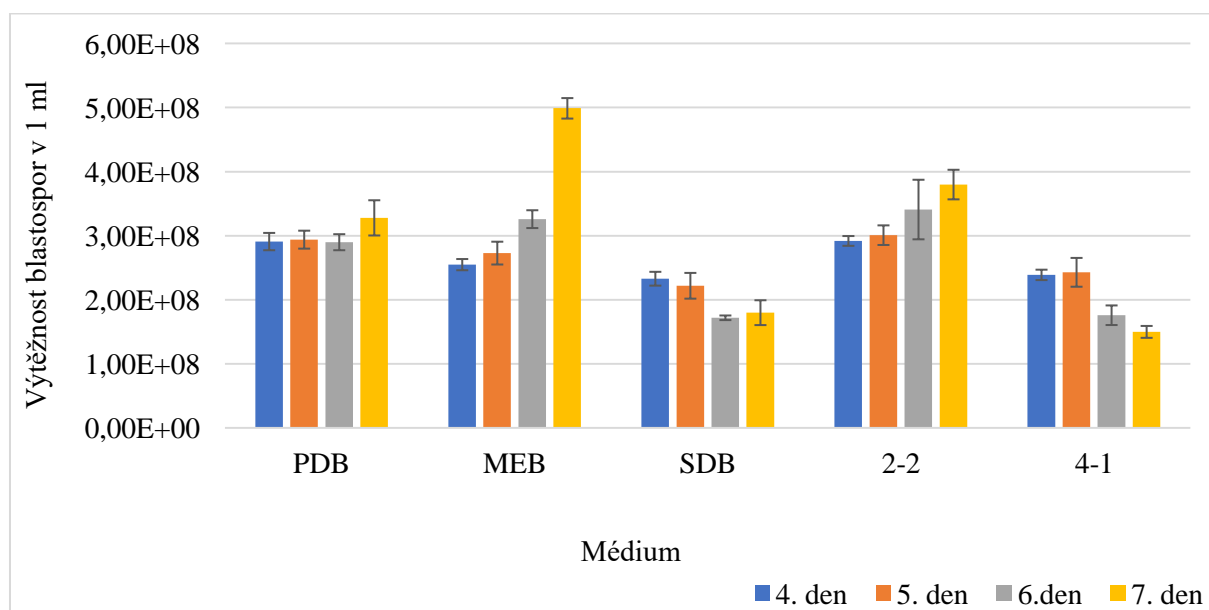
Tabulka 12: Vliv živné půdy na výtěžnost blastospor entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA v čase

Médium	4. den		5. den		6. den		7. den	
	Průměr±SE	Tukey HSD	Průměr±SE	Tukey HSD	Průměr±SE	Tukey HSD	Průměr±SE	Tukey HSD
PDB	2,91±0,14x10 ⁸	a	2,94±0,14x10 ⁸	a	2,90±0,13x10 ⁸	a	3,28±0,28x10 ⁸	b
MEB	2,55±0,09x10 ⁸	b	2,73±0,18x10 ⁸	ab	3,26±0,14x10 ⁸	a	4,99±0,16x10 ⁸	a
SDB	2,33±0,11x10 ⁸	b	2,22±0,20x10 ⁸	c	1,72±0,04x10 ⁸	b	1,80±0,20x10 ⁸	c
2-2 (N:C)	2,92±0,08x10 ⁸	a	3,01±0,15x10 ⁸	a	3,41±0,47x10 ⁸	a	3,80±0,23x10 ⁸	b
4-1(N:C)	2,39±0,08x10 ⁸	b	2,43±0,23x10 ⁸	bc	1,76±0,16x10 ⁸	b	1,50±0,09x10 ⁸	c

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

Po 4 dnech hodnocení byla výtěžnost blastospor entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA v tekutých živných médiích velmi podobná. Rozsah hodnot produkce blastospor byl od $2,33 \times 10^8$ (SDB) do $2,92 \times 10^8$ (2-2) v 1 ml. Hodnoty byly po 4 dnech významně statisticky průkazné ($F=24$; $df=4,10$; $p=0,000042$). V ostatních hodnocených dnech byla také zaznamenána významná statistická odlišnost ve výtěžnosti blastospor na různých tekutých živných půdách (5. den: $F=10$; $df=4,10$; $p=0,001634$, 6. den: $F=55,5$; $df=4,10$; $p=0,000001$, 7. den: $F=137$; $df=4,10$; $p=0,000000$). Po 5 dnech hodnocení byla nejvyšší produkce blastospor zaznamenána na živném médiu s poměrem živin N:C 2-2. Velmi vysoká výtěžnost blastospor byla pozorována také za použití média PDB a MEB. Hodnoty produkce blastospor byly $2,94 \times 10^8/1\text{ml}$, respektive $2,73 \times 10^8/1\text{ml}$. V následujícím 6. dni se tento trend nezměnil, opět byla nejvyšší produkce blastospor na médiu s poměrem 2-2 ($3,41 \times 10^8/1\text{ml}$). Velmi vysoká produkce blastospor byla zaznamenána také na médiu MEB, výtěžnost byla $3,26 \times 10^8$ blastospor/1ml. Tekuté živné médium MEB bylo nejoptimálnější pro produkci blastospor entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA po 7 dnech hodnocení. Výtěžnost blastospor dosahovala $4,99 \times 10^8$ na 1 ml. Média PDB a 2-2 byla pro produkci blastospor také vhodná, ale výtěžnost byla v porovnání s médiem MEB výrazně nižší. Ostatní použitá média SDB a 4-1 pro produkci blastospor houby *B. bassiana* kmene GHA vhodná nebyla.

Graf 14: Výtěžnost blastospor entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA na různých živných médiích v čase

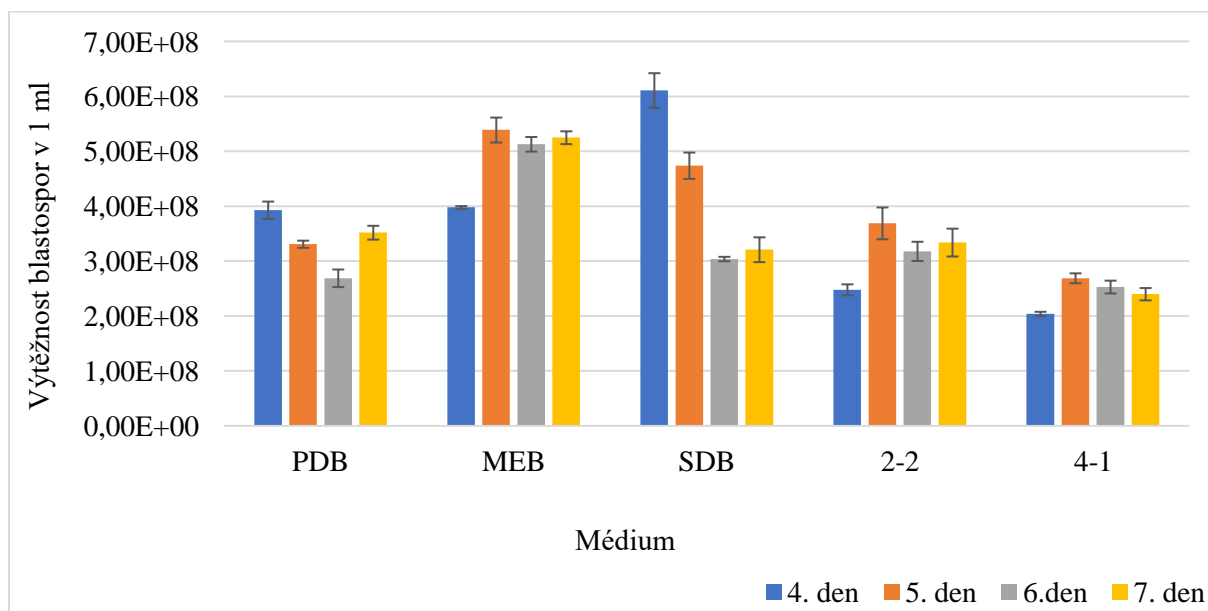


Tabulka 13: Vliv živné půdy na výtěžnost blastospor entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene CCM8382 v čase

Médium	4. den		5. den		6. den		7. den	
	Průměr±SE	Tukey HSD	Průměr±SE	Tukey HSD	Průměr±SE	Tukey HSD	Průměr±SE	Tukey HSD
PDB	3,93±0,16x10 ⁸	b	3,31±0,07x10 ⁸	b	2,69±0,16x10 ⁸	c	3,52±0,13x10 ⁸	b
MEB	3,98±0,03x10 ⁸	b	5,39±0,22x10 ⁸	a	5,13±0,13x10 ⁸	a	5,25±0,12x10 ⁸	a
SDB	6,11±0,32x10 ⁸	a	4,74±0,24x10 ⁸	a	3,04±0,04x10 ⁸	b	3,21±0,23x10 ⁸	b
2-2 (N:C)	2,48±0,10x10 ⁸	c	3,69±0,29x10 ⁸	b	3,18±0,18x10 ⁸	b	3,34±0,25x10 ⁸	b
4-1 (N:C)	2,04±0,04x10 ⁸	d	2,69±0,09x10 ⁸	c	2,53±0,12x10 ⁸	c	2,40±0,11x10 ⁸	c

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

Graf 15: Výtěžnost blastospor entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene CCM8382 na různých živných médiích v čase



Nejvyšší výtěžnost blastospor entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene CCM8382 byla po 4 dnech hodnocení na komerčně vyráběném tekutém médiu SDB. Hodnota výtěžnosti blastospor u tohoto média dominovala nad ostatními. Produkce byla $6,11 \times 10^8$ blastospor v 1 ml. V následujících dnech, ale docházelo u tohoto média k redukci blastospor. Živná média MEB a PDB poskytovala téměř shodné nutriční vlastnosti pro produkci blastospor, výtěžnost byla $3,98 \times 10^8$, respektive $3,93 \times 10^8$ blastospor v 1 ml. Média se základními poměry živin N:C byla v produkci blastospor nejslabší. Po 4 dnech hodnocení byly zaznamenány statisticky průkazné rozdíly v produkci blastospor na různých živných půdách ($F=443$; $df=4,10$; $p=0,000000$). Po 5 dnech inkubace byla zaznamenána nejvyšší produkce spor na médiu MEB ($5,39 \times 10^8/1ml$). U ostatních použitých médií se výtěžnost blastospor pohybovala v rozmezí od $2,69 \times 10^8$ v 1 ml (4-1) do $4,74 \times 10^8$ (SDB) v 1 ml. Po 5 dnech testování byla opět statisticky průkazná rozdílnost v produkci blastospor na různých tekutých médiích ($F=96$; $df=4,10$; $p=0,000000$). V následujících dnech hodnocení byla výtěžnost blastospor opět nejvyšší na médiu MEB. Po 6. dnech byla produkce blastospor $5,13 \times 10^8$ v 1 ml a po 7 dnech hodnocení $5,25 \times 10^8$ v 1 ml. Ostatní média v produkci blastospor v porovnání s živným médiem MEB výrazně zaostávala a to po 6 i 7 dnech testování. Po 6 i 7 dnech byly výsledky výtěžnosti blastospor entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene CCM8382 na různých tekutých

půdách výrazně statisticky průkazné (6. den: F=122; df=4,10; p= 0,000000, 7. den: F=79; df=4,10; p= 0,000000).

