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 VÝVOJE RŮZNÝCH KMENŮ ENTOMOPATOGENNÍ HOUBY V RŮZNÝCH PODMÍNKÁCH PROSTŘEDÍ

Vedoucí bakalářské práce
Ing. Andrea Bohatá, Ph.D.

Autor
Jaroslav Šebek

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:	**Jaroslav ŠEBEK**
Osobní číslo:	**Z17539**
Studijní program:	**B4131 Zemědělství**
Studijní obor:	**Zemědělské biotechnologie – Rostlinné**
Téma práce:	**Hodnocení vývoje různých kmenů entomopatogenní houby v různých podmínkách prostředí**
Zadávající katedra:	**Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné**

Zásady pro vypracování

Entomopatogenní houba *Beauveria bassiana* je kosmopolitně rozšířených druh, který je schopen vyvolat primární onemocnění na hmyzu. Růstové a produkční vlastnosti vybraných kmenů houby *B. bassiana* budou testovány pomocí standardních laboratorních postupů.
Cílem bakalářské práce je hodnotit a porovnat „in vitro" parametry (klíčivost, radiální růst a produkce spor) vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana*.

1. Vliv teploty na klíčivost vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana*.
2. Porovnání růstu a vývoje s využitím standardního laboratorního postupu umožňující parametrizaci vybraných kmenů houby *B. bassiana* v oblasti „in vitro" (radiální růst).
3. Porovnání výtěžnosti spor vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* v různých podmínkách prostředí.

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: Biooassays of Entomopathogenous Fungi. In: Navon A., Ascher K.R.S. (Eds.): Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. CAB International, Wallingford, UK, 95-140.
Esser K., Lemke P.A. 2002: The Mycota XI.-Agricultural Applications. Springer, Verlag Berlin Heidelberg, pp 388.
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.
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 (42)
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 1668, 370 05 České Budějovice

L.S.

doc. RNDr. Petr Bartoš, Ph.D.
děkan

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 Jaroslav Šebek

Poděkování

Rád bych poděkoval své vedoucí bakalářské práce Ing. Andree Bohaté, Ph.D., za metodické a odborné vedení, všestrannou pomoc, za trpělivost a zvláště za cenné rady, které mi poskytla v průběhu zpracování bakalářské práce. Zároveň bych rád poděkoval Ing. Janě Konopické za vstřícnost a pomoc při realizování experimentů, za poznatky a připomínky při zpracovávání výsledků a grafické dokumentace bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat i paní Olze Divišové za pomoc při zakládání experimentů a vytvoření vhodných pracovních podmínek v laboratoři. V neposlední řadě si vážím podpory své rodiny během studia.

Abstrakt

Entomopatogenní houba *Beauveria bassiana* je polyfágní druh houby, který napadá více jak 700 druhů hostitelů. Tento druh houby patří mezi nejprozkoumanější a nejběžněji se vyskytující zástupce entomopatogenních hub. V zahraničí je registrována řada biopreparátů formulovaných na bázi konidií nebo blastospor *B. bassiana*. Biopreparáty na bázi *B. bassiana* jsou využívány v ochraně proti různým škůdcům polních plodin, v ochraně rychlené zeleniny a okrasných květin i v ochraně lesních porostů proti některým druhům škůdců. Bakalářské práce se zaměřuje na základní "*in vitro*" parametry vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* z různých geografických oblastí. Byl hodnocen vliv teploty na klíčivost spor vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana*. Dále byl porovnán růst a vývoj kmenů houby *B. bassiana* (radiální růst). Poslední část je zaměřena na porovnání výtěžnosti spor kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na standardním živném médiu a přirozeném substrátu.

Klíčová slova: biologická ochrana, entomopatogenní houby, *Beauveria bassiana*, produkce spor, kultivace

Abstract

The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* is a polyphagous species of fungus that attacks more than 700 species of hosts. This species of fungus is one of the most researched and most common representatives of entomopathogenic fungi. Many of bioproducts based on conidia or blastospores of *B. bassiana* are registered around the world. These bioproducts are used in biological control against various pests of field crops, fast-growing vegetables and ornamental flowers and in forest stands against certain pest species. The bachelor thesis focuses on the basic "*in vitro*" parameters of selected strains of entomopathogenic fungus *B. bassiana* from different geographical areas. The work focuses on the effect of temperature on the germination of strains of the entomopathogenic fungus *B. bassiana*. Furthermore, the growth and development of B. bassiana strains (radial growth) were compared. And the last part is focused on the comparison of spore production of strains of entomopathogenic fungus *B. bassiana* on standard nutrient medium and natural substrate.

Key words: biological control, entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, spore production, cultivation

OBSAH

1. ÚVOD 8

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED 9

2.1 Biologická ochrana rostlin 9

2.1.1 Predátoři 9

2.1.2 Parazitoidi 9

2.1.3 Mikroorganismy 10

2.2 Historie mikrobiálních insekticidů 11

2.3 Entomopatogenní houby 12

2.4 Významný rod entomopatogenní houby *Beauveria* spp. 14

2.5 Vývojový cyklus entomopatogenních hub 15

2.6 Izolace entomopatogenních hub 16

2.7 Produkce entomopatogenních hub 17

2.8 Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub 18

2.9 Bezpečnost entomopatogenních hub 20

2.10 Epizootie 20

2.11 Faktory ovlivňující účinnost entomopatogenních hub 21

2.11.1 Biotické faktory 22

2.11.2 Abiotické faktory 23

2.11.2.1 Teplota 23

2.11.2.2 Relativní vlhkost 23

2.11.2.3 Sluneční záření 24

2.11.2.4 Srážky 24

2.11.2.5 Půda 25

3. CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE 26

4. MATERIÁL A METODIKA 27

4.1 Kmeny entomopatogenní houby *B. bassiana* 27

4.2 Příprava suspenzí kmenů *B. bassiana* 28

4.3 Standardní test klíčivosti 28

4.4 Radiální růst na umělém živném médiu (PDA) 29

4.5 Výtěžnost spor na umělém živném médiu (PDA) 29

4.6 Výtěžnost spor na přirozených substrátech 29

4.7 Statistické vyhodnocení dat 30

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY 31

5.1 Vliv teploty na klíčivost spor jednotlivých kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* 31

5.2 Radiální růst kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* 33

5.3 Výtěžnost spor kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na umělém médiu PDA 37

5.4 Výtěžnost spor kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na přirozeném substrátu 40
6. DISKUZE 41
7. ZÁVĚRY BAKALÁŘSKÉ PRÁCE 43
8. PŘEHLED LITERATURY 44
9. PŘÍLOHY 51

1. ÚVOD

V současné době se stal trendem zdravý životní styl. WHO definuje zdraví jako stav úplné tělesné, duševní a sociální pohody. Samotná definice zdravého života zahrnuje různá opatření, kroky a strategie co člověk volí, aby dosáhl optimálního zdraví. Zdravý životní styl je cenný pro snížení výskytu a dopadu zdravotních problémů, regeneraci organismu, zvládání životních stresorů a zlepšení kvality života. Jedním z významných kroků je zdravé stravování. Trendem ve stravování se staly i tzv. bio potraviny. Ekologické zemědělství je způsob hospodaření, který klade značný důraz na opatření chránící půdu a přírodu, zajišťuje ohleduplné zacházení se zvířaty a nepoužívá syntetické pesticidy ani umělá hnojiva. Právě pesticidy mohou vést k výskytu reziduí účinných látek nejen v potravinách ale i v životním prostředí. Pesticidy mohou mít řadu nežádoucích účinků**.** Primárně se jedná o toxické**,** karcinogenní**,** mutagenní a teratogenní účinky. Mohou mít vliv **i** na hormonální a imunitní systém člověka a reprodukci**.**

Tato práce se zaměřuje na přirozenější alternativy ochrany rostlin, které snižují závislost na pesticidech. Bakalářská práce se zaměřuje na využití entomopatogenních hub konkrétně druhu *Beauveria bassiana*. Entomopatogenní houby se používají v biologické ochraně rostlin, která je součástí integrované ochrany rostlin. Zásady integrované ochrany rostlin jsou od 01. 01. 2014 (Vyhláška č. 205/2012 Sb.) povinné pro všechny profesionální uživatele přípravků na ochranu rostlin a mají za cíl eliminovat zbytečné užívání nebezpečných pesticidů.

Entomopatogenní houby jsou již dlouhou dobu známy jako původci infekcí u hmyzu, který způsobuje významné škody na kulturních plodinách. Entomopatogenní houba *Beauveria bassiana* má široké hostitelské spektrum, a proto je často využívaná v biologické ochraně rostlin. Nevýhodou použití těchto hub je závislost účinnosti na podmínkách prostředí, zvláště na teplotě a relativní vzdušné vlhkosti. Tím se použitelnost omezuje pouze na určité klimaticky příznivé areály a prostory jako jsou skleníky.

Cílem bakalářské práce je hodnotit a porovnat základní "*in vitro*" parametry vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* z různých geografických oblastí. První část práce se zaměřuje na vliv teploty na klíčivost vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana*. Další část na porovnání růstu a vývoje s využitím standardního laboratorního postupu umožňující parametrizaci vybraných kmenů houby *B. bassiana* v oblasti "*in vitro*" (radiální růst). Třetí část bakalářské práce je zaměřena na porovnání výtěžnosti spor vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na standardním živném médiu a přirozeném substrátu.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Biologická ochrana rostlin

Biologická ochrana rostlin je definována jako využívání živých organismů k potlačení hustoty populace škodlivých organismů nebo zamezení účinku specifického škodlivého organismu (hmyz, hmyzí vektor) (Eilenberg *et al.,* 2001). Populace všech živých organismů v přírodě se ve stejné míře snižují pomocí predátorů, parazitů, parazitoidů a různých mikroorganismů. Tento proces se nazývá přírodní ochrana. Jsou-li škůdci kontrolováni, jedná se o biologickou ochranu (Hajek 2004). Každý škůdce má svého přirozeného nepřítele (parazitoidi, predátoři, mikroorganismy).