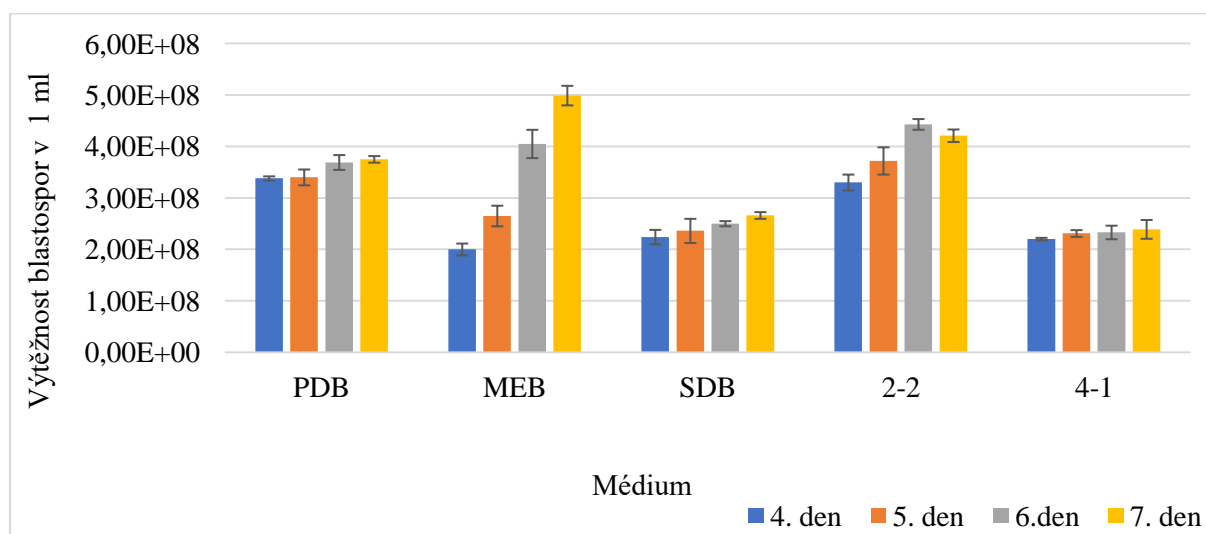
Tabulka 14: Vliv živné půdy na výtěžnost blastospor entomopatogenní houby *B. bassiana* odizolované z Izraele v čase

Médium	4. den		5. den		6. den		7. den	
	Průměr±SE	Tukey HSD	Průměr±SE	Tukey HSD	Průměr±SE	Tukey HSD	Průměr±SE	Tukey HSD
PDB	3,38±0,04x10 ⁸	a	3,40±0,15x10 ⁸	a	3,69±0,14x10 ⁸	b	3,75±0,06x10 ⁸	c
MEB	2,00±0,12x10 ⁸	b	2,65±0,20x10 ⁸	b	4,05±0,27x10 ⁸	ab	4,99±0,19x10 ⁸	a
SDB	2,24±0,14x10 ⁸	b	2,36±0,23x10 ⁸	b	2,50±0,05x10 ⁸	c	2,66±0,07x10 ⁸	d
2-2 (N:C)	3,30±0,16x10 ⁸	a	3,72±0,26x10 ⁸	a	4,43±0,10x10 ⁸	a	4,21±0,12x10 ⁸	b
4-1 (N:C)	2,20±0,03x10 ⁸	b	2,31±0,07x10 ⁸	b	2,33±0,13x10 ⁸	c	2,39±0,18x10 ⁸	d

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

Po 4 dnech hodnocení byla zaznamenána nejvyšší výtěžnost blastospor na komerčně vyráběném živném médiu PDB. Produkce spor byla $3,38 \times 10^8$ v 1 ml. Velmi podobnou produkci spor měla entomopatogenní houba *B. bassiana* odizolovaná z Izraele také na médiu s poměrem N:C 2-2 ($3,30 \times 10^8$ /1ml). V ostatních médiích byla produkce blastospor houby *B. bassiana* velmi podobná, rozsah výtěžnosti blastospor byl od $2,00 \times 10^8$ (MEB) do $2,24 \times 10^8$ v 1 ml (SDB). Výtěžnost blastospor byla po 4. dnech výrazně statisticky průkazná (F=95; df=4,10; p=0,000000). Produkce blastospor izraelského kmene houby *B. bassiana* byla na různých živných médiích statisticky průkazná i po 5 dnech hodnocení (F=30; df=4,10; p=0,000016). Výtěžnost blastospor houby *B. bassiana* byla po 5 dnech testování nejvyšší na živné půdě s poměrem N:C 2-2 ($3,72 \times 10^8$ /1ml).

Graf 16: Výtěžnost blastospor entomopatogenní houby *B. bassiana* odizolované z Izraele na různých živných médiích v čase



Vysoká výtěžnost blastospor byla zaznamenána také na médiu PDB. Ostatní média byla v produkci blastospor méně vhodná, produkce spor se pohybovala v rozmezí od $2,31 \times 10^8/1\text{ml}$ (4-1) do $2,65 \times 10^8/1\text{ml}$ (MEB). V 6. dnu hodnocení se výtěžnost blastospor výrazně navýšila na médiu MEB, produkce blastospor byla $4,05 \times 10^8$ v 1ml. Médium s poměrem 2-2 bylo po 6 dnech nejvíce vhodné pro produkci blastospor *B. bassiana* ($4,43 \times 10^8$ v 1ml). Po 6 dnech hodnocení byly zaznamenány u entomopatogenní houby *B. bassiana* odizolované z Izraele statisticky průkazné rozdíly v produkci blastospor na různých živných médiích ($F=122$; $df=4,10$; $p=0,000000$). V následujícím dnu hodnocení byla data produkce blastospor opět významně statisticky průkazná ($F=163$; $df=4,10$; $p=0,000000$). Nejvyšší výtěžnost blastospor byla na médiích MEB ($4,99 \times 10^8/1\text{ml}$) a 2-2 ($4,21 \times 10^8/1\text{ml}$). Ostatní média tak vysokou produkci blastospor houby *B. bassiana* z Izraele neposkytovaly.

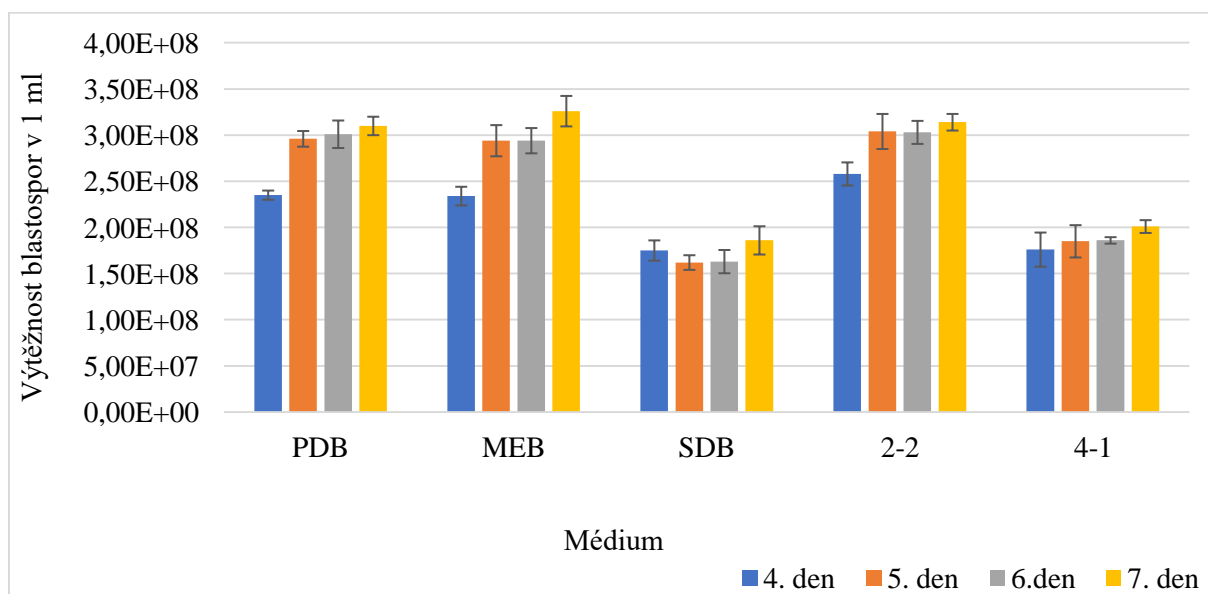
Tabulka 15: Vliv živné půdy na výtěžnost blastospor entomopatogenní houby *B. bassiana* odizolované z USA v čase

Médium	4. den		5. den		6. den		7. den	
	Průměr±SE	Tukey HSD	Průměr±SE	Tukey HSD	Průměr±SE	Tukey HSD	Průměr±SE	Tukey HSD
PDB	$2,35 \pm 0,05 \times 10^8$	a	$2,96 \pm 0,09 \times 10^8$	a	$3,01 \pm 0,15 \times 10^8$	a	$3,10 \pm 0,10 \times 10^8$	a
MEB	$2,34 \pm 0,10 \times 10^8$	a	$2,94 \pm 0,17 \times 10^8$	a	$2,94 \pm 0,14 \times 10^8$	a	$3,26 \pm 0,17 \times 10^8$	a
SDB	$1,75 \pm 0,11 \times 10^8$	b	$1,62 \pm 0,08 \times 10^8$	b	$1,63 \pm 0,13 \times 10^8$	b	$1,86 \pm 0,15 \times 10^8$	b
2-2 (N:C)	$2,58 \pm 0,13 \times 10^8$	a	$3,04 \pm 0,19 \times 10^8$	a	$3,03 \pm 0,30 \times 10^8$	a	$3,14 \pm 0,09 \times 10^8$	a
4-1 (N:C)	$1,76 \pm 0,19 \times 10^8$	b	$1,85 \pm 0,18 \times 10^8$	b	$1,86 \pm 0,03 \times 10^8$	b	$2,01 \pm 0,07 \times 10^8$	b

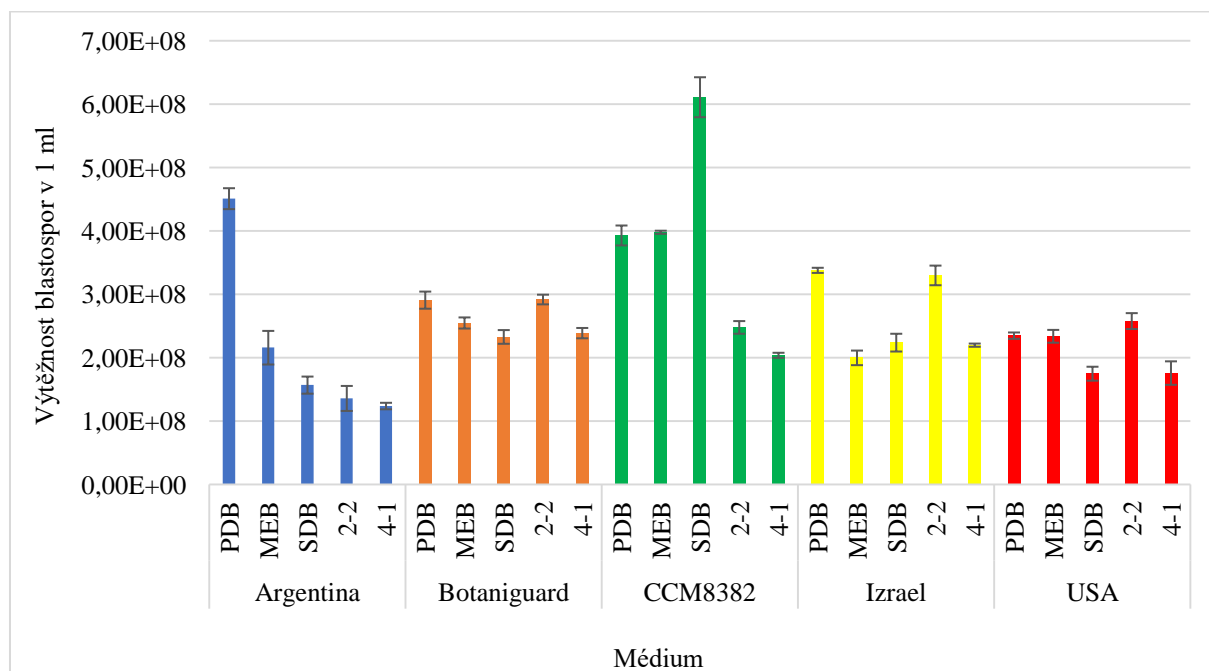
*a,b,c: hodnoty ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (One way ANOVA, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Ve všech dnech hodnocení byla výtěžnost blastospor entomopatogenní houby *B. bassiana* odizolované z USA na různých živných tekutých médiích významně statisticky průkazná (4. den: $F=25$; $df=4,10$; $p=0,000036$, 5. den: $F=70$; $df=4,10$; $p=0,000000$, 6. den: $F=107$; $df=4,10$; $p=0,000000$, 7. den: $F=91$; $df=4,10$; $p=0,000000$). Entomopatogenní houba *B. bassiana* odizolovaná z USA byla po 4 dnech nejvíce produktivní na médiu s poměrem N:C 2-2. Výtěžnost blastospor byla $2,58 \times 10^8$ v 1ml. Na médiích PDB a MEB byla produkce blastospor téměř srovnatelná, hodnoty dosahovaly $2,35 \times 10^8$ blastospor/1ml, respektive $2,34 \times 10^8$ blastospor/1ml. Stejný jev se vyskytoval i na médiích SDB ($1,75 \times 10^8/1ml$) a 4-1 ($1,76 \times 10^8/1ml$). Výtěžnost blastospor *B. bassiana* byla téměř shodná. Po 5 dnech hodnocení byla výtěžnost blastospor nejvyšší opět na médiu 2-2. Produkce blastospor dosahovala $3,04 \times 10^8$ v 1ml. Tekutá komerční média PDB ($2,96 \times 10^8/1ml$) a MEB ($2,94 \times 10^8/1ml$) byla také velmi vhodná pro produkci blastospor houby *B. bassiana* z USA. Produkce blastospor byla u těchto médií téměř stejná. Po 6 dnech hodnocení se výtěžnost blastospor u použitých médií výrazně nezměnila. Neoptimálnější pro produkci blastospor bylo opět médium s poměrem N:C 2-2. Naopak po 7 dnech hodnocení se výtěžnost blastospor zvýšila ve prospěch média MEB. Výtěžnost blastospor byla $3,26 \times 10^8$ v 1 ml. Výtěžnost blastospor *B. bassiana* byla vysoká také na médiích 2-2 a PDB.

Graf 17: Výtěžnost blastospor entomopatogenní houby *B. bassiana* odizolované z USA na různých živných médiích v čase

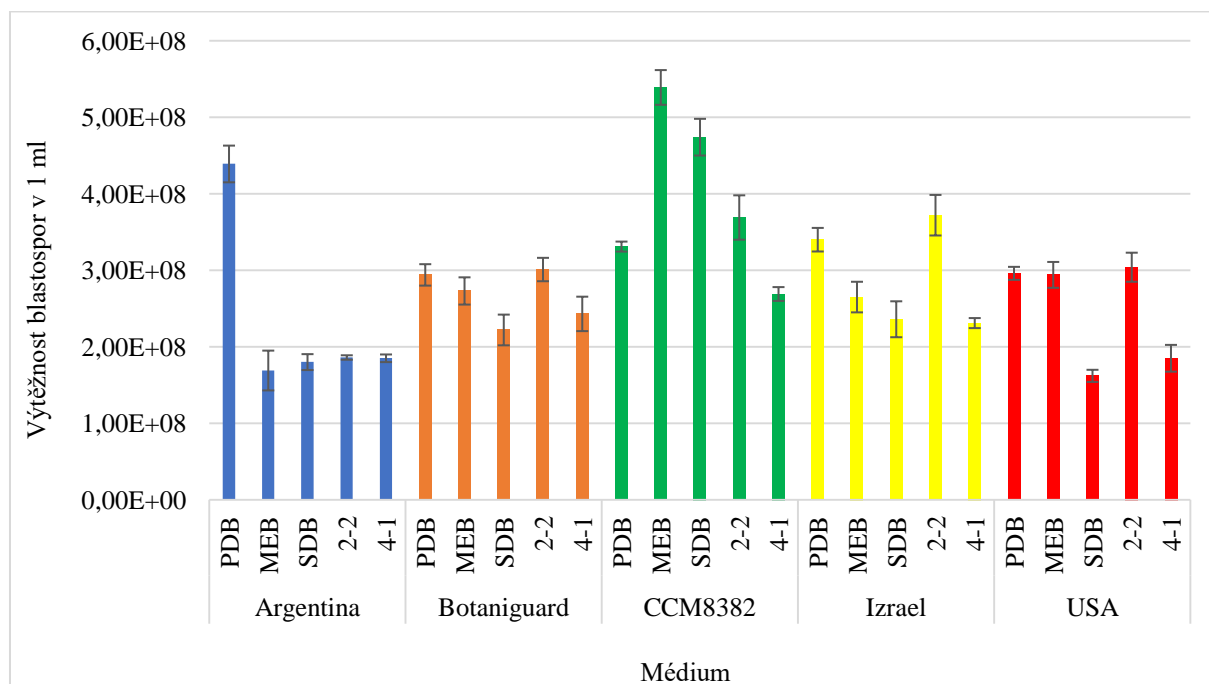


Graf 18: Výtěžnost blastospor vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na různých živných médiích po 4 dnech kultivace



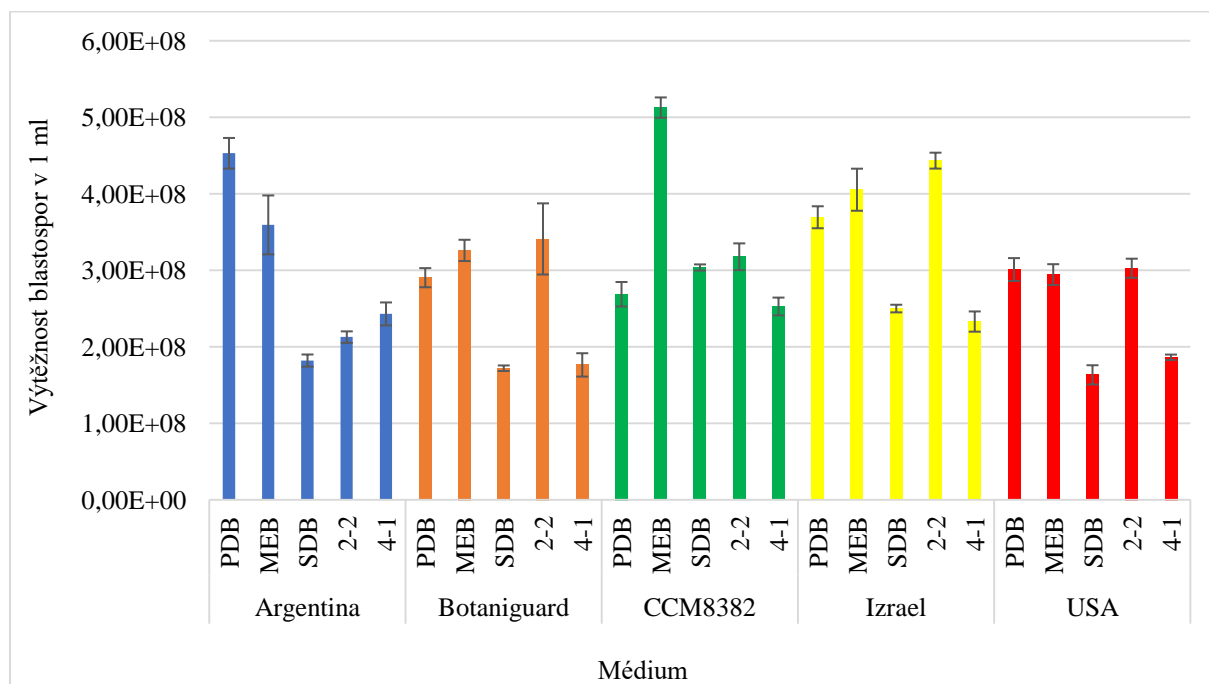
Z grafu 18 je patrné, že nejvhodnější médium pro produkci blastospor entomopatogenní houby *B. bassiana* odizolované z Argentiny je PDB. Výtěžnost blastospor na PDB byla oproti výtěžnosti blastospor na ostatních médiích markantně vyšší. Produkce blastospor *B. bassiana* byla $4,51 \times 10^8$ v 1ml. Komerční biopreparát Botanigard poskytoval po 4 dnech kultivace na médiích velmi podobnou výtěžnost blastospor. Rozsah hodnot byl od $2,33 \times 10^8$ v 1 ml do $2,92 \times 10^8$ blastospor v 1 ml. Kmen CCM8382 byl nejproduktivnější na živném médiu SDB. Tento kmen byl ze všech hodnocených kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* po 4 dnech nejproduktivnější. Výtěžnost blastospor na médiu SDB byla až $6,11 \times 10^8$ blastospor/1ml. Kmen *B. bassiana* z Izraele byl nejproduktivnější na tekutém médiu s poměrem N:C 2-2 a PDB, výtěžnost blastospor byla téměř shodná. Americký kmen houby *B. bassiana* patřil spolu s argentinským kmenem k těm nejméně produktivním.

Graf 19: Výtěžnost blastospor vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na různých živných médiích po 5 dnech kultivace



Produkce blastospor argentinského kmene *B. bassiana* byla po 5. dnech hodnocení nejvyšší na živné půdě PDB ($4,39 \times 10^8/1\text{ml}$). Výtěžnost spor byla více než dvojnásobná na tomto médiu v porovnání s ostatními použitými médii. Kmeny houby *B. bassiana*: GHA, z Izraele a z USA byly nejvíce produktivní na médiu se základními nutričními prvky N:C 2-2. Velmi dobrou výtěžnost blastospor měly tyto kmeny i na komerčním tekutém médiu PDB. Kmen CCM8382 entomopatogenní houby *B. bassiana* patřil mezi nejlepší v produkci blastospor na médiích MEB a SDB. Výtěžnost blastospor byla velmi vysoká na obou médiích ($5,39 \times 10^8/1\text{ml}$ MEB a $4,74 \times 10^8/1\text{ml}$ SDB).

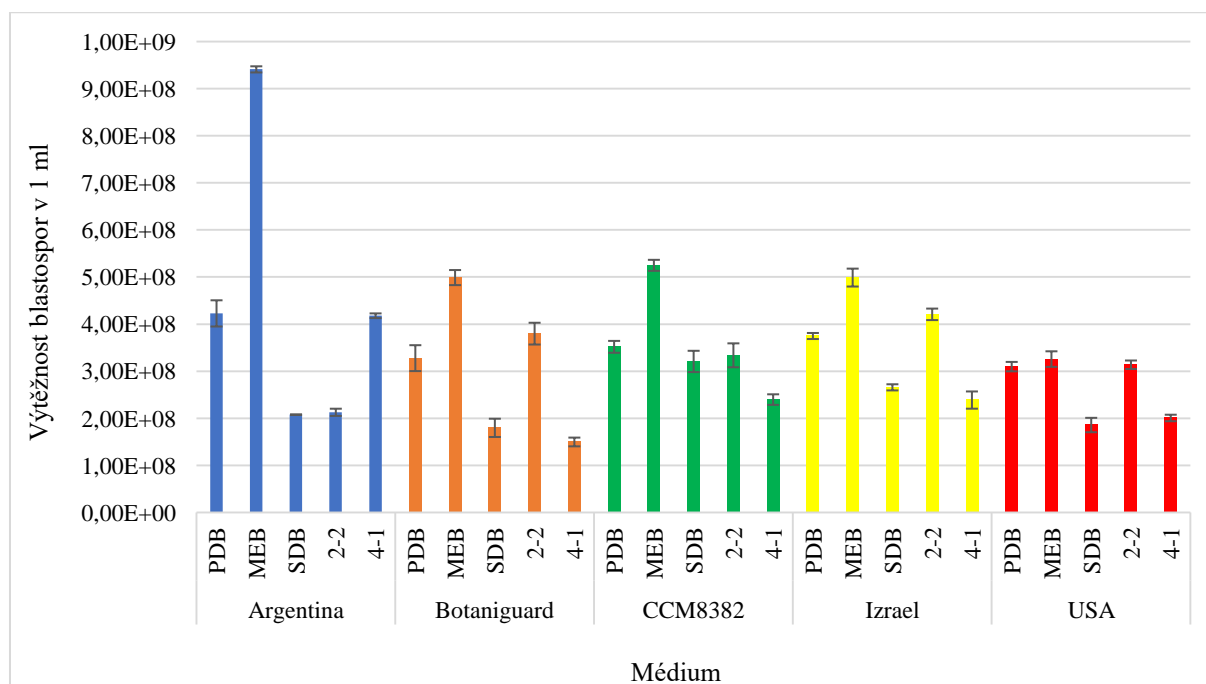
Graf 20: Výtěžnost blastospor vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na různých živných médiích po 6 dnech kultivace



Po 6 dnech hodnocení byla u Argentinského kmene opět nejvyšší produkce blastospor na komerčním médiu PDB. Výtěžnost blastospor byla velmi vysoká ($4,53 \times 10^8/1\text{ml}$). Vhodné médium je pro tento kmen také komerční MEB. Komerční biopreparát Botanigard je stejně jako v předchozích dnech nejvíce produktivní na médiu s poměrem 2-2 a nejméně na komerčním tekutém médiu SDB. Kmen CCM8382 měl nejvyšší výtěžnost blastospor na médiu MEB a produkce blastospor patřila mezi nejvyšší ze všech testovaných kmenů a médií. Výtěžnost blastospor dosahovala $5,13 \times 10^8$ v 1 ml. Izraelský kmen *B. bassiana* byl nejlepší v produkci blastospor na médiu 2-2. Velmi vhodná média pro produkci tohoto kmene byla také MEB a PDB. Entomopatogenní houba *B. bassiana* odizolovaná z USA byla produktivní na médiích 2-2, MEB a PDB. Ostatní média pro produkci blastospor tohoto kmene vhodná nejsou.

Po 7 dnech inkubace kmenů *B. bassiana* dominoval ve výtěžnosti kmen z Argentiny na živném médiu MEB ($9,41 \times 10^8/1\text{ml}$). Výtěžnost blastospor byla nejvyšší ze všech hodnocených kmenů a médií. Komerční médium MEB bylo nejvhodnější i pro další testované kmene *B. bassiana*. Výtěžnost blastospor byla na tomto médiu u všech testovaných kmenů nejvyšší. Nejméně produkční kmen *B. bassiana* byl z USA na médiích PDB a MEB.