2.1.1 Predátoři

Predátoři jsou makroorganismy, kteří dokáží zabíjet a pojídat hmyz. Predátoři jsou na rozdíl od parazitoidů větší než jejich oběť a loví především v noci. Na hostitele jsou predátoři vázáni pouze potravně. Mladí predátoři využívají živiny z oběti pro svůj růst, zatímco dospělí jedinci využívají oběť pro udržování se v dobré kondici a pro reprodukci. Pro využití predátorů v pěstitelském systému rostlin jsou nezbytné znalosti o taxonomii a biologii jak predátorů, tak hostitelů (van Driesche *et al.,* 2008). Mezi predátory patří nejen hmyz (dravé ploštice, zlatoočka, slunéčka) ale i draví roztoči např. *Typhlodromus pyri*, *Phytoseiulus persimilis* a *Amblyseius californicus* proti sviluškám, *Amblyseius cucumeris* a *A. degenerans* proti třásněnkám (Hajek 2004).

2.1.2 Parazitoidi

Parazitoidi jsou nejběžnějšími typy přirozených nepřátel hmyzích škůdců (Hall, Ehler 1979; Greathead 1986). Na rozdíl od pravých parazitů, parazitoidi hostitele zabíjejí a dokončují svůj vývoj pouze na tomto hostiteli (Greathead 1986, Godfray 1994). Parazitoidi jsou tedy na svého hostitele vázáni nejen potravně, ale i svým vývojem. Významné jsou řády blanokřídlých (Hymenoptera) a dvoukřídlých (Diptera). Parazitoidi zahrnují nejméně 36 rodů čeledi blanokřídlých (*Hymenoptera*), ale rody se mezi sebou významně liší ve velikosti a svým

spektrem potencionálních hostitelů. Dalšími významnými čeleděmi, které se využívají v biologické ochraně rostlin, jsou chalcidky (*Chalcidoidea*) a lumci (*Inchneumonoidea*). Parazitoidi jsou užíváni primárně pro regulaci škůdců například mšic, motýlů a molic, kde jsou účinnější než přirození predátoři (van Driesche *et al.,* 2008).

2.1.3 Mikroorganismy

Jako mikroorganismy jsou označovány organismy, které jsou dobře viditelné pouze pod mikroskopem a patří spolu s členovci k nejvýznamnějším hubitelům škůdců. Některé druhy mikroorganismů jsou schopny vyvolat hromadné nákazy škůdců doprovázené zhroucením jejich populací, a proto se již po mnoho let uplatňují při biologickém boji proti nim (Tichá 2001). Mezi mikroorganismy, které dokáží eliminovat populace škůdců, zařazujeme entomopatogenní viry, houby, bakterie, hlístice a mikrosporidie.

Přirození nepřátelé mohou eliminovat populaci škůdců takovým způsobem, že může dojít i ke snížení používání pesticidů. Biologická ochrana je považována za nejjednodušší a nejméně nákladnou metodu bez příznaků poškození a znečištění přírodního ekosystému (Wiliams 2010).

Cílem biologické ochrany rostlin není kompletní eliminace cílových druhů. Je zde snaha o redukci populací pod ekonomický práh škodlivosti. Existují čtyři strategie pro biologickou ochranu:

1. Klasická biologická metoda
2. Inundativní metoda
3. Inokulační metoda
4. Konzervace a podpora přirozených nepřátel

Klasická biologická metoda je záměrná introdukce exotického bioagens se synchronním vývojovým cyklem škůdce. Cílem je trvalé udržení exotického bioagens v daném biotopu a dlouhotrvající kontrola cílového škůdce (Eilenberg *et al.,* 2001).

Při inundativní strategii je vypouštěno velké množství přirozených nepřátel do jednoletých plodin. Strategie je určena proti jednogeneračním škůdcům způsobujících škody na polních plodinách. Příkladem je vypouštění parazitické vosičky *Trichogramma evanescens* do

populace zavíječe kukuřičného. Přirození nepřátelé se vypouštějí jednorázově maximálně dvakrát během sezóny, po vyhubení škůdce sami zahynou (Helyer et al., 2014).

Při inokulativní metodě je vypouštěno velké množství přirozených nepřátel, k překrytí populací škodlivých činitelů v řízených podmínkách, tj. skleníků. V rámci sezónně inokulativní strategie se využívají např. vosička *Encarsia formosa*, dravý roztoč *Phytoseiulus persimilis*, entomopatogenní bakterie *Bacillus thuringiensis*, entomopatogenní houba *Beauveria bassiana* a spousta dalších jiných makroorganismů nebo mikroorganismů (Landa 2002; van Driesche, Heinz 2004).

Poslední strategií je Konzervace a podpora přirozených nepřátel škodlivých činitelů. Mechanismus spočívá ve zvýšení početnosti přirozených nepřátel v období počátku vývoje populací škůdců. Početnost se ovlivňuje například vytvořením vhodných míst pro přezimování přirozených nepřátel. Pozitivně se projevilo udržování větší diverzity kvetoucích rostlin jejich vysséváním na okrajích polí, případně vynecháním herbicidního zásahu v těchto místech (Honěk *et al.*, 2008).

V lesnictví je využívána pouze klasická a inundativní strategie biologické ochrany rostlin. Mezi požadavky pro dosažení úspěšnosti biologické ochrany rostlin patří vysoká účinnost a nízké náklady. Pěstiteli je obecně preferována augmentativní biologická ochrana rostlin (inundativní a inokulativní strategie) před použitím pesticidů. A to v případě, pokud přirození nepřátelé regulují cílové škůdce v tolerovatelné míře. Aby byla biologická ochrana rostlin využívána, musí být srovnatelná i s jinými metodami ochrany proti škůdcům a být ekonomicky výhodná (van Driesche *et al.*, 2008).

2.2 Historie mikrobiálních insekticidů

Studium onemocnění vyvolané mikroorganismy na hmyzu začalo v 19. století (Kirby, Spence 1815). Studium se zaměřovalo na ochranu komerčních druhů hmyzu např. například bource morušového (*B. mori L.*). Agostino bassi byl prvním kdo prokázal experimentálně přirozené onemocnění na hmyzu v roce 1835, kdy studoval onemocnění způsobené tzv. bílou muskardinou (*Beauveria bassiana*) na bourci morušovém. Dalšími experimenty na bourci morušovém se zabýval Louis Pasteur ve Francii mezi roky 1865-1870.

První podněty využití mikroorganismů ve formě mikrobiálních insekticidů byly navrženy Agostinem Bassim v roce 1836. Navrhl, že by se rozkládající tělo nakaženého hmyzu mohlo smíchat s vodou a následně rozprášit na listy a účelně zabít vybraný hmyz.

Tento koncept využil při polních pokusech v roce 1884 Elie Metchnikoff, který vyprodukoval konide houby *Metarhizium anisolpliae* (Metchnikoff) Sorokin a aplikoval je při polních testech proti larvám rýhonosce řepného (*Cleonus punctiventris*). Mortalita byla v rozmezí od 55 do 80 % (van Driesche *et al.,* 2008).

2.3 Entomopatogenní houby

Houby jsou z hlediska morfologie jednobuněčné organismy nebo organismy rozvětvené tzv. filamenta, kdy hyfy formují mycelium. Mohou se rozmnožovat pohlavně, nepohlavně nebo využívají obě možnosti rozmnožování (Kalina, Váňa 2005).

Houbové organismy jsou fylogeneticky rozlišené do dvou říší a to Chromista (*Straminipila*) a Eumycota (pravé houby). Chromista zahrnují patogeny hmyzu ve skupině známé jako *Oomycota* (*Lagenidium*). *Eumycota* zahrnují patogeny hmyzu z oddělení *Zygomycota, (Entomopthora, Entomomorphaga, Neozygites)* a *Ascomycota (Cordyceps* a *Deuteromycota* např. *Beauveria, Metarhizium, Lecanilicium*) (Inglis *et al.,* 2001).

Do říše hub se zařazují i tzv. entomopatogenní houby, které jsou asociované s hmyzem. Je známo více než 750 druhů těchto hub, které mohou působit jako obligátní či fakultativní původci onemocnění na různých druzích hmyzu. Entomopatogenní houby mohou mít úzký nebo široký hostitelský okruh a mezi nejběžnější hostitele patří členovci (arthropoda). Nicméně hostitelské spektrum závisí na konkrétním druhu houby. Například *Aschersonia aleyrodis* se specializuje pouze na molice, *Nomuraea rileyi* na motýli čeledi můrovití (*Noctuidae*). Druhy *B. bassiana, M. anisopliae* a *Isaria fumosorosea* patří mezi houby se širokým hostitelským okruhem (Inglis *et al.,* 2001).

Ve srovnání s dalšími entomopatogenními mikroorganismy mají houby vysoký potenciál, protože mohou aktivně pronikat do hmyzu a způsobovat tak jejich onemocnění. Hostitele mohou infikovat v různém vývojovém stádiu a v přírodě vyvolávat epizootie (Landa 1994). Mohou být použity jako alternativa k ochraně chemické, výhodou je jejich šetrnost k životnímu prostředí, necílovým organismům a lidskému zdraví. Hostitel může být infikován přímou aplikací ve formě biopreparátů nebo tzv. horizontálním přenosem z infikovaného hmyzu (Vega *et al.,* 2012). Entomopatogenní houby se společně s entomopatogenními nematody a protozoi využívají v biologické ochraně např. brukvovitých rostlin (*Brassiacacae*) za účelem boje proti škůdcům (Hokkanen *et al.,* 2003).