Graf 21: Výtěžnost blastospor vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na různých živných médiích po 7 dnech kultivace



Tabulka 16: Statistické vyhodnocení výtěžnosti blastospor kmenů houby *B. bassiana* na živných médiích v různých časových úsecích

Faktory	4. den	5. den	6. den	7. den
Kmen	F=214; df=4,50; p=0,00	F=162; df=4,50; p=0,00	F=90; df=4,50; p=0,00	F=132; df=4,50; p=0,00
Médium	F=175; df=4,50; p=0,00	F=102; df=4,50; p=0,00	F=312; df=4,50; p=0,00	F=631; df=4,50; p=0,00
Kmen*Médium	F=76; df=16,50; p=0,00	F=40; df=16,50; p=0,00	F=36; df=16,50; p=0,00	F=81; df=16,50; p=0,00

Faktoriální ANOVA s interakcemi

Výtěžnost blastospor všech kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na různých živných půdách byla podrobena také faktoriální analýze rozptylu s interakcemi. Byl sledován vliv daného kmene, média a také interakce mezi těmito dvěma faktory. Výsledky byly ve všech dnech hodnocení významně statisticky průkazné (viz Tabulka 16).

Závěr

Každý testovaný kmen entomopatogenní houby *B. bassiana* vyžaduje odlišné nutriční zdroje i dobu kultivace za účelem vysoké výtěžnosti blastospor. Proto je nutné každý kmen testovat zvlášť na růstové a produkční parametry. Všechna data byla podrobena celkové analýze: ANOVA pro opakovaná měření. Na výtěžnost blastospor měly vliv živné médium ($F=539$; $df=4,50$; $p=0,00$), kmen ($F=252$; $df=4,50$; $p=0,00$) a doba kultivace ($F=270$; $df=3,150$; $p=0,00$). Dále měly vliv na produkci blastospor interakce: kmen*médium ($F=95$; $df=16,50$; $p=0,00$), čas*kmen ($F=90$; $df=12,150$; $p=0,00$), čas*médium ($F=110$; $df=12,150$; $p=0,00$) a čas*kmen*médium ($F=32$; $df=48,150$; $p=0,00$).

5.4 Testování účinnosti entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA proti larvám potměníka moučného (*Tenebrio molitor*) v různých teplotních podmínkách

Účinnost proti larvám *T. molitor* byla vyjádřena dvěma způsoby a to v % jako kumulovaná mortalita a pomocí indexu, který popisuje průběh vývoje houby.

Kumulovaná mortalita

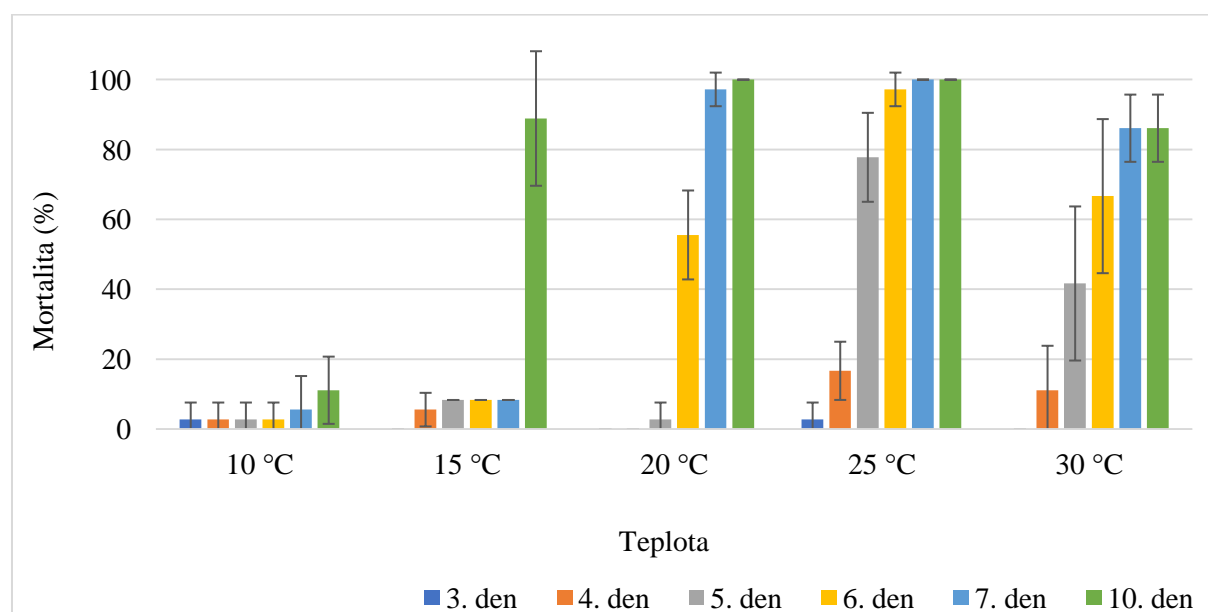
Účinnost entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA proti larvám *T. molitor* byla hodnocena v různých teplotních podmínkách v průběhu 10 dní. Hodnoty byly vyjádřeny v % jako kumulovaná mortalita. Kumulovaná mortalita zahrnovala jak mrtvé jedince bez příznaku infekce, tak i jedince viditelně infikované houbou *B. bassiana*. Ke každé teplotní variantě byla vytvořena kontrolní varianta, kdy byly jedinci *T. molitor* vystaveny pouze 0,05% roztoku Tween 80. V kontrolní variantě nebyla ani po 10 dnech hodnocení zaznamenána žádná mortalita v populaci larev *T. molitor*. Po 3. dnech od inokulace larev houbou *B. bassiana* kmenem GHA došlo ke kumulované mortalitě pouze u variant, které byly umístěny v 10 a 25 °C. Kumulovaná mortalita v populaci larev *T. molitor* byla u obou variant 2,78 %. I když došlo po 3 dnech k mortalitě larev *T. molitor*, výsledky nebyly významně statisticky průkazné ($F=0,800000$; $df=5,12$; $p=0,570523$).

Tabulka 17: Účinnost entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA proti larvám *T. molitor* v různých teplotních podmínkách

Kumulovaná mortalita (%) průměr±SE						
Teplota	3. den	4. den	5. den	6. den	7. den	10. den
kontrola	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 c	0,00±0,00 c	0,00±0,00 c	0,00±0,00 b
10 °C	2,78±4,81 a	2,78±4,81 a	2,78±4,81 c	2,78±4,81 c	5,56±9,62 c	88,89±9,62 b
15 °C	0,00±0,00 a	5,56±4,81 a	8,33±0,00 bc	8,33±0,00 c	8,33±0,00 c	88,89±19,25 a
20 °C	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	2,78±4,81 c	55,56±12,73 b	97,22±4,81 ab	100,00±0,00 a
25 °C	2,78±4,81 a	16,67±8,33 a	77,78±12,73 a	97,22±4,81 a	100,00±0,00 a	100,00±0,00 a
30 °C	0,00±0,00 a	11,11±12,73 a	41,67±22,05 ab	66,67±22,05 b	86,11±9,62 b	86,11±9,62 a

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

Graf 22: Porovnání kumulované mortality u larev *T. molitor* po ošetření kmenem GHA entomopatogenní houby *B. bassiana* v různých teplotních podmínkách



V následujícím dnu došlo k mortalitě larev *T. molitor* téměř u všech teplotních variant vyjma 20 °C. Nejvyšší % kumulované mortality jedinců *T. molitor* bylo zaznamenáno při inkubaci ve 25 °C. Mortalita v populaci larev dosahovala 16,67 %. Velmi vysoká kumulovaná mortalita larev *T. molitor* byla zaznamenána také ve variantě 30 °C (11,11 %). V 15 °C byla mortalita v populaci *T. molitor* 5,56 % a v 10 °C byla úmrtnost stejná jako v předchozím dnu hodnocení. Po 4 dnech byla kumulovaná mortalita larev významně statisticky průkazná ($F=3,42268$; $df=5,12$; $p=0,037481$). Po 5 dnech inkubace byla nejvyšší kumulovaná mortalita

larv *T. molitor* zaznamenána při teplotě 25 °C. Kumulovaná mortalita byla 77,78 %. Velmi vysoká mortalita byla pozorována i při teplotě 30 °C (41,67 %). V dalších testovaných teplotách houba *B. bassiana* kmen GHA proti larvám *T. molitor* tak účinná nebyla. Rozsah kumulované mortality se pohyboval od 2,78 % (10 a 20 °C) do 8,33 % (15 °C). Po 5 dnech hodnocení byla kumulovaná mortalita v populaci larv *T. molitor* v různých teplotních podmínkách významně statisticky průkazná ($F=24,3063$; $df=5,12$; $p=0,000007$). V následujícím dni byla kumulovaná mortalita larv při teplotě 25 °C téměř 100% (97,22 %). Ve 30 °C byla kumulovaná mortalita v populaci larv *T. molitor* také velmi vysoká, hodnota mortality byla 66,67 %. Velmi markantně vzrostla mortalita larv *T. molitor* při teplotě 20 °C. Kumulovaná mortalita byla zvýšena za pouhý jeden den o 53 %. U teplotních variant 10 a 15 °C nedošlo k navýšení mortality od předchozího dne hodnocení, kumulovaná mortalita byla stejná. Po 6 dnech hodnocení byla data kumulované mortality larv *T. molitor* v různých teplotních podmínkách statisticky průkazná ($F=41,9417$; $df=5,12$; $p=0,000000$). Po 7 dnech trvání biotestu došlo ve variantě 25 °C ke 100% kumulované mortalitě larv *T. molitor*. Kumulovaná mortalita larv v teplotní variantě 20 °C opět výrazně vzrostla v porovnání s předchozím dnem, mortalita byla 97,22 %. Velmi vysokou kumulovanou mortalitu larv poskytla také teplotní varianta 30 °C (86,11 %). V ostatních teplotách inkubace měla houba *B. bassiana* kmen GHA velmi nízkou účinnost proti larvám *T. molitor*. I v tomto dnu hodnocení byla kumulovaná mortalita v každé teplotní variantě významně statisticky průkazná ($F=86,7894$; $df=5,12$; $p=0,000000$). Po 10 dnech inkubace byla u teplotních variant 20 a 25 °C zaznamenána 100% kumulovaná mortalita v populaci larv *T. molitor*. V ostatních variantách byl pozorován velmi vysoký nárůst kumulované mortality. Hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 86,11 % (30 °C) do 88,89 % (10 a 15 °C). Po 10 dnech hodnocení byla kumulovaná mortalita v různých teplotních podmínkách kultivace významně statisticky průkazná ($F=41,5671$; $df=5,12$; $p=0,000000$).

Index průběhu a vývoje hub na hostiteli

Tabulka 18: Průměrný index FDI u entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA na larvách *T. molitor* v různých teplotních podmínkách

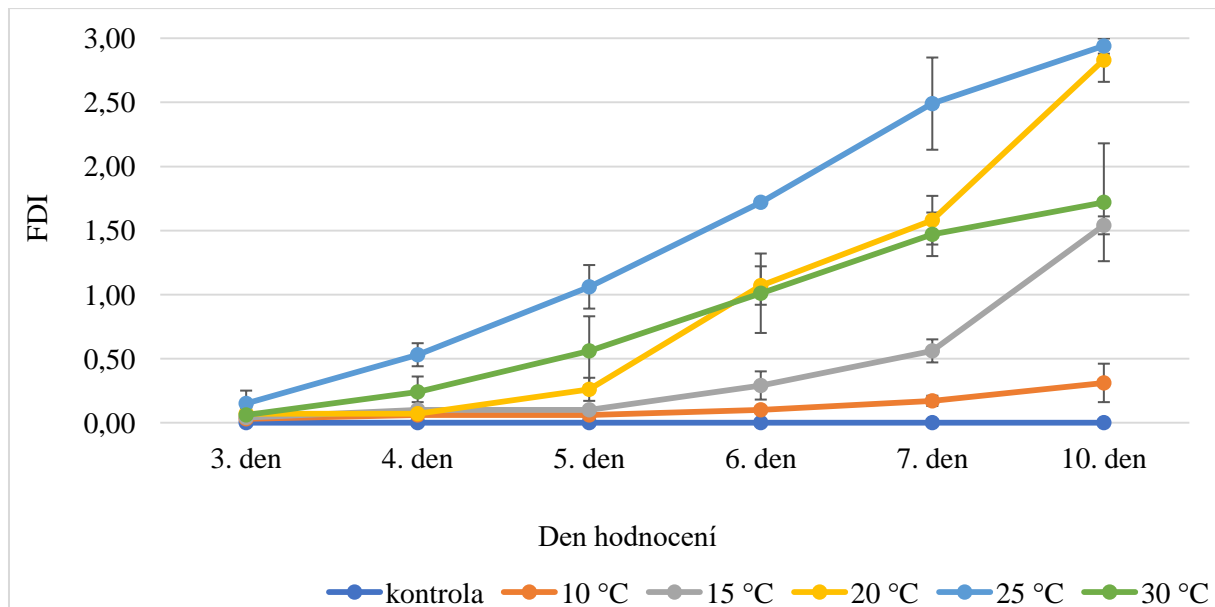
Index FDI průměr±SE						
Teplota	3. den	4. den	5. den	6. den	7. den	10. den
kontrola	0,00±0,00 a	0,00±0,00 c	0,00±0,00 c	0,00±0,00 c	0,00±0,00 d	0,00±0,00 c
10 °C	0,03±0,05 a	0,06±0,05 bc	0,06±0,02 c	0,10±0,02 c	0,17±0,04 cd	0,31±0,15 c
15 °C	0,04±0,07 a	0,10±0,06 bc	0,10±0,02 c	0,29±0,11 c	0,56±0,09 c	1,54±0,07 b
20 °C	0,07±0,05 a	0,07±0,05 bc	0,26±0,09 bc	1,07±0,15 b	1,58±0,19 b	2,83±0,17 a
25 °C	0,15±0,10 a	0,53±0,09 a	1,06±0,17 a	1,72±0,02 a	2,49±0,36 a	2,94±0,06 a
30 °C	0,06±0,02 a	0,24±0,12 b	0,56±0,27 b	1,01±0,31 b	1,47±0,17 b	1,72±0,46 b

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

Pomocí testu FDI je zaznamenán průběh infekce v populaci larev. Čím vyšší index je v populaci zaznamenán, tím je kmen houby přítomný ve formě mycelia na povrchu larvy. Index 1,50 poukazuje na počátek infekce patogenem a index blízký se hodnotě 3,00 značí, že kmen je schopen dokončit svůj vývoj, tj. plně sporuluje na povrchu hostitele. Opět byla pro každou teplotní variantu připravena i varianta kontrolní, kdy byly larvy *T. molitor* vystaveny pouze 0,05% roztoku Tween 80. V kontrolní variantě nebyla na larvách *T. molitor* pozorována žádná přítomnost entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA ani po 10 dnech trvání experimentu. Po 3 dnech hodnocení byly larvy *T. molitor* ve všech teplotních variantách podle průměrného indexu FDI živé, v žádné variantě index nedosáhl hodnoty 1,00, který značí 100% mortalitu. Z Tabulky 17, kde byla data kumulované mortality, byl ale po 3 dnech zaznamenán minimální úhyn v populaci larev *T. molitor*. Po 3 dnech hodnocení vývoje entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA na larvách v různých teplotách inkubace nebyly zaznamenány statisticky průkazné výsledky ($F=2,29730$; $df=5,12$; $p=0,110430$). Po 4 dnech hodnocení byl nejvyšší index FDI houby *B. bassiana* zaznamenán v populaci larev, které byly inkubovány ve 25 °C. Index dosahoval hodnoty FDI=0,53. Index FDI=0,5 na larvách *T. molitor* označuje prvotní příznaky napadení houbou. Na povrchu těla se mohou vyskytovat melanizační skvrny, pohyblivost larev je snížena, ale jsou stále živé. U teplotní varianty 25 °C (FDI=0,53) byla v populaci již zaznamenána mortalita larev *T. molitor*. V ostatních teplotních podmínkách byl index FDI v rozsahu od 0,06 (10 °C) do 24 (30 °C). Po 4 dnech hodnocení byl průměrný index FDI houby

B. bassiana na larvách *T. molitor* významně statisticky průkazný ($F=22,25283$; $df=5,12$; $p=0,000011$).

Graf 23: Porovnání hodnot FDI kmene GHA entomopatogenní houby *B. bassiana* na larvách *T. molitor* v různých teplotních podmínkách



Po 5 dnech hodnocení měla populace larev *T. molitor* ve 25 °C 100% umrtnost. Průměrný index FDI byl vyšší jak 1,00, konkrétně 1,06. V teplotní variantě 30 °C byly na larvách patrné známky infekce a některé byly usmrcené. Průměrný index FDI byl 0,56. V ostatních teplotních podmínkách měla entomopatogenní houba *B. bassiana* kmen GHA velmi pomalý rozvoj. Průměrné indexy se pohybovaly v rozmezí od 0,06 (10 °C) do 0,26 (20 °C). Po 5 dnech hodnocení byly průměrné indexy FDI na larvách v různých teplotách významně statisticky průkazné ($F=26,6974$; $df=5,12$; $p=0,000004$). V 6 dni hodnocení byly všechny larvy *T. molitor* ve 25 °C infikované houbou *B. bassiana*. Průměrný index FDI byl vyšší jak 1,5 (FDI=1,72). V teplotních podmínkách 20 a 30 °C došlo v populaci ke 100% mortalitě. Průměrné indexy FDI byly 1,07, respektive 1,01. V ostatních teplotních variantách byly larvy *T. molitor* stále živé. Po 6 dnech hodnocení byly pozorovány významné statistické rozdíly v průběhu infekce *B. bassiana* na larvách *T. molitor* ($F=62,4803$; $df=5,12$; $p=0,000000$). Po 7 dnech od založení biotestu byla v teplotě 25 °C na některých larvách pozorována začínající sporulace houby *B. bassiana* kmene GHA. Průměrný index FDI téměř dosahoval hodnoty 2,5. Konkrétně byla hodnota FDI=2,49. V teplotních podmínkách 20 a 30 °C byly larvy již viditelně infikované, indexy FDI byly 1,58 (20 °C) a 1,47 (30 °C). U teploty 15 °C se již na larvách začaly objevovat prvotní příznaky infekce *B. bassiana*.

Průměrný index FDI dosahoval 0,56. Nejnižší testovaná teplota 10 °C nebyla pro rozvoj infekce vhodná, index FDI byl velmi nízký (0,17). Po 7 dnech hodnocení byly pozorovány statisticky významné rozdíly v průběhu infekce *B. bassiana* na larvách *T. molitor* ($F=81,0650$; $df=5,12$; $p=0,000000$). Po 10 dnech hodnocení byly výsledky indexu FDI na larvách také významně statisticky průkazné ($F=99,3743$; $df=5,12$; $p=0,000000$). Průměrný FDI index houby *B. bassiana* se na larvách *T. molitor* při teplotách 20 a 25 °C téměř blížil hodnotě 3,00, kdy je již houba plně vysporulovaná. Indexy dosahovaly hodnot $FDI=2,83$ (20 °C), respektive 2,94 (25 °C). Vysoký index průběhu infekce na larvách byl zaznamenán i ve variantě 30 °C (1,72). Teplota 10 °C nebyla vhodná pro průběh infekce entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA. Její rozvoj byl velmi pomalý (0,31).

Závěr

Nejoptimálnější teplota pro rozvoj infekce způsobené entomopatogenní houbou *B. bassiana* kmenem GHA byla 25 °C. V této teplotě byla houba schopná nejrychleji usmrtit jedince *T. molitor*. Již po 7 dnech od založení biotestu byla mortalita v populaci larev *T. molitor* 100 %, všech larvy byly infikované ($FDI=2,49$). Nižší teploty kultivace 10 a 15 °C optimální pro tuto houbu nebyly. Data kumulované mortality a indexů FDI v populaci larev *T. molitor* byly dále podrobeny celkové statistické analýze: ANOVA pro opakovaná měření. Na účinnost (kumulovaná mortalita) entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA proti larvám *T. molitor* měly významně statisticky průkazný vliv teplota ($F=49,9002$; $df=5,12$; $p=0,000000$), čas ($F=162,0431$; $df=5,60$; $p=0,000000$) a interakce mezi nimi ($F=24,2382$; $df=25,60$; $p=0,000000$). Stejně faktory měly významně statisticky průkazný vliv i na průběh infekce hodnocený indexy FDI (teplota: $F=100,4200$; $df=5,12$; $p=0,000000$, čas: $F=414,1399$; $df=5,60$; $p=0,000000$, čas*teplota: $F= 49,8564$; $df=25,60$; $p=0,000000$).

6 DISKUZE

Entomopatogenní houby patří mezi mikroorganismy, které potlačují populace celé řady významných škůdců, a tudíž se uplatňují v biologické ochraně rostlin. Tyto mikroorganismy jsou předmětem intenzivního výzkumu po více než 100 let a mohou se vyskytovat v epizootických nebo enzootických úrovních v hostitelské populaci (Mora a kol., 2017). Přibližně 80 % nemocí, které se vyskytují u hmyzu, je houbového původu. Prakticky všechny druhy hmyzu jsou náchylné k některým chorobám způsobenými těmito houbami, které mohou vést ke smrti (Batista, 1989). Druh entomopatogenní houby *B. bassiana* patří mezi nejvýznamnější a používá se v biologické ochraně rostlin. Entomopatogenní houba *B. bassiana* je kosmopolitně rozšířený druh, který je běžně zaznamenáván jako původce onemocnění na mnoha druzích hmyzu, zejména pak na herbivorních druzích, které jsou alespoň částí svého vývoje vázány na půdu. Produkce spor a virulence jsou hlavními parametry pro praktické využití entomopatogenní houby v ochraně proti zemědělským i lesním škůdcům (Landa a kol., 2007).

Bakalářská práce byla zaměřena na růstové a produkční parametry a na virulenci houby *B. bassiana* kmene GHA, který byl reizolován z komerčního biopreparátu Botanigard. Tento přípravek se využívá v mnoha zemích světa k potlačení populací významných škůdců. Další část práce byla zaměřena na produkční parametry, konkrétně produkci blastospor vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana*. Kmeny pocházely z různých geografických oblastí.

První část bakalářské práce byla zaměřena na vliv teploty a živného média na radiální růst entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA. Neoptimálnější teploty pro růst entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA byly 25 a 30 °C na médiích s poměry základních živin N:C 20-10 a 20-20. Optimální teplota pro většinu entomopatogenních hub se pohybuje v rozmezí mezi 20 a 25 °C (Inglis a kol., 2001). Autoři Goettel, Inglis (1997), udávají jako optimální teplotu pro infikování hostitele, růst a sporulaci mezi 20 až 30 °C. Walstad a kol., (1970) ve své práci uvádí jako optimální teplotu od 15 do 30 °C, ale v této práci byl růst při 15 °C velmi pomalý. Inglis a kol., (2001) ve své práci uvádějí, že teplotní tolerance entomopatogenních hub je silně závislá na prostředí. Houba izolovaná z teplejší oblasti je tolerantnější vůči vyšším teplotám a naopak. V bakalářské práci byly použity komerční média PDA, SDA a SLA a média s různými poměry základních živin dusíku a uhlíku. Většina studií používá k experimentům standardní médium PDA (Walstad a kol., 1970; Francisco a kol., 2006; Ahmad a kol., 2016). Ahmad a kol., (2016) ve své studii

porovnávali různé izoláty *B. bassiana*, které byly testovány na agarovém médiu PDA v rozpětí teplot od 15 do 35 °C po dobu 14 dnů a došli k velmi podobným výsledkům jako tato bakalářská práce. Po 14 dnech inkubace byl při teplotě 15 °C nárůst izolátů *B. bassiana* okolo 12,6 mm (v této práci 14 mm), při 20 °C 23,3 mm (v této práci 17 mm), při 25 °C byl nárůst srovnatelný v této i jejich studii a to 25 mm. Výsledky se lišily při 30 °C, kdy bylo v naší práci dosaženo výrazně většího nárůstu kultury (32 mm) oproti 23 mm ve studii Ahmad a kol., (2016). Kmen GHA vykazoval vyšší teplotní stabilitu než kmeny použité v práci Ahmad a kol., (2016). Ve studii Mann, Thomas (2020), byl kmen *B. bassiana* testován na radiální růst v různých teplotních podmínkách na médiu obohacený o sladký extrakt. Na základě výsledků zjistili, že jejich izolovaný kmen *B. bassiana* nejlépe roste při 23 °C a 25 °C, což shoduje i s výsledkem v této práci, kdy kmen GHA rostl nejlépe na médiu SLA (médiu obohacené o sladový extrakt) při 25 °C. Mann, Thomas (2020) se také ve své studii zabývali schopností houby růst v médiu obsahujícím pouze chitin. MEA agar byl obohacen o 0,1, 1,0 a 5,0 % chitinu. Chitin obsahuje velký podíl dusíku. V této práci jsme se zaměřili na porovnávání růstu kmene GHA na médiích s různým poměrem obsahu dusíku a uhlíku. Výsledky práce Mann, Thomas (2020), ukazují, že vysoký obsah chitinu (resp. dusíku) má za následek redukci růstu kultury. U testovaného kmene, bylo dosaženo nejlepšího radiálního růstu u půdy s 0,1 % chitinu, tedy u půdy s mírně zvýšeným obsahem dusíku. Naproti tomu v této bakalářské práci bylo dosaženo největšího růstu u půd s vyrovnaným poměrem uhlíku a dusíku (20:20). U půd se zvýšeným obsahem dusíku nebyly zjištěny hodnoty s největším nárůstem, což potvrzuje tvrzení kolektivu Mann, Thomas (2020). Z výsledků je tedy patrné, že komerčně dostupný kmen GHA vyžaduje k růstu při různých teplotách různé poměry živin. Studie Tefera, Pringle (2003), byla zaměřena na porovnání radiálního růstu *B. bassiana* na komerční půdě SDA v rozmezí od 15 do 35 °C po dobu 11 dnů. Optimální teplota růstu odpovídala 20 a 25 °C a nejpomalejší růst byl pozorován při 15 a 35 °C. Výsledky této studie jsou téměř shodné i s výsledky této práce. Kmen GHA v naší práci nejrychleji rostl na médiu SDA při 25 °C. V této práci byl na rozdíl od kolektivu Tefera, Pringle (2003) prokázán velmi rychlý nárůst kultury i při 30 °C.