Obecně jsou zemědělské půdy chudší na výskyt entomopatogenních hub v porovnání s neobdělávanými půdami, ale vyskytují se i zde (Vänninen *et al.,* 1989; Zec-Vojinovic *et al.,*

2006). Veliký potenciál v biologické ochraně rostlin mají dva druhy entomopatogenních hub *B. bassiana* a *M. anisopliae*. Hokkanen (1993) ve své studii zveřejnil vysoký potenciál *B. bassiana* proti přezimujícím dospělcům blýskáčka řepkového (*Meligethes aeneus*), kdy byl významně snížen stav populace těchto škůdců. Další studie se zaměřila na významné škůdce dřepčíka olejkového (*Psylliodes chrysocephala*) a krytonosce řepkového (*Ceutorhynchus assimilis*), kdy byla do pole čínského zelí aplikována houba *M. anisopliae* ve formě aerosolu a způsobila vysokou úmrtnost obou škůdců (Hokkanen *et al.,* 1993; Vänninen *et al.,* 2000). Některé studie se zaměřovaly i na necílové organismy a bylo objeveno, že někteří parazitoidi mohou být k entomopatogenním houbám také citliví (Husberg, Hokkanen 2001).

Některé druhy entomopatogenních hub jako *M. anisopliae* a *B. bassiana* mohou kolonizovat také oblast rhizosféry rostlin a působit jako endofyti. Takto poskytují rostlině systematickou ochranu proti škůdcům, a navíc jsou s rostlinou v symbióze. Díky těmto jedinečným vlastnostem jsou entomopatogenní houby užitečné pro potlačení skrytého hmyzu, u kterého se životní cyklus vyskytuje v rostlinných tkáních, což činí škůdce nepřístupným pro ošetření přímým kontaktem (Quesada-Moraga *et al.,* 2006). Je snaha tohoto systému využívat např. v biologické boji proti palmovým škůdcům *Rhynchophorus ferrugineus* a *Paysandisia archon*. Ošetření těmito houbami bylo zacíleno proti dospělcům, jelikož larvy se vyskytují uvnitř kmene palem (Ortega-García *et al.,* 2017).

Entomopatogenní houby mohou být přenášeny do prostředí i užitečným hmyzem bez negativních dopadů. Např. včelami a čmeláky. Včely mají tělo pokryté větvenými chloupky, které jsou uzpůsobené pro zachycení a přenášení pylových zrn z květiny do úlu. Tyto chloupky mohou také sloužit k přenosu spor bakterií a hub. Čmelák *Bombus impatiens* byl využit ve skleníku pro přenesení spor entomopatogenní houby *B. bassiana* na sladkou papriku proti klopušce *Lygus lineolaris* a třásněnce *Frankliniella occidentalis* (Al-mazra'awi *et al.,* 2006). Včely byly využívány k šíření houby *M. anisopliae* při procesu opylení květu řepky olejky k infikování dřepčíků, krytonosce zelného a blýskáčka řepkového (Butt *et al.,* 1998).

Entomopatogenní houby mohou být v biologické a integrované ochraně rostlin použity jako alternativa k ochraně chemické, ale insekticidy jsou stále potřebné pro potlačení rychle se rozvíjející populace škůdců, které nelze regulovat ani eliminovat cíleně houbami. Fungicidy, které se využívají při regulaci onemocnění rostlin, mohou mít negativní vliv na účinnost entomopatogenních hub. Herbicidy a rostlinné regulátory růstu jsou také extenzivně využívané ve většině agroekosystémů a jejich kompatibilita s houbami je stále nejasná. Pesticidy mohou mít negativní vliv na klíčení a rozvoj entomopatogenních hub, proto je testování kompatibility pesticidů a těchto hub stále předmětem výzkumu (Vänninen, Hokkanen 1988).

2.4 Významný rod entomopatogenní houby *Beauveria* spp.

První zmínka o entomopatogenní houbě *B. bassiana* pochází již z roku 1835. Jako první prokázal houbovou nákazu na hmyzu Agostino Bassi di Lodi z Itálie (teorie onemocnění zárodečných linií). Nákazu způsobenou *B. bassiana* objevil u bource morušového (*Bombyx mori*) a začal ji nazývat bílá muskardina. Poté následovaly další experimenty s *B. bassiana*. Následně byla houba *B. bassiana* prostudována a popsána slavným italským naturalistou Giuseppe Gabriel Balsamo-Crivelli v roce 1835, který jí dal jméno *Botrytis bassiana* na počest Agostina Bassiho (Steihaus 1949; Müller-Kögler 1965; Rehner 2005). Většina obsáhlých studií o rodu *Beauveria* jsou přesně popsány včetně morfologických vlastností v pracích Steinhaus (1949), MacLeod (1954) a De Hoog (1972).

Od prvního popsání a charakteristiky rodu *Beauveria*, se dva významné druhy *B. bassiana* a *B. brongniartii* začaly využívat v biologické ochraně rostlin. Ve studii Steinhause (1949) byly shrnuty: infekční proces, vývojový a životní cyklus a praktické využití *B. bassiana* proti hmyzím škůdcům. Práce byla zaměřena zejména proti zavíječi kukuřičnému (*Ostritinia nubilalis Pyrausta)* a obaleči jablečnému (*Carpocapsa pomonella*). Ve studii je zmíněno i praktické využití *B. bassiana* (dříve *Beauveria globulifera*) proti *Blissus leucopterus*.

Müller-Kögler shrnul ve své studii v roce 1965 další informace o využití houby rodu *Beauveria*. Entomopatogenní houba *B. bassiana* se využívala v rámci biologické ochrany rostlin v zemědělství, lesnictví, sadech a sklenících v tropických oblastech proti 28 druhům a čeledím hmyzích škůdců. Houba *B. brongniartii* byla aplikována zejména proti chroustům (*Melolontha* spp.) a proti brouku *Epilachna vigintioctomaculata*.

V roce 1981 publikoval Ferron ve své práci využití entomopatogenních hub rodu *Beauveria* a *Metarhizium* proti škodlivým organismům. Ve stejném období je již využíván mykoinsekticidní produkt Boverin, který byl na bázi *B. bassiana*. Boverin se hojně využíval v Sovětském Svazu, zejména proti mandelince bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*) a obaleči jablečnému (*Cydia pomonella*) (Butt *et al.,* 2001; Wraight *et al.,* 2001; Copping 2004; Kabaluk, Gazdik 2005; Zimmermann 2007).

B. bassiana se vyznačuje bílými, později nažloutlými nebo příležitostně načervenalými koloniemi. Na vzdušném myceliu se formují hroznovitě uspořádané konidiofory. Na konidioforech se tvoří konidiogenní buňky, které mají kulovitou až baňkovitou bazální část a dlouhou apikální část (rachis), často zubovitě (zig-zag) formovanou. Na každém zubu se vytváří jedna jednobuněčná konidie. Konidie jsou hyalinní, kulovité až elipsoidní, zpravidla 2-3×2-2,5

μm velké. Shluky konidioforů s konidiemi vytváří shluky, které vypadají na plně vysporulované kultuře jako bavlněné míčky (Humber 1997; Zimmermann 2007).

2.5 Vývojový cyklus entomopatogenních hub

Vývojový cyklus entomopatogenních hub se skládá z parazitického a saprotrofního způsobu života a má několik fází. Patří sem uchycení virulentních konidií na povrch těla hostitele, klíčení, penetrace, proces rozpoznávání, který vyúsťuje v přijetí patogena a navázání parazitického vztahu mezi hostitelem a patogenem, množení v hostiteli, usmrcení a tvorba nových infekčních struktur (Kůdela 1989).

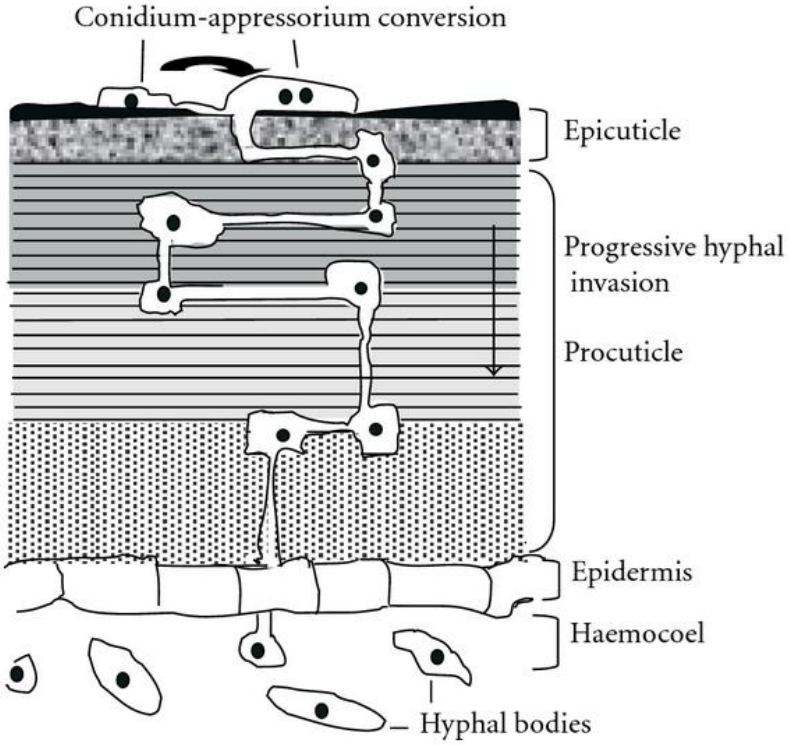
Infekce začíná obvykle přichycením konidie nebo jiného infekčního stádia na kutikulu hostitele. Houby mohou proniknout do hostitele i ústním a pohlavním otvorem (např. *Culicinomyces*) nebo různými poraněními, ale nejčastěji houby pronikají přes kutikulu. Teplota 20 až 30 °C je nejpříznivější pro infekci způsobenou houbami. Podmínky vysoké vlhkosti nad 90 % bez volných molekul vody, jsou často vyžadovány pro konidiální klíčivost a produkci konidií (Inglis *et al.*, 2001; Landa 2002).

Adheze neboli přilnutí konidií na povrch těla hostitele je často zvýšena slizovitou hmotou. Na povrch hostitele se infekční partikule dostanou např. větrem, deštěm, zvířaty a v případě biopreparátů přímou aplikací k cílovému místu. Přichycení konidií ke kutikule hmyzu je zapříčiněno pomocí adhezních mechanismů zprostředkovaných hydrofobicitou konidiální buněčné stěny (Boucias *et al.,* 1991). Po přichycení houby na povrch hostitele se iniciuje klíčení a následuje proliferace skrz kutikulu hmyzu pomocí různých struktur (hyfy, appressorium). Fyzické a chemické vlastnosti hmyzí kutikuly ovlivňují samotný infekční proces. Dospělý jedinec má pevnou kutikulu, která představuje bariéru pro vniknutí houby v porovnání s hmyzem, u kterého se kutikula postupně formuje a je více citlivý k infekci (van Driesche *et al.,* 2008). Proniknutí hyfy (prodlouženého klíčku) do hostitele podporují enzymy, které narušují kutikulu případně mechanické či fyzikální síly.

Po vniknutí do hostitele se houba rychle množí. V hemolymfě se začínají vytvářet tzv. blastospory (útvary podobné kvasinkám). Protoplasty blastospor napomáhají k překonání hostitelských obranných mechanismů, protože nejsou rozpoznávány imunitním systémem. Blastospory mohou produkovat toxiny, které napomáhají potlačit imunitní reakci. Následuje smrt hostitele a dále houba prorůstá na jeho povrch (Hajek, St. Leger 1994). Usmrcením hostitele houba dále žije saprofyticky na mrtvém těle a rozrůstá se rozsáhle do mycelia.

Konidiofory za vhodných podmínek vlhkosti a teploty produkují konidie. Konidie se dále šíří do prostředí a cyklus se opakuje (Inglis *et al.*, 2001).

Ukázka parazitické fáze vývojového cyklu entomopatogenních hub (Sandhu *et al.* 2012)



2.6 Izolace entomopatogenních hub

Pro izolaci entomopatogenních hub se používají dvě metody, a to metoda využívající selektivní média a metoda využívající živé návnady. Pro příklad se využívají larvy zavíječe voskového (*Galleria mellonella*), potemníka moučného (*Tenebrio molitor*) a larvy květilek rodu *Delia.* Tato metoda může být využita k vyhledávání hub předem částečně přizpůsobených na půdní podmínky (horko, chlad, sucho, vlhko) (Zimmermann 2007; Driesche *et al.*, 2008). Základem selektivního média mohou být různé živné půdy, které jsou obohaceny o selektivní složky jako je fungicidní účinná látka dodine (N-dodecylquanidine monoacetate) a antibiotika jako je cykloheximid, chloramfenikol, streptomycin a tetracyklin (Chase *et al.*, 1986).

2.7 Produkce entomopatogenních hub

Některé druhy hub včetně entomopatogenních jsou schopny růst na umělém živném médiu. Konidie entomopatogenních hub se produkují na pevných nebo tekutých médiích, popřípadě pomocí přirozených substrátů jako jsou např. rýže, ovesné vločky, kroupy, otruby a jiné (Landa 2002). Konidie se z přirozených substrátů následně vymývají pomocí destilované vody. Kultivační média se mohou skládat ze základních živin dusíku a uhlíku, dále proteinů, vitamínů, minerálů, solí a antibiotik. Přesný obsah složek závisí na konkrétním inokulovaném mikroorganismu. Produkce hub na pevném agarizovaném médiu je ekonomicky nevýhodná a není zde potenciál pro automatizaci. McCoy *et al.,* (1980), ve své práci uvedl, že tento problém by se mohl řešit tak, že se v kapalné kultuře vyprodukuje velké množství mycelia houby a poté se mycelium přemístí na pevné médium, kde dochází k růstu.

Pro dosažení efektivní regulace cílového hostitele je požadována koncentrace 10^5 až 10^6 konidií na cm^2 na listové plochy nebo stejném množství konidií obsažených v půdním roztoku v cm^3. Na 1 hektar je spotřeba 10 až 15 kg přirozených substrátů (Federici 2007).

Blastospory jsou produkovány v tekutých médiích pomocí submerzní kultivace, která simuluje prostředí hemolymfy hmyzu. Některé druhy entomopatogenních hub lze kultivovat v submerzních tekutých kulturách například *B. bassiana* a *Hirsutella thompsonii* (van Winkelhoff, McCoy 1984). Alternativní metoda pro komerční produkci entomopatogenních hub zahrnuje mycelilální fragmenty nebo blastospory, které mohou být snadno produkovány v tekuté kultuře. Tento postup byl objeven u houby *H. thompsonii* a byl patentován. Myceliální fragmenty byly produkovány v submerzních kulturách a poté vysušeny a zamraženy (McCabe, Soper 1985; McCoy *et al.,* 1975). Pro entomopatogenní houbu *Isaria fumosorosea* (dříve *Paecilomyces fumosoroseus*) byl vytvořen produkční systém, který zahrnuje tvorbu blastospor pomocí submerzní kultivace. Tento produkční systém má řadu příznivých vlastností zahrnujících krátkou dobu kultivování a vysoký výtěžek blastospor, které jsou životaschopné a infekční i po procesu vysušení (Jackson *et al.,* 2003).

U hromadných produkcí entomopatogenních hub může časem docházet ke kontaminaci, zhoršení produkčních parametrů nebo ke ztrátě virulence. Tyto tři parametry musí být pro úspěšné používání biopreparátů stálé. Virulence může být měřena pomocí biotestu aplikovaného na daného hostitele, kde je k porovnání připraven standardní kmen houby. Bylo doloženo, že kmeny entomopatogenních hub mohou po opakovaných subkultivací na umělém médiu ztrácet virulenci. Např. opakovaná inokulace houby *N. riley* při subkultivaci způsobila ztrátu virulence k larvám *Anticarsia gemmatallis*. Virulence byla ztracena při myceliálním

přenosu v 80. pasáži. Ztráta či snížení virulence byla zjištěna při opakovaných subkultivací přes umělé médium i u dalších druhů entomopatogenních hub (Morrow *et al.,* 1989).

2.8 Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub

Bateman (1993) pojednával ve své studii o technologických faktorech ovlivňující vývoj mykopesticidů. Houbové konidie potřebují přijít do kontaktu s povrchem hostitele, aby byl zahájen infekční proces. Konidiální adhezi na povrch hostitele napomáhají konidiální „přísavky" neboli apresorium. V biopesticidech se běžně využívají tenzidy, které redukují elektrostatické pole na povrchu těla hostitele způsobující shlukování mikročástic biopesticidu. Nicméně tenzidy mohou snižovat přilnavost a životaschopnost konidií, a proto se musí kontrolovat kompatibilita s houbami.

Biopreparáty mohou být v granulované nebo práškové formě. Granulovaná forma např. vegetativních buněk *B. bassiana* byla efektivní proti můrovitému hmyzu (*Noctuidae*), který obvykle shání potravu na povrchu půdy (Storey, Gardner 1989). Prášková forma se využívá k plánované aplikaci na listy poškozenými hmyzem. Může se použít i forma smáčitelného prášku, protože bylo zjištěno, že některé druhy hub velmi rychle klíčí ve vodě (Driesche *et al.,* 2008). Do některých biopreparátů je přidávána mimo jiné také olejnatá složka, která poskytuje částečnou ochranu proti degradaci ultrafialovým zářením (Moore *et al.,* 1993). Malsam *et al.,* (2002) zjistil, že houba *M. anisopliae* je v kombinaci s oleji více účinná proti molici skleníkové (*Trialeurodes vaporariorum*). Přilnavost konidií *M. anisopliae* se na povrch těla hmyzu výrazně zlepšila. Úmrtnost hmyzu byla po přidání oleje mezi 94-98 % v porovnání s variantou bez oleje, kde byla mortalita pouze 25-30 %.

Velmi dobré výsledky v polních pokusech měla entomopatogenní houba M. *anisopliae* var. *Acridum*, která je součástí biopreparátu Green Muscle®, který byl vyvinut v rámci výzkumného programu LUBILOSA. Aktivní složka biopreparátu napadá specificky pouze kobylky (Acridoidea, Pyrgomorphoidea), sarančata a cikády. Je široce uplatňován v Africe a za příznivých podmínek způsobuje až lokální epidemie kobylek (Douthwaite *et al.,* 2001).

Provádění ošetření na velkých plochách polí je velice nákladné (Feng *et al.,* 1994). Použití biopreparátů na bázi hub je praktické pro plodiny s vysokou produkční hodnotou např. vinná réva v Kalifornii pro regulaci *Homalodisca coagulata* (Federici 2007). Použití hub do nízkoprodukčních plodin je nepravděpodobné kvůli požadovaným vysokým aplikačním dávkám na hektar (Federici 1999). Současná kapacita komerčního systému produkce není adekvátní pro ošetření porostů o plochách větších než 20 000 hektarů za týden, což by bylo

optimální pro regulaci škůdců polních plodin. Entomopatogenní houby jsou závislé především na teplotě prostředí, relativní vzdušné vlhkosti, slunečnému a UV záření (Inglis *et al.,* 2001). Pokud nejsou splněny optimální podmínky, účinnost hub je nedostačující. Antwi *et al.,* (2007) testoval komerční produkt obsahující *B. bassiana* proti dřepčíkům *Phyllotreta* ssp. Poškození ošetřeného porostu houbou bylo srovnatelné s kontrolním neošetřeným porostem. Dřepčíci jsou často problémem během teplého a suchého počasí a tyto podmínky nejsou pro infekci houbou vhodné. Nicméně *B. bassiana* může infikovat larvální stádium a redukovat počet larev či dospělců objevujících se v pozdním létě a tím dojde k navýšení mortality přezimujících dospělců.