Další část bakalářské práce byla zaměřena na produkci spor kmene GHA v různých teplotních podmínkách a různých živných médiích. Teplota i média byla stejná jako u experimentu radiálního růstu. Kmen houby GHA vykazoval rozdílné nutriční požadavky pro produkci spor v různých teplotních podmínkách. Neoptimálnější média pro produkci spor byla s různými poměry dusíku a uhlíku. Studie Ahmad a kol., (2016) a Tefera, Pringle (2003), se také zaměřily na testování produkce spor kmenů *B. bassiana*. Obě studie prokázaly, že

neoptimálnější teplota pro produkci spor *B. bassiana* je 25 °C. Experimenty probíhaly na komerční půdě PDA. V naší bakalářské práci byla nejvyšší výtěžnost spor na médiu PDA zaznamenána při 15 °C. Při teplotě 25 °C byl kmen GHA nejproduktivnější na médiu s poměrem dusíku a uhlíku 20:40. Rozdíly mohou být způsobeny kmenovou specifitou *B. bassiana*. Obě studie testovaly i teplotu 35 °C a bylo pozorováno, že došlo k markantní redukci spor. Takto vysoká teplota není pro produkci spor entomopatogenních hub optimální (James a kol., 1998).

Ve třetí části bakalářské práce se porovnávala výtěžnost spor (blastospor) vybraných kmenů *B. bassiana* z různých geografických oblastí. Každý testovaný kmen entomopatogenní houby *B. bassiana* vyžadoval odlišné nutriční zdroje i dobu kultivace za účelem vysoké výtěžnosti blastospor. Po 7 dnech hodnocení byla nejvyšší výtěžnost blastospor u všech testovaných kmenů *B. bassiana* na médiu MEB. Nejhorší médium pro produkci blastospor bylo téměř u všech kmenů *B. bassiana* po 7 dnech kultivace na médiu SDB s výjimkou kmene CCM8382, který byl nejméně produktivní na médiu s poměrem N:C 4:1. Produkci blastospor *B. bassiana* se zabývalo mnoho studií, např. výsledky studie Correa a kol., (2020), udávají výtěžnost blastospor *B. bassiana* po 4. dnech kultivace na médiu PDB $6,10 \times 10^7$ blastospor na ml. V naší práci byl kmen GHA mnohonásobně produktivnější za stejných podmínek. Produkce blastospor byla $2,91 \times 10^8$ na ml. Po sedmém dni byla koncentrace blastospor kmene GHA $3,28 \times 10^8$ na ml. Výsledky prokázaly vysokou produkční schopnost kmene GHA. Nejproduktivnějším kmenem v této práci byl kmen odizolovaný z Argentiny, produkce blastospor byla $9,41 \times 10^8$ na ml v živném médiu MEB.

Kmen GHA se dále v této práci testoval na virulenci proti larvám potměníka moučného ve standardním laboratorním biotestu. Při testování virulence *B. bassiana* kmene GHA proti larvám *T. molitor* byla již po 5 dnech inkubace pozorována 78% úmrtnost, přičemž ke 100% úmrtnosti došlo po 7 dnech trvání biotestu při teplotě 25 °C. Teplota 25 °C byla pro průběh infekce kmene GHA neoptimálnější. Práce Petlamul a kol., (2018), se zaměřila na virulenci kmenů *B. bassiana* proti můře *Spodoptera litura* a zaznamenaly 100 % účinnost již po 6 dnech od inokulace. Tato studie, ale použila k experimentu vyšší koncentraci, a to 1×10^8 spor/ml. V bakalářské práci byl titer adjustován na koncentraci 1×10^7 spor/ml. Existuje celá řada kmenů *B. bassiana*, které rychleji zabíjejí hostitele, ale jsou silně závislé na teplotních podmínkách. Kmen GHA prokázal velmi silnou stabilitu v různých teplotách v této bakalářské práci.

Teplotní stabilita je zásadním parametrem pro úspěšné využití entomopatogenních hub v biologické ochraně rostlin. Dalšími významnými vlastnosti, které se pro komerční použití

testují, jsou růstové a produkční parametry, a velmi významná je virulence. Prověřené vlastnosti kmene GHA v této práci odpovídají požadavkům při výrobě biopreparátů na bázi hub.

7 ZÁVĚRY BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Radiální růst kmene GHA

- Neoptimálnější teploty pro růst entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA byly 25 a 30 °C na médiích s poměry základních živin N:C 20:10 a 20:20.
- Na médiu PDA byl růst kmene GHA nejpomalejší ve všech testovaných teplotách.

Výtěžnost spor kmene GHA

- Kmen houby GHA vykazoval rozdílné nutriční požadavky pro produkci spor v různých teplotních podmínkách.
- Při kultivaci v 15 °C bylo pro produkci spor nejvhodnější médium s poměrem N:C 5:10, při kultivaci ve 20 °C se jeví jako neoptimálnější médium 20:10, produkce spor ve 25 °C byla nejvyšší na médiu s poměrem N:C 10:20 a ve 30 °C na médiu 10:40.

Výtěžnost blastospor kmenů: Argentina, GHA, CCM8382, Izrael a USA

- Každý testovaný kmen entomopatogenní houby *B. bassiana* vyžadoval odlišné nutriční zdroje i dobu kultivace za účelem vysoké výtěžnosti blastospor.
- Po 7 dnech hodnocení byla nejvyšší výtěžnost blastospor u všech testovaných kmenů *B. bassiana* na médiu MEB. Nejhorší médium pro produkci blastospor bylo téměř u všech kmenů *B. bassiana* po 7 dnech kultivace na médiu SDB s výjimkou kmene CCM8382, který byl nejméně produktivní na médiu s poměrem N:C 4:1.

Účinnost kmene GHA proti larvám *T. molitor*

- Neoptimálnější teplota pro rozvoj infekce způsobené entomopatogenní houbou *B. bassiana* kmenem GHA byla 25 °C. Nižší teploty kultivace 10 a 15 °C optimální pro tuto houbu nebyly.

8 PŘEHLED LITERATURY

- Ahmad M.A., Ibtisam G., Lubna H.R. (2016): Laboratory Evaluation of the Effect of Temperature and Several Media on the Radial Growth, Conidia Production and Germination of the Fungus *Beauveria Bassiana* (Bals.) Vuil. *SSRG International journal of agriculture & environmental science*, 3: 35-41.
- Bailey A., Chandler D., Grant W.P., Greaves J., Prince G., Tatchell M. (2010): Biopesticides: pest management and regulation. *CAB International, Wallingford, UK*, 71-131.
- Batista F.A. (1989): Controle biológico e o manejo integrado de pragas. *Biológico*, 55: 36-39.
- Baverstock J., Roy H.E., Pell J.K. (2010): Entomopathogenic fungi and insect behaviour: From unsuspecting hosts to targeted vectors. *BioControl*, 55(1): 89-102.
- Bidochka M.J., de Koning J., St. Leger R.J. (2001): Analysis of a genomic clone of hydrophobin (ssgA) from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*, 105: 360-364.
- Bischoff J.F., Rehner S.A., Humber R.A. (2009): A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101: 512-530.
- Boyd R. S. (2002). Does elevated body Ni concentration protect insects against pathogens? A test using *Melanotrichus boydi* (Heteroptera: Miridae). *American Midland Naturalist*, 147: 225-236.
- Bradley C.A., Black W.E., Kearns R., Wood P. (1992): Role of Production Technology in Mycoinsecticide Development. In: Leatham G.F. (eds): *Frontiers in Industrial Mycology*. Springer, Boston, MA, 160-173.
- Bradley C.A., Wood P., Black W., Kearns R., Britton J. (2002): United States Patent Application Publication. *Publication number: US 2002/0006650 A1*.
- Butt T. M., Jackson C., Magan N. (2001): Introduction - fungal biocontrol agents: progress, problems and potential. In: Butt T.M., Jackson C., Magan N., Editors. *Fungi as Biocontrol Agents*. CABI Publishing, Oxon, UK, p. 389.
- Coombs C.A., Hill M.P., Moore S.D., Dames J., Fullard J.F. (2013): Persistence and virulence of promising entomopathogenic fungal isolates for use in citrus orchards in South Africa. *Biocontrol Science and Technology*. 23: 1053-1066.
- Corrêa B., da Silveira Duarte V., Silva D.M. Mascarin G.M., Delalibera I. junior (2020): Comparative analysis of blastospore production and virulence of *Beauveria bassiana* and *Cordyceps fumosorosea* against soybean pests. *BioControl*, 65: 323-337.
- Dara K.S. (2017): Entomopathogenic microorganisms: modes of action and role in IPM. Dostupné online 11. 10. 2019 na <https://ucanr.edu/blogs/strawberries-vegetables/index.cfm?start=15>.

- Daoust R.A., Roberts D.W. (1983): Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: effect of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 41: 143-150.
- De Faria M.R., Wraight S.P. (2007): Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43: 237-256.
- De Muro M.A., Mehta S., Moore D. (2003): The use of amplified fragment length polymorphism for molecular analysis of *Beauveria bassiana* isolates from Kenya and other countries, and their correlation with host and geographical origin. *Fems Microbiology Letters*, 229: 249-257.
- Dírlbeková O. (1991): Biologické zdroje pro mechanickou ochranu rostlin (I. Deuteromycetes, *Beauveria bassiana* [Bals.] Vuill.). – *Studie VTR, ÚVITZ, Ř. Rostl. Vým.*, 11: 10-21.
- Dostálek P. (2000): Bulletin ekologického zemědělství č. 18. *PRO-BIO Šumperk*, 24 p.
- Dufour R. (2001): Biointensive integrated pest management (IPM) [Online]. National Sustainable Agriculture Information Service, ATTRA Publication #PO49. Dostupné online na <http://www.attra.ncat.org/>.
- Eilenberg J., Hajek A., Lomer C. (2001): Suggestion for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, 46(4): 387-400.
- Fargues J., Rougier M., Goujet R., Smith N., Coustere Ch., Itier B. (1997): Inactivation of Conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* by Near-Ultraviolet (UVB and UVA) and Visible Radiation. *Journal of Invertebrate Pathology*, 69: 70-78.
- Fargues J., Luz C. (2000): Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on the infection potential of *Beauveria bassiana* for *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 75: 202-211.
- Francisco E.A., Mochi D.A., Correia A.C.B., Monteiro A.C. (2006): Influence of culture media in viability test of conidia of entomopathogenic fungi. *Ciência Rural*, 36(4): 1309-1312.
- Fransen J.J. (1987): *Aschersonia aleyrodis* as a microbial control agent of greenhouse whitefly. Ph.D. Thesis. Wageningen Agricultural University, The Netherlands.
- Fransen J.J. (1995): Survival of spores of the entomopathogenic fungus *Aschersonia aleyrodis* (Deuteromycotina: Coelomycetes) on leaf surface. *Journal of Invertebrate Pathology*, 65: 73-75.
- Gani M., Hassan T., Saini P., Gupta R.K., Bali K. (2019): Molecular phylogeny of entomopathogens. In: Khan M.A., Ahmad W. (Eds.): *Microbes for Sustainable Insect Pest Management, An Eco-friendly Approach - Volume 1. Springer Nature Switzerland AG*, 43-51.