Najít vhodný druh a kmen houby, který bude mít vysokou účinnost proti danému hmyzu, není jednoduchý úkol (Vänninen *et al.,* 1989). Problematika entomopatogenních hub je natolik náročná, že je stále málo záznamů jejich využívání od pěstitelů, a to především kvůli vysokým nákladům na hektar a slabou účinností v době nepříznivých podmínek prostředí. Mykoinsekticidy mají přímou konkurenci s komerčně zavedenými pesticidy. Přírodní biopreparáty jsou závislé na mnoha faktorech, kdežto běžné pesticidy působí ihned po aplikaci. A to je hlavní nevýhoda biologických pesticidů. I přes intenzivní výzkum entomopatogenních hub bylo registrováno jen pár druhů těchto hub, které se využívají v biologické ochraně rostlin. Mezi vybrané registrované druhy patří *B. bassiana, B. brongniartii, M. anisopliae, Lecanicillium muscarium* a *I. fumosorosea* (de Faria, Wraight 2007).

Praktická aplikace entomopatogenních hub je v klasické a inundativní strategii biologické ochrany rostlin stále závislá na laboratorním výzkumu. Laboratorní testy se zabývají získáním vysoce virulentního kmene houby, zjištěním optimální dávky inokula a následně jsou na houby působeny biotické a abiotické faktory prostředí. Výsledky laboratorních testů se mohou v porovnání s polní aplikací lišit. Avšak poskytují hodnotné informace ohledně aktivity entomopatogenních hub a jejich potencionálním charakterem v biologické ochraně proti mnoha nebezpečným škůdcům rostlin (Markova 2000; Augustyniuk-Kram 2010).

Forma skladování biopreparátů na bázi entomopatogenních hub se liší v závislosti na druhu a infekčním stavu patogena. Konidie druhu *B. bassiana* jsou stabilní a mohou být skladované při pokojové teplotě. Blastospory *Lecanillicium muscarium* musí být skladovány v suchu a chladu a jsou i po několik měsíců životaschopné (Bartlett, Jaronski 1988).

2.9 Bezpečnost entomopatogenních hub

Většina hub, které jsou součástí komerčních biopreparátů, nevykazují žádné negativní účinky proti necílovým organismům a člověku. Je mnoho studií, které testovali entomopatogenní houby na myších, potkanech, králicích nebo morčatech a žádné vedlejší efekty nebyly prokázány (McCoy, Heimpel 1980; Brunner-Mendoza *et al.*, 2017).

Některé druhy hub však mohou způsobovat alergické reakce nebo být oportunním patogenem u lidí a u savců. Druhy vyvolávající patogenitu, patří do rodu *Conidiobolus* (*Entomophthora coronata*) z čeledi Enthomophtorales a tyto druhy mohou u citlivých jedinců vyvolat závažné chronické znetvoření obličeje (Sue *et al.,* 1992). Některé druhy hub produkují tzv. sekundární metabolity, které mohou představovat potencionální riziko. Řada sekundárních metabolitů jako jsou destruxin, efrapeptin, oosporein, beuvericin a beauveriolides byly popsány u druhů hub náležejících do rodů *Beauveria, Metarhizium* a dalších. Strasser *et al.,* (2000) sestavili přehled těchto skupin metabolitů a jejich vlastností a zjistili, že vliv na necílové bezobratlé organismy prostřednictvím vnějšího kontaktu se sporami byl menší než 10 %. Vyšší mortalita způsobená entomopatogenními houbami u necílových organismů může být způsobena, pokud jsou spory hub přímo pozřeny. Např. některé larvy dravého slunéčka *Cryptolaemus montrouzieri* po pozření spor *B. bassina* uhynuly. Mortalita byla 50 %. Testování hub na dospělcích slunéčka sedmitečného (*Coccinella septempunctata*) neprokázalo žádný negativní vliv (Flexner *et al.,* 1986). Naopak po pozření spor *H. thompsoni* včelími dělnicemi byla mortalita v populaci 29 %. Podgwaite (1986) zaznamenal při polní aplikaci hub *B. bassiana* a *M. anisoplae* úhyny chovů bource morušového a včel. Bylo prokázáno, že granulovaná, myceliální forma hub je pro necílové organismy relativně bezpečná (Driesche *et al.,* 2008).

2.10 Epizootie

Epizootie neboli hromadná nákaza způsobená patogenem nastává v populaci hostitelského organismu ve vhodných stanovištích a podmínkách. Přítomnost infekčního stádia patogena způsobující epizootii je nedostatečná v případě chybějících vhodných přírodních podmínek. Šíření daného patogena závisí na mechanismu vylučování hostitelem. Větrosnubné houbové konidie se šíří snadněji než virus nebo bakterie vylučované nežádoucím způsobem z hostitelova mrtvého těla ve formě kapének. Infekční stav patogena je silně ovlivněn stavem

fyzikálních faktorů, jako jsou ultrafialové záření, vysoká teplota a nedostatečná vlhkost. Velmi vhodné podmínky pro přežití patogena jsou např. v půdě nebo pod kůrou stromů, kam se hostitel snadno dostane (Hurst, Jiggins 2000). Entomopatogenní houby z čeledi *Enthomophtorales* mají často úzký hostitelský okruh v porovnání s houbami z čeledi *Hyphomycetes*, které jsou známými původci epizootií u mšic (Nielsen *et al.*, 2007).

2.11 Faktory ovlivňující účinnost entomopatogenních hub

Vnější prostředí představuje soubor všech biotických a abiotických faktorů, včetně člověka, který svou činností ovlivňuje prostředí a tím účinnost entomopatogenních hub v populacích hmyzu. Mezi zásadní faktory, které ovlivňují účinnost patogena patří teplota, vlhkost, sucho, světlo, půdní vlastnosti, interakce patogen a hostitel a další (Benz 1987).

Teplota může přímo ovlivňovat jak patogena tak i hostitele, může mít vliv na jejich chování, růst a pohyb. Teplota ovlivňuje i příjem potravy hostitele. Výhodou entomopatogenních hub je, že mohou hostitele napadat přes kutikulu, a nejen přes přirozené otvory. Pro houby, které do hostitele vstupují přes kutikulu, může nastat infekce i v případě nízké teploty, kdy má hostitel dostatečný příjem potravy. Vlhkostní podmínky jsou důležité zejména pro vývoj hub. Optimální vlhkost zlepšuje klíčivost konidií a vytváření nových konidií na mrtvém těle hostitele. Vysoká vlhkost a půdní vláha rovněž podporuje epizootii nematod. Bakteriální a virové onemocnění a jejich vývoj je méně náchylný na vnější faktory (Inglis *et al.*, 2001). Sucho patří mezi další limitující faktory, které ovlivňují účinnost různých entomopatogenních mikroorganismů jako jsou nematody, bakterie, viry a houby. Některé patogeny se dokáží na sucho adaptovat např. okluzí bakulovirů, dormancí spor bakterií a hub a dormancí vajíček mladých nematod (Benz 1987). Proti slunečnému záření jsou konidie hub chráněné světlo absorbujícími pigmenty. Půdní prostředí je vhodné místo pro dormantní stádia patogenů díky optimálním vlhkostním podmínkám a nízkému působení slunečního záření. Patogeny dále ovlivňuje půdní pH a organické složení půdy. Velmi negativně na přítomnost patogenů působí zemědělsky využívané půdy (Drische *et al.*, 2008).

2.11.1 Biotické faktory

Vlivy na rozvoj houbové infekce u hostitele mají patogenita, virulence, produkce toxinů, životní cyklus hostitele i entomopatogenní houby, distribuce a abundance patogena. Patogenita (schopnost patogena vyvolat onemocnění konkrétního druhu hostitele) a virulence (vlastnost individuální, udává stupeň patogenity určitého kmene patogena) patogena ovlivňuje jeho genotyp. Patogenita je schopnost patogena způsobit onemocnění a je determinována několika faktory, které zahrnují fyziologii hostitele, jako jsou např. obranné mechanismy, hustota populace, věk, výživa, genetika, chemické či mechanické poranění a stres (vystresovaní hostitelé jsou více náchylní k entomopatogenním mikroorganismům).

U patogena mají vliv na patogenitu enzymy, toxiny, prostředí a množství infekčního inokula. Porozumění biologii a fyziologii hostitele a patogena je nezbytné pro následné využití v biologické ochraně rostlin (Inglis *et al.,* 2001). Kmeny různých druhů entomopatogenních hub se mohou také lišit ve virulenci k hostiteli a najít vysoce virulentní kmen houby je pro další jeho využití zásadní (Tanada, Kaya 1993). Velmi důležitá je také koncentrace propagulí patogena, které budou účinně eliminovat hostitelskou populaci. V polním prostředí musí být hustota patogena dostatečně vysoká, aby bylo zajištěno, že hostitel přijde do styku s odpovídajícím množstvím infekčních propagulí patogena. U vysoce virulentního kmene patogena stačí méně propagulí k navození onemocnění. Existuje mnoho studií, které se zaměřili na kvantifikaci virulence entomopatogenních hub z řádu *Hyphomycetes*. Virulence patogenního kmene je obvykle vyjádřena jako střední letální dávka zkratkou LD50. Tato hodnota vyjadřuje virulenci v laboratorních podmínkách, ale několik studií se pokusilo simulovat faktory prostředí, které by mohli negativně ovlivnit účinnost hub. Je snaha vybrat genotyp houby, který je schopný vyvolat onemocnění i v nepříznivých podmínkách a dalším kritériem je stálost infekčních propagul patogena v prostředí, kdy poté dojde snáze ke kontaktu s hostitelem (Inglis *et al.,* 2001).

Dalším hostitelským faktorem, který hraje důležitou roli v úspěšnosti entomopatogenmích hub je vývojové stádium hmyzu. Vývojová stádia hmyzu se v náchylnosti k infekci vyvolané houbami liší. V některých případech je stádium kukly citlivější k infekci než dospělý hmyz a naopak. Například mladé larvy zavíječe kukuřičného (*Ostrinia nubilalis*) jsou více náchylné k infekci *B. bassiana* než starší larvy (Feng *et al.,* 1985). Na vývojová stádia hmyzu mají významný vliv faktory prostředí zejména teplota. Vysoké teploty urychlují vývoj hmyzu a zkracují dobu kuklení, což může následně snížit riziko infekce v důsledku ztráty

inokula. Hustota hmyzí populace je také důležitá pro vznik infekce. Čím vyšší hustota populace hmyzu tím vyšší pravděpodobnost infekce hmyzu patogenem (Steinhaus 1975).

2.11.2 Abiotické faktory

Bylo prokázáno, že na účinnost entomopatogenních hub se významně podílí faktory prostředí jako je teplota, vlhkost a sluneční záření (Inglis *et al.,* 2001). Mnoho druhů entomopatogenních hub je schopno se adaptovat i v extrémních podmínkách prostředí. Dokáží se vyrovnávat s vysokými teplotami prostředí, vysokou vlhkostí nebo stresem způsobeným suchem (Daoust, Roberts 1983). Existuje mnoho studií, které prokázaly dlouholetou perzistenci hub v půdě po aplikaci konidií na povrch půdy nebo vpravením do půdy. Např. houba *M. anisopliae* v půdě přetrvala i po 7. letech od aplikace (Storey *et al.,* 1989; Inglis *et al.,* 1997)

2.11.2.1 Teplota

Teplota je jedním z hlavních abiotických faktorů, které mohou ovlivňovat účinnost entomopatogenních hub. Pro patogena může být příležitost infikovat svého hostitele velmi krátká, protože úspěch infekce závisí dále na optimálních podmínkách vlhkosti a slunečného záření. Je prokázáno, že okolní teplota může ovlivňovat rychlost infekce, klíčení konidií, sporulaci na hostiteli a následné šíření houby. Například optimální teplota pro houbu *M. anisopliae* infikující dospělce třásněnek je 23 °C (Vestergaard *et al.,* 1995). Snížením teploty o 3 až 5 °C se účinnost houby snižuje. Optimální teplota je pro většinu entomopatogenních hub mezi 20 až 25 °C, nicméně infekce může nastat i v rozmezí mezi 15 až 30 °C. Při teplotách nad 30 °C je inhibován růst většiny taxonů entomopatogenních hub a obvykle ustává přibližně při 37 °C (Inglis *et al,* 2001).

2.11.2.2 Relativní vlhkost

Relativní vlhkost může ovlivnit účinnost hub v několika směrech. Vlhkost v kombinaci s teplotou ovlivňuje evaporaci kapek ve formě aerosolu, které dokáží způsobit ztrátu malých částic a tudíž, nepříznivě ovlivňují účinnost hub. Vlhkost může také značně ovlivňovat stálost v prostředí houbového inokula. Konidie obvykle vykazují největší stabilitu v chladných a suchých podmínkách (Daoust, Roberts 1983; Hedgecock *et al.,* 1995; Hong *et al.,* 1997).

Konidie *B. bassiana*, *M. anisopliae* a *I. farinosa* začínají klíčit při vodní aktivitě nad 0,935 za přítomnosti vnějších podnětů, zatímco myceliální růst je pozastaven při vodní aktivitě pod 0,98, úplný útlum nastává při hodnotě 0,90. Konidie houby *M. anisopliae* jsou schopny lépe přežívat v průměrných teplotách při vysoké relativní vlhkosti (Daoust, Roberts 1983). Voda samotná reguluje průběh sporulace na mrtvém hostiteli, ale pro klíčení konidií není nezbytná. Pro optimální průběh sporulace na hostiteli je důležitá vysoká vlhkost prostředí. Fargues a luz (2000), zjistili, že pro sporulaci *B. bassiana* na mrtvém těle *Rhodnius prolixus* z čeledi zákeřnicovití (*Reduviidae*) je vyžadována relativní vzdušná vlhkost 97 %. Vysoká relativní vlhkost je předpokladem pro optimální průběh sporulace. Některé druhy entomopatogenních hub např. *B. bassiana* mohou formovat konidie uvnitř uhynulého těla i v podmínkách nízké vlhkosti (Fernades *et al.,* 2007). Znalosti podmínek relativní vzdušné vlhkosti jsou pro efektivní využití hub v biologické ochraně rostlin nezbytné (Inglis *et al.,* 2001).

2.11.2.3 Sluneční záření

Velmi citlivé na poškození slunečním zářením jsou konidie a hyfy všech taxonů. U všech entomopatogenních hub může dojít ke škodlivým změnám, zejména podílem ultrafialových paprsků UV spektra od 285 do 400 nm. UV záření je méně škodlivé než záření viditelné a infračervené (Fargues *et al*., 1997). K degradaci spor může dojít vlivem slunečního záření velmi rychle, a to už během několika hodin po aplikaci biopreparátů (Butt *et al.,* 1999). Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub obsahují účinné agens, nutriční složku a inertní složku, která tvoří zejména různá ochranná aditiva (např. UV protektanty, antioxidanty) a přísady zvyšující přilínavost spor na povrch rostlin. Nutritivní složka poskytuje výživu propaguli po jejím zavedení do prostředí (Butt *et al.,* 1999; Wraight, Carruthers 1999).

2.11.2.4 Srážky

V případě navýšení relativní vzdušné vlhkosti mohou srážky pomoci uvolnit a rozptýlit konidie ze substrátu do prostředí. Vliv srážek na disperzi patogenů byl rozsáhle studován u entomopatogenních virů konkrétně *Bacillus thuringiensis*. Problematika srážek u hub není ještě dostatečně vysvětlena. Ale existují studie, kde bylo prokázáno, že déšť nesmyje konidie z povrchu kutikuly hmyzu ve velkém množství. Nicméně déšť může způsobit smytí konidií *B. bassiana* a *M. anisopliae* z listů jednoděložných a dvouděložných rostlin (Inyang *et al.,* 2000).

2.11.2.5 Půda

Půda je velmi složité prostředí, ve kterém působí na houby spousta faktorů. Patří sem půdní typ (textura, kationty, obsah organických látek, pH), vlhkost a půdní mikroflóra (Inglis *et al.,* 2001). Půdní textura a organická hmota patří mezi nejdůležitější faktory determinující vertikální pohyb houbových propagulí ve vodě a půda s písčitou texturou a nízkým zastoupením organické hmoty měly tendenci zadržovat méně propagulí než jílovité a organické půdy (Storey, Gardner 1988; Keller, Zimmermann 1989. Např. Storey a Gardner (1988) zjistili, že vertikální pohyb konidií *B. bassiana* koreloval s hodnotou filtrace vody v půdách. Největší ztráty inokula se vyskytovaly v písčitých půdách, kde bylo obsaženo 87 % písku a více než 85 % konidií aplikovaných do půdy zůstávala na povrchu. Mechanismy zodpovědné za udržení konidií v půdě nejsou dosud příliš známé. Vertikální pohyb hub není závislý pouze na typu půdy, ale také na vlastnostech propagulí samotných. Konidie *B. brongniartii* jsou relativně velké, přibližně 8 μm na délku a jsou méně náchylné k vertikálnímu posunutí.

3. CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem bakalářské práce je hodnotit a porovnat "*in vitro*" parametry (klíčivost, radiální růst a produkce spor) vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana*. Cíle bakalářské práce jsou shrnuty v následujících třech bodech.

1. Vliv teploty na klíčivost vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana*.

2. Porovnání růstu a vývoje s využitím standardního laboratorního postupu umožňující parametrizaci vybraných kmenů houby *B. bassiana* v oblasti "*in vitro*" (radiální růst).

3. Porovnání výtěžnosti spor vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na standardním živném médiu a přirozeném substrátu

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1 Kmeny entomopatogenní houby *B. bassiana*

V experimentech byly použity 4 kmeny entomopatogenní houby *B. bassiana* z různých geografických oblastí, a to z České republiky, Izraele, Spojených států amerických a Argentiny (popis kmenů je níže). Všechny kmeny jsou uloženy ve formě alginátových pelet a uchovány v -20 °C na Katedře genetiky a speciální produkce rostlinné, Zemědělské fakulty, Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Pro vlastní pokusy byly kmeny z alginátových pelet aktivovány a jako čisté kultury byly kultivovány na živné půdě PDA (Potato dextrose agar) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) a inkubovány při teplotě 25±1 °C.

CCM 8382 (ČR)

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

Izrael

Kmen označený jako Izrael byl odizolován v roce 2018 z půdního vzorku odebraného na lokalitě Sde Eliyahu v Izraeli na poli, kde se pěstoval česnek. Kmen byl odizolován pomocí selektivní živné půdy na bázi dodine.

USA

Kmen označený jako 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 provedena pomocí selektivní živné půdy na bázi dodine.

Argentina

Kmen označený jako 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.