- Ghorbanpour M., Omidvari M., Abbaszadeh-Dahaji P., Omidvar R., Kariman K. (2018): Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. *Biological Control*, 117: 147-157.
- Goettel M.S., Inglis G.D. (1997): Fungi: Hyphomycetes. In: Lacey L. (Ed.): Manual of techniques in insect pathology. *Academic press, San Diego, USA*, 213-249.
- Güçlü S., Ak K., Eken C., Akyol H., Sekban R., Beytut B., Yildirim R. (2010): Pathogenicity of *Lecanicillium muscarium* against *Ricania simulans*. *Bulletin of Insectology*, 63(2): 243-246.
- Hajek A.E., Leger R.J. (1994): Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology*, 39: 293-322.
- Hajek A. (2004): Natural enemies: an introduction to biological control. *Cambridge university press, UK*, 378 p.
- Hegedus D.D., Bidochka M.J., Khachatourians G.G. (1990): *Beauveria bassiana* submerged conidia production in a defined medium containing chitin, two hexosamines or glucose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33: 641-647.
- Helyer N., Cattlin N.D., Brown K.C. (2014): Biological control in plant protection. *CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group, an Informa business*, 27 p.
- Hnízdil M. (2014a): Integrovaná ochrana rostlin je od roku 2014 v Evropské unii povinná. *Rostlinolékař*, 1: 32-33.
- Hnízdil M. (2014b): Legislativní změny v oblasti ochrany rostlin v roce 2014. *Agromanuál*, 1: 70-71.
- Honěk A., Lukáš J., Martinková Z., Pultar O., Řezáč M. (2008): Význam predátorů a parazitoidů v integrovaných systémech ochrany rostlin. *Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha-Ruzyně*, 64 p.
- Humber RA. (1997) Fungi: Identification. In Manual of Techniques in Insect Pathology (L.A. Lacey, ed.). *Academic Press: London* 153-185.
- Inglis G.D., Goettel M.S., Butt T.M., Strasser H. (2001): Use of hyphomycetes fungi for managing insect pests. In: Butt T.M., Jackson C., Magan N. (Eds): Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. *CAB International, Wallingford, UK*, 23-69.
- Jackson M.A. (1997): Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Houndmills, 19: 180-187.
- Jackson M.A., Jaronski S.T. (2009): Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycological Research*, 113(8): 842-850.

- James R.R., Croft B.A., Shaffer B.T., Lighthart B. (1998): impact of temperature and humidity on host–pathogen interactions between *Beauveria bassiana* and a Coccinellid. *Environmental Entomology*, 27(6): 1506-1513.
- Jaronski S.T. (2010): Role of fungal ecology in the inundative use of entomopathogenic fungi. *BioControl*, 55: 159-185.
- Jaronski S.T. (2014): Mass production of entomopathogenic fungi: State of the art. Mass production of beneficial organisms. *Chapter 11. Elsevier Inc. 357-413.*
- Jaronski S.T. (2016): Mass Production of Fungal Entomopathogens. In book: Microbial Agents for Control of Insect Pests: from theory to practice. *Edition: 1st, Chapter: 9, Publisher: Elsevier - Academic Press, Editors: Lawrence A. Lacey. 141-155.*
- Kim J.S., Skinner M., Hata T., Parker B.L. (2010): Effects of culture media on hydrophobicity and thermotolerance of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* conidia, with description of a novel surfactant based hydrophobicity assay. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105(3): 322-328.
- Koubová D. (2009): Využití hub vbiologické ochraně rostlin proti škůdcům [online]. Dostupné online na: http://www.bio-info.cz/uploads/download/Vyuziti_hub_v_biologicke_ochrane_rostlin.pdf.
- Kreuter M.L. (2002): Biologická ochrana rostlin: přirozená obrana proti škůdcům. *Čestlice: Rebo Productions, 95 p.*
- Kubátová A. (2019): Entomopatogenní mikroskopické houby. [online]. Dostupné online na: https://www.vurv.cz/mikroorganismy/houby%20uk%20praha/Kubatova_Entomopatogenni_houby.pdf
- Landa Z., Jiranová R. (1989): Entomopathogenic fungi as an additional selective pest suppressing agents of greenhouse whitefly populations on greenhouse cucumber. *Proc. Conf. Biopesticides-Theory Practice. České Budějovice, 120-130.*
- Landa Z. (1994): Entomopatogenní houby v biologické ochraně rostlin (habilitační práce). *ZF JU, České Budějovice, 14-50.*
- Landa Z. (2002): Biologická ochrana zahradních rostlin proti chorobám a škůdcům v polních podmínkách, ve sklenících a fóliovnících. In: Demo M., Hričovský I. (Eds.): Trvalo udržatelné technologie v záhradnictve. *Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 225-280.*
- Landa Z., Křenová Z., Vojtěch O. (2007): Využití houby *Beauveria bassiana* v ochraně proti lýkožroutu smrkovému. *Lesnická práce, 86: 10/07.*
- Landa Z., Bohatá A., Kalista M. (2008): Záměrné využívání autochtonních kmenů vybraných druhů entomopatogenních hub. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, zemědělská fakulta, 47 p.*

- Lopez-Perez M., Rodriguez-Gomez D., Loera O. (2015): Production of conidia of *Beauveria bassiana* in solid-state culture: current status and future perspectives, *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(3): 34-341.
- Mann A.J., Thomas S.D. (2020): Plant secondary metabolites and low temperature are the major limiting factors for *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (Ascomycota: Hypocreales) growth and virulence in a bark beetle system. *Biological Control*, 141.
- McCoy C.W., Samson R.A., Boucias D.G. (1988): "Entomogenous fungi". In CRC Handbook of Natural Pesticides-Volume V, Microbial Insecticides, Part A, Entomogenous Protozoa and Fungi. Edited by: Ignoffo, C.M. 151-236. Boca Raton: CRC Series in Naturally Occurring Pesticides, CRC Press.
- Meca G., Sospedra I., Soriano J.M., Ritieni A., Moretti A., Manes J. (2010): Antibacterial effect of the bioactive compound beauvericin produced by *Fusarium proliferatum* on solid medium of wheat. *Toxicon*, 56: 349-354.
- Meyling N.V., Eilenberg J. (2007): Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biological Control*, 43: 145-155.
- Mora M.A.E., Castilho A.M.C., Fraga M.E. (2017): Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. *Arquivos do Instituto Biológico*, 84: e0552015.
- Palma L., Del Valle E.E. (2015): The fungus *Nomuraea rileyi* growing on dead larvae of *Anticarsia gemmatalis* associated with soybean plants (*Glycine max*) in Esperanza (Argentina). *Revista Argentina de Microbiología*, 47: 27-278.
- Pavela R: Rostlinné insekticidy: Hubíme hmyz bez chemie. *Grada Publishing*, 96 p.
- Peng G., Xie L., Hu J. (2009): Identification of genes that are preferentially expressed in conidiogenous cell development of *Metarhizium anisopliae* by suppression subtractive hybridization. *Current Genetics* 55: 263-271.
- Petlamul W., Poonsuk P. (2018): Evaluation of strains of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Spodoptera litura* on the basis of their virulence, germination rate, conidia production, radial growth and enzyme activity. *Mycobiology*, 40: 111-116.
- Rahimzadeh A., Rashid M., Sheikhi Garjan A., Naseri B. (2012): Laboratory evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) for controlling *Amitermes vilis* (Hagen) and *Microcerotermes gabrielies* (Weidner) (Isoptera: Termitidae). *Journal of Crop Protection*, 1: 27-34.
- Richbergerová I.M. (2010): Tradiční zahrádka: z bohaté pokladnice našich předků. *Praha: Knižní klub*, 176 p.
- Roberts D.W., Campbell A.S. (1977): Stability of entomopathogenic fungi. *Miscellaneous publications of the Entomological Society of America*, 10, 19-76.

- Rombach M.C., Aguda R.M., Roberts D.W. (1988): Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in different liquid media and subsequent conidiation of dry mycelium. *Entomophaga*, 33: 315-324.
- Sahayaraj K., Namasivayam S.K.R. (2008): Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products. *African Journal of Biotechnology*, 7(12):1907-1910.
- Samson P., Robertson L., Bakker P., Cocco R., Horsfield A., Logan D., Kettle C., Harris W., Allsopp P., McGill N., Milner R., Bullard G. (2001): Development of *Metarhizium*-based biopesticides for use against sugarcane white grubs in Australia. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists*, 24: 354-360.
- Schrank A., Vainstein M.H. (2010): *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 56: 1267-1274.
- Shah P.A., Pell J.K. (2003): Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61: 413-423.
- Sharma M., Budhan P.B., Pradhan S.B. (2015): Efficacy Test of Bio-pesticides against Tobacco Whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) on Tomato Plants in Nepal. *Journal of Institute of Science and Technology*, 20(2): 11-17.
- Sinha K.K., Choudhary A.K., Kumari P. (2016): Entomopathogenic Fungi, in Ecofriendly Pest Management for Food Security, ed Omkar O. *London: Academic Press*, 475-505.
- Tanada Y., Kaya H.K. (1993): Insect Pathology, *Academic Press, San Diego, CA*, 318-366.
- Tefera T., Pringle K. (2003): Germination, radial growth, and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates and their virulence to *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) at different temperatures. *Biocontrol Science and Technology*, 13: 699-704.
- Tiago P.V., de Oliveira N.T., de Luna-Alves Lima E.A. (2014): Biological insect control using *Metarhizium anisopliae*: morphological, molecular, and ecological aspects. *Ciencia Rural*, 44: 645-651.
- Van Driesche, Heinz R.G. (2004): An overview of biological control in protected culture. *Ball Publishing, Batavia*, 1-24.
- Váňa J. (1998): Systém a vývoj hub a houbových organismů. *Karolinum, Praha*, 164 p.
- Vestergaard S., Butt T.M., Gillespie A.T., Schreiter G., Eilenberg J. (1995): Pathogenicity of the hyphomycetes fungi *Verticillium lecani* and *Metarhizium anisopliae* to the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Biocontrol Science and Technology*, 5(2): 185-192.
- Věchet L., Havelka F., Hanzalová J., Kolomazník K., Vrchotová N. (2014): Rostlinné extrakty a jejich využití proti chorobám a škůdcům. *Úroda*, 9: 28-31.

Vyhláška o obecných zásadách integrované ochrany rostlin, 205/2012 Sb. Dostupné online na 06. 10. 2019 na <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/cze126461.pdf>.

Walstad J.D., Anderson R.F., Stambaugh W.J. (1970): Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 16: 221-226.

Wang Q., Xu L. (2012): Beauvericin, a Bioactive Compound Produced by Fungi: A Short Review. *Molecules*, 17(3): 2367-2377.

Weiser J. (1966): Houbové onemocnění hmyzu. In: Weiser J. (Ed.): Nemoci hmyzu. *Academia, Praha*, 286-290.

Zimmermann G. (2007a): Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17: 553-596.

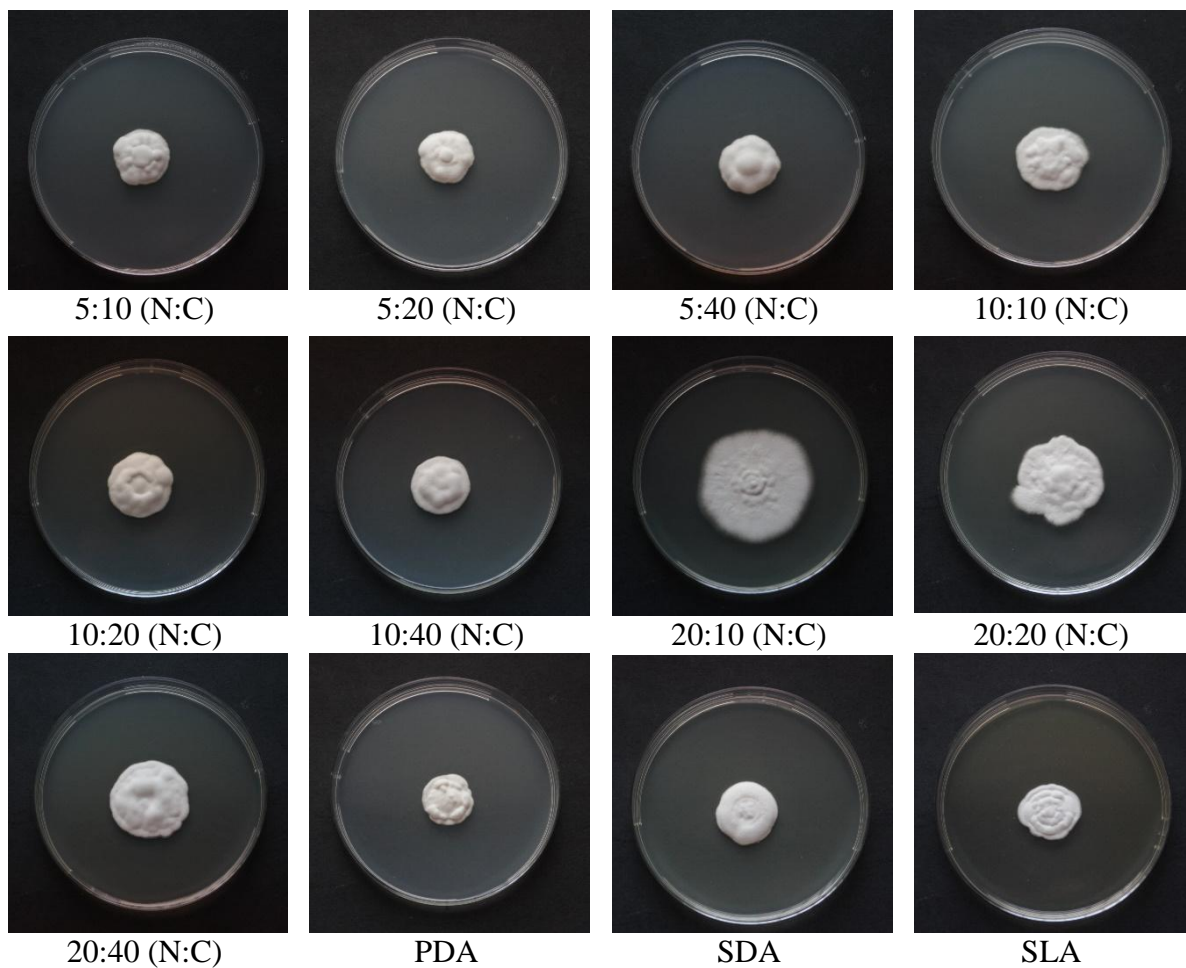
Zimmermann G. (2007b): Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 17: 879-920.

Zimmermann G. (2008): The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. *Biocontrol Science and Technology*, 18(9): 865-901.

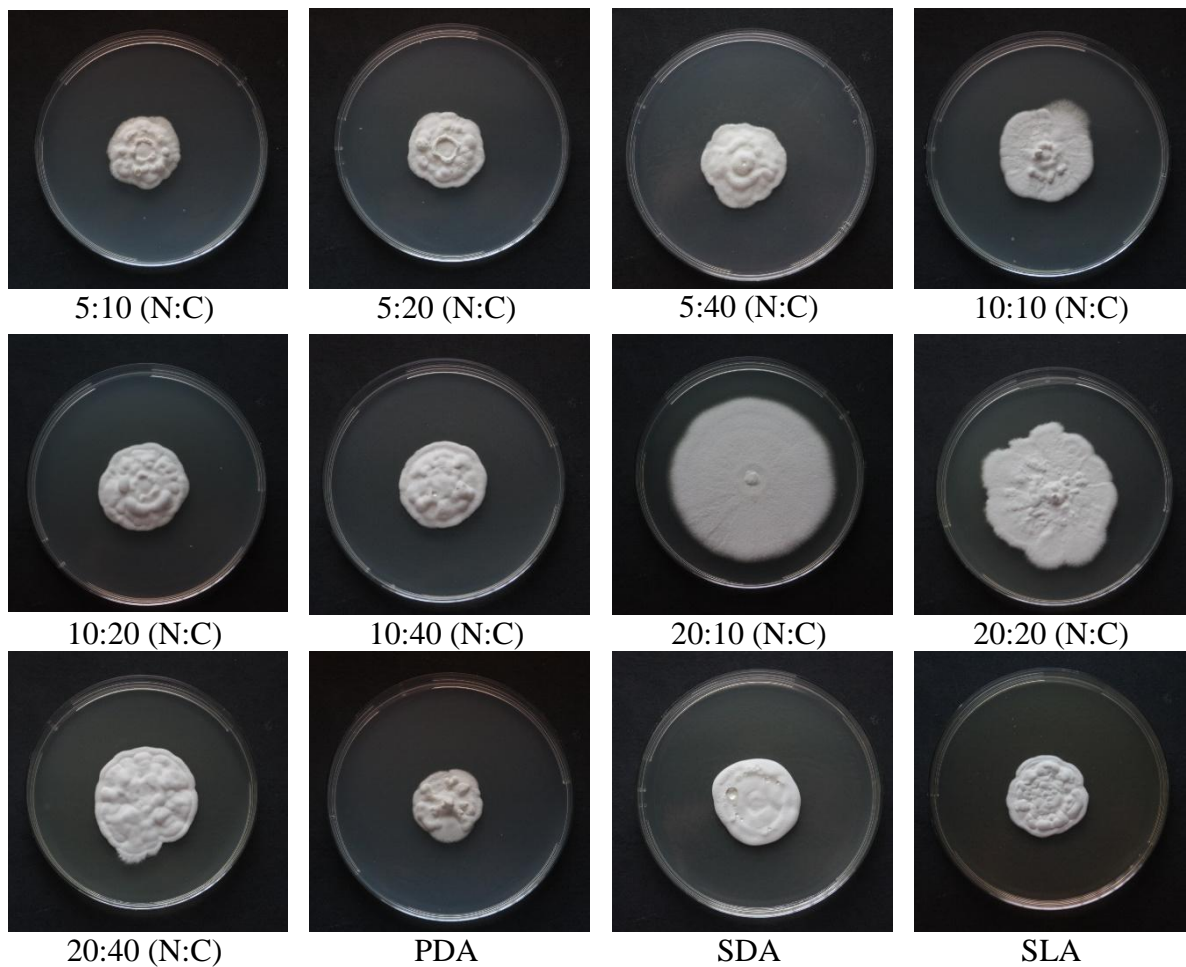
9 PŘÍLOHY

Grafický list 1

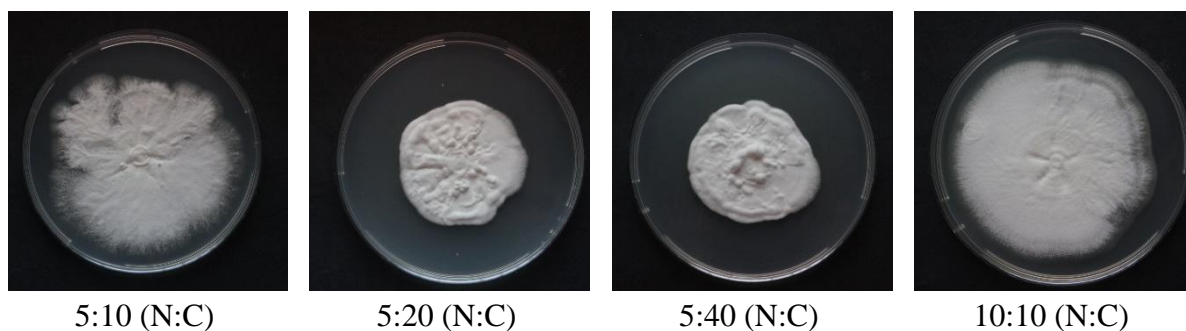
Středové kultury entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA po 21 dnech kultivace v 15 °C na různých živných médiích

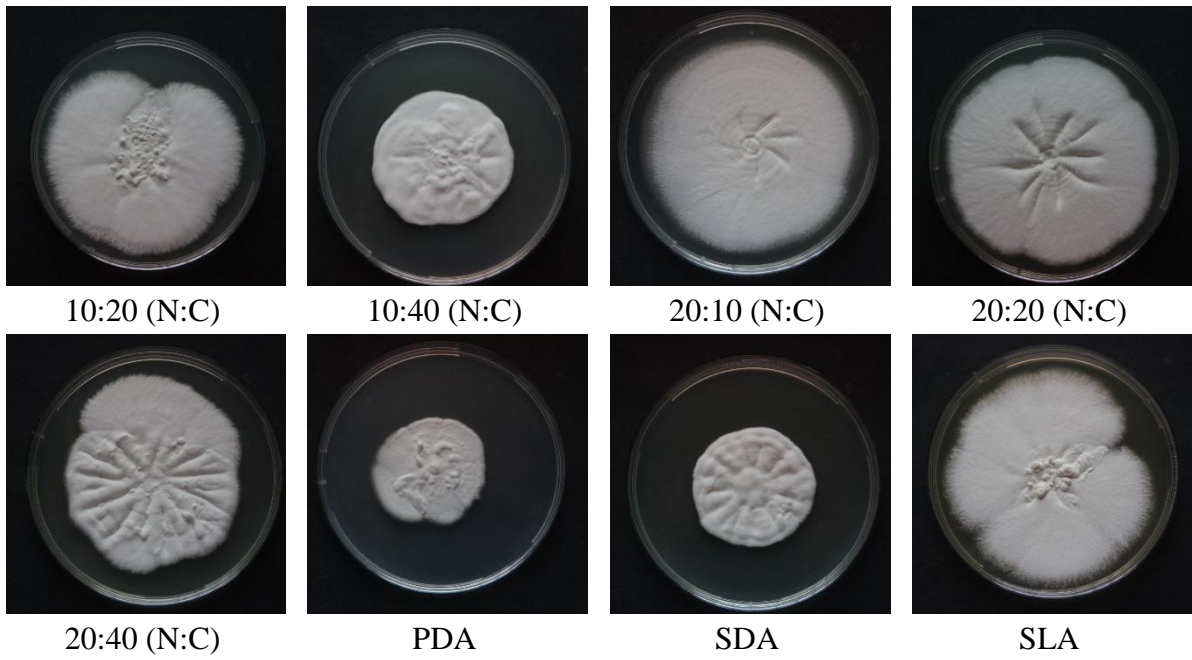


Středové kultury entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA po 21 dnech kultivace ve 20 °C na různých živných médiích

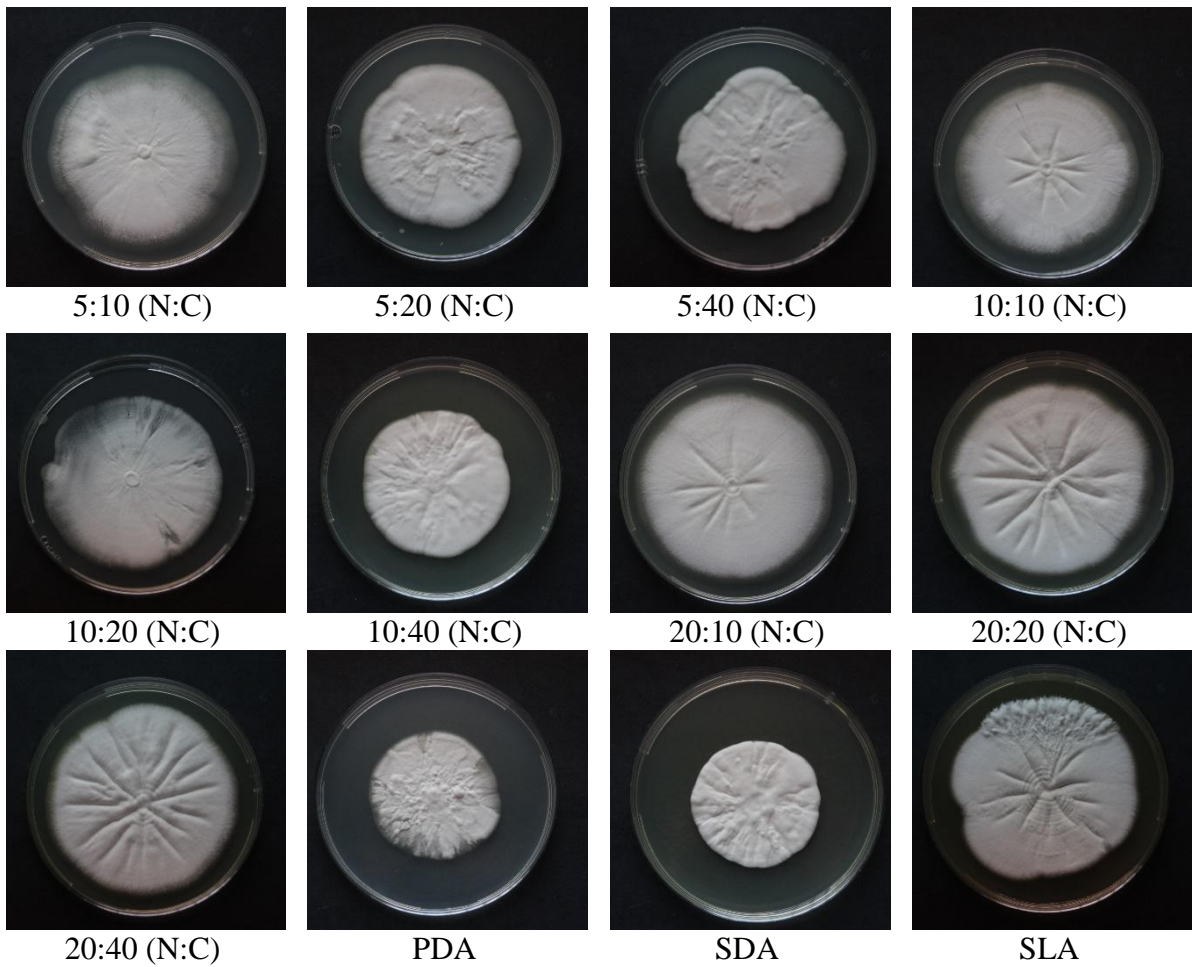


Středové kultury entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA po 21 dnech kultivace ve 25 °C na různých živných médiích





Středové kultury entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene GHA po 21 dnech kultivace ve 30 °C na různých živných médiích



Grafický list 2

Ukázka submerzní kultivace blastospor kmenů *B. bassiana* z různých geografických oblastí