4.2 Příprava suspenzí kmenů *B. bassiana*

Po 10 dnech byly plně vysporulované kultury kmenů *B. bassiana* použity v experimentech. Ze středových kultur kmenů *B. bassiana* byly vytvořeny suspenze, které byly získány vymytím 0,05% roztokem Tween® 80 (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). Spory byly z povrchu uvolněny pomocí inokulační kličky. Suspenze byla následně přefiltrována přes sterilní bavlněnou gázu do Erlenmeyerovy baňky. Koncentrace konidií byla vyhodnocena v počítací Neubauerově komůrce a nejčastěji ředěna 1:10 v závislosti na hustotě spor daných kmenů hub. Titr spor byl adjustován na koncentraci 1,00 x 10^7 spor v 1 ml. Tato koncentrace byla použita u všech experimentů v této práci.

4.3 Standardní test klíčivosti

Klíčivostí spor se zjišťuje morfologický tvar a stav růstu houby za specifických podmínek. Klíčivost je hodnocena na základě standardního testu klíčivosti (GI) - growth index, který specifikuje vývoj patogena a stupeň naklíčení (Tabulka x) nebo procentem klíčivých a neklíčivých spor.

Tabulka x: Hodnotící indexová stupnice (GI) pro kmeny entomopatogenních hub

0,0	Konidie jsou oválného tvaru bez viditelné morfologické změny
0,5	Konidie začínají vytvářet primární klíček, který je viditelný
1,0	Konidie má shodnou velikost s klíčkem v poměru 1:1
1,5	Klíček je ze 2/3 větší než konidie a mohou být patrné primární klíčky
2,0	Konidie má oboustranně narostlé mycelium
2,5	Konidie s narostlým myceliem obsahuje konidiofory s konidiemi od 1 do 4
3,0	Konidie tvoří plnou sporulaci a produkují velké množství konidií nad 5 a více

Test klíčivosti spočíval nanesením 2% agaru (Dr. Kulich Pharma s.r.o., Hradec Králové) na mikroskopické podložní sklíčko. Konidiální suspenze kmenů *B. bassiana* byla nanesena na 2% agar inokulační kličkou v množství 1µl. Následně bylo mikroskopické podložní sklíčko přeneseno do Petriho misky (ø 90 mm) s navlhčeným filtračním papírem, kvůli zajištění dostatečných vlhkostních podmínek. Petriho misky byly vloženy do termostatu při různých

teplotách (10, 15, 20, 25 a 30±1 °C). Index klíčivosti kmenů *B. bassiana* byl vyhodnocen po 24 h a 48 h inkubace pomocí světelného mikroskopu. Hodnoceno bylo minimálně 100 spor z náhodně vybraných zorných polí. Ke každé konidii byl přiřazen příslušný index GI a z vyhodnocených vzorků bylo vypočteno procento klíčivosti.

4.4 Radiální růst na umělém živném médiu (PDA)

Radiálním růstem se zjišťuje schopnost růstu vláknitých hub během kultivace za stanovených podmínek. Doprostřed Petriho misky (ø 90 mm) byla nanesena pomocí inokulační kličky kapka (1 µl) suspenze každého kmene *B. bassiana*. Petriho misky byly se zaschlou suspenzí vloženy do plastových obalů a následně do termostatu, kde byly inkubovány v různých teplotních podmínkách (10, 15, 20, 25 a 30±1 °C). Kmeny byly inkubovány po dobu 3 týdnů. Hodnocení radiálního růstu jednotlivých kmenů probíhalo na základě měření dvou na sebe kolmých průměrů středové kultury. Ze zjištěných rozměrů byla vypočítána plocha kultury. Průměr kultur byl měřen po 7., 14. a 21. dnech od založení kultury. Bylo provedeno 8 opakování pro každý testovaný kmen *B. bassiana.*

4.5 Výtěžnost spor na umělém živném médiu (PDA)

Výtěžnost spor je důležitým parametrem variability produkce spor jednotlivých kmenů rodu *B. bassiana*. Po ukončení experimentu radiálního růstu byly po 21. dnech celé středové kultury vyříznuty a vloženy společně s detergentem a destilovanou vodou do mixéru a homogenizovány. Výtěžnost konidií byla spočítána pomocí počítací Neubauerovi komůrky. Výtěžnost byla stanovena ze dvou opakování u každého testovaného kmene. Poté byla ze získaných číselných údajů vypočítána výtěžnost z jedné středové kultury a následně byla stanovena produkce spor na 1 mm^2 kultury.

4.6 Výtěžnost spor na přirozených substrátech

Výtěžnost spor jednotlivých kmenů *B. bassiana* byla testována i na přirozených substrátech, a to ječných kroupách. Bylo naváženo 50 g ječných krup do 250 ml Erlenmeyerovy baňky. Po navážení byly Erlenmeyerovy baňky s kroupami sterilizovány v autoklávu při 121

°C po dobu 90 minut. Inokulace krup kmeny *B. bassiana* byla provedena po jejich vychladnutí v objemu suspenze 12,5 ml. Po inokulaci byly ječné kroupy v Erlenmayerových baňkách několikrát protřepány, aby došlo k rovnoměrnému nasáknutí suspenze do jednotlivých krup. Po plném nasáknutí suspenze byly kroupy převedeny do jednorázových plastových krabiček a inkubovány při teplotě 25±1 °C. Po 14 dnech byly konidie z obrostlých krup vymyty pomocí adekvátního 0,05 % roztoku Tween 80 a pomocí Neubauerovy počítací komůrky byl stanoven počet spor na 1 ml. Celková produkce konidií jednotlivých kmenů byla zjištěna opět tak, že koncentrace na 1 ml byla vynásobena množstvím vzniklé suspenze po vymytí konidií a následně přepočítána na 1 g přirozeného substrátu. Produkce konidií různých kmenů *B. bassiana* byla navzájem porovnávána. Pro každý kmen byla připravena pouze 1 varianta.

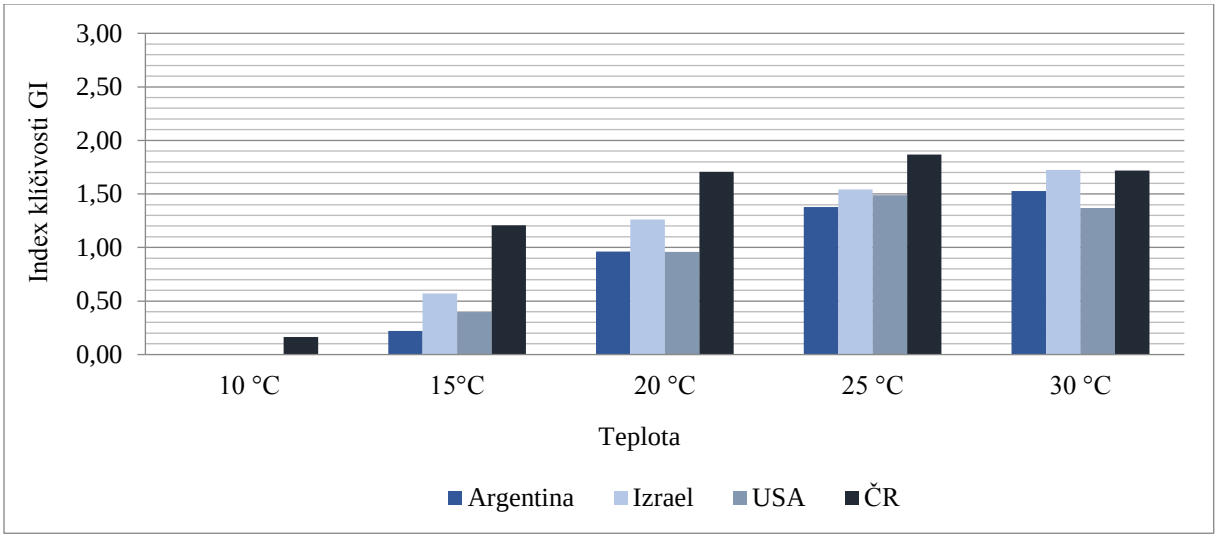
4.7 Statistické vyhodnocení dat

Data radiálního růstu nebyla normalizována. Data produkce spor stanovených ze středových kultur byla normalizovány za využití logaritmické transformace log10 (x + 1). Následně byla data radiálního růstu a výtěžnosti spor na živném médiu PDA podrobeny analýze rozptylu (ANOVA) pomocí softwaru pro statistickou analýzu (StatSoft Inc. 2007). Rozdíly mezi středními hodnotami byly porovnány pomocí Post hoc Tukeyho testu ($P < 0,05$).

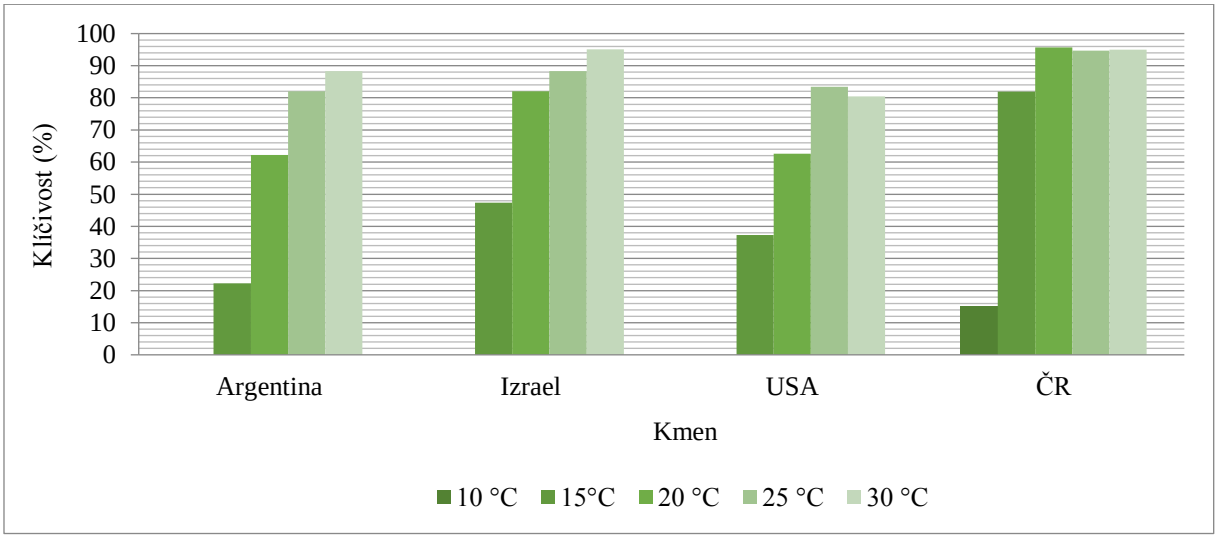
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

5.1 Vliv teploty na klíčivost spor jednotlivých kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana*

Graf 1: Vliv teploty na klíčivost spor (GI) jednotlivých kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* po 24 hodinách



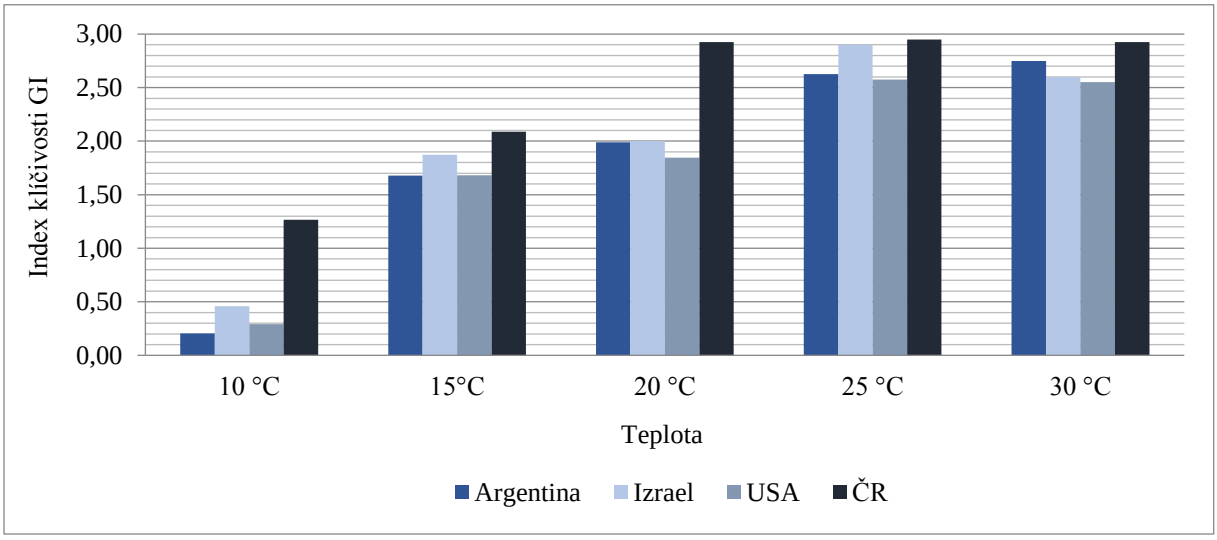
Graf 2: Vliv teploty na růst a vývoj spor (%) jednotlivých kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* po 24 hodinách



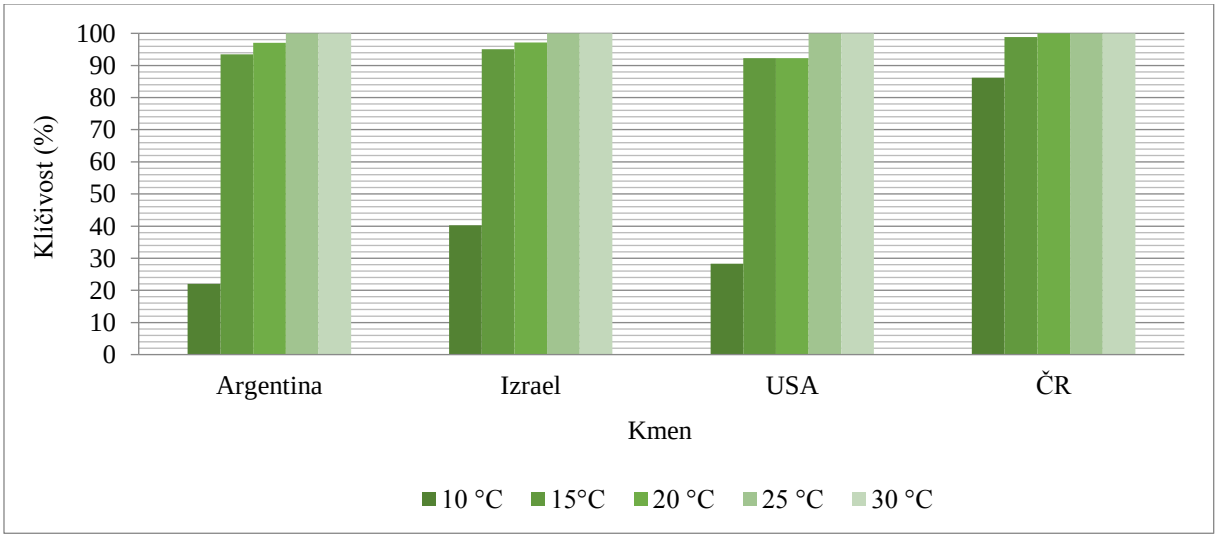
Teplota 10 °C byla po 24 h pro klíčivost spor kmenů *B. bassiana* nejméně vhodná. Při této teplotě byl schopný klíčit pouze kmen ČR. Index klíčivosti byl 0,16 a procento klíčovosti spor 15 %. Ostatní kmeny vykazovaly nulovou klíčivost. U kmene ČR byla pozorována nejlepší

klíčivost spor ve všech teplotách ve srovnání s ostatními kmeny *B. bassiana*. Teplomilné kmeny *B. bassiana* odizolované z Argentiny a Izraele nejlépe klíčily při 30 °C, index klíčivosti byl 1,53 (88,32 %), respektive 1,73 (95,05 %). Kmeny odizolované z chladnějších oblastí USA (GI=1,49) a ČR (GI=1,87) naopak prospívaly ve 25 °C. Nejoptimálnější teploty pro klíčení spor byly po 24 h pro všechny kmeny v rozmezí mezi 25 a 30 °C.

Graf 3: Vliv teploty na klíčivost spor (GI) jednotlivých kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* po 48 hodinách



Graf 4: Vliv teploty na růst a vývoj spor (%) jednotlivých kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* po 48 hodinách



Po 48 h začaly spory kmenů *B. bassiana* klíčit i v 10 °C. Nejvyšší index klíčovosti vykazoval kmen ČR (GI=1,26). Ostatní kmeny měly index klíčovosti v rozmezí 0,20 (kmen

Argentina) až 0,46 (kmen Izrael). V ostatních teplotních podmínkách byla po 48 h pozorována velmi vysoká klíčovost spor kmenů *B. bassiana*. Nejoptimálnější teploty byly pro kmeny *B. bassiana* opět mezi 25 a 30 °C, kdy byla pozorována 100% líčivost spor v těchto teplotách a tvořily se již sporulační struktury houby.

Závěr

Nejoptimálnější teploty byly pro klíčivost spor kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* 25 a 30 °C. Po dvou dnech hodnocení byly pozorovány sporulační struktury kmenů. Nejméně optimální teplota pro klíčivost hub byla 10 °C. Kmen ČR vykazoval ve všech teplotách nejvyšší klíčivost ve srovnání s ostatními kmeny.

5.2 Radiální růst kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana*

Radiální růst vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* byl měřen 7., 14. a 21. den kultivace v různých teplotních podmínkách. Je patrné, že kmeny rostly nejpomaleji v 10 °C. Takto nízká teplota není vhodná pro růst a vývoj kmenů ve srovnání s ostatními teplotami. Nicméně je zde prokázáno, že i při takto nízké teplotě jsou kmeny schopné růstu, což může hrát významnou roli, zejména pak u kmene ČR odizolovaného v NP Šumava, v přirozených podmínkách jeho výskytu. V NP Šumava se průměrná teplota pohybuje mezi 4 a 6 °C podle nadmořské výšky. Kmen ČR vykázal také výraznou adaptaci na nižší teploty 15 °C a 20 °C ve srovnání s ostatními kmeny odizolovanými na jiných kontinentech. Při 25 a 30 °C se prokázalo, že kmeny odizolované v Izraeli, USA a Argentině, jsou adaptovanější na vyšší teploty. Nejlepší růstové parametry vykázal kmen USA odizolovaný na Floridě a jako druhý v pořadí je kmen Izrael z oblasti Sde Eliyahu. Kmen Argentina odizolovaný na pozemku University of Buenos Aires vykázal daleko lepší růstové vlastnosti při kultivaci ve 30 °C i přesto, že tato oblast není nejteplejší ve srovnání s kmeny USA a Izrael. Tedy nejoptimálnější teploty pro růst kmenů USA, Izrael a Argentina entomopatogenní houby *B. bassiana* jsou 25 a 30 °C. Naopak pro kmen ČR je optimální teplota pro růst a vývoj 20 °C. Všechna data byla podrobena celkové analýze: ANOVA pro opakovaná měření. Na rychlost radiálního růstu měl vliv kmen ($F=1181,0$; $df=3,140$; $p=0,0000$), teplota ($F=37933,0$; $df=4,140$; $p=0,0000$) a doba kultivace ($F=79872,0$; $df=2,280$; $p=0,0000$). Dále měly vliv na rychlost kolonizace interakce: kmen*teplota ($F=1878,0$; $df=12,140$; $p=0,0000$), čas*kmen ($F=81,0$; $df=6,280$; $p=0,0000$), čas*teplota ($F=173,0$; $df=8,280$; $p=0,0000$) a čas*kmen*teplota ($F=132,0$; $df=24,280$; $p=0,0000$).

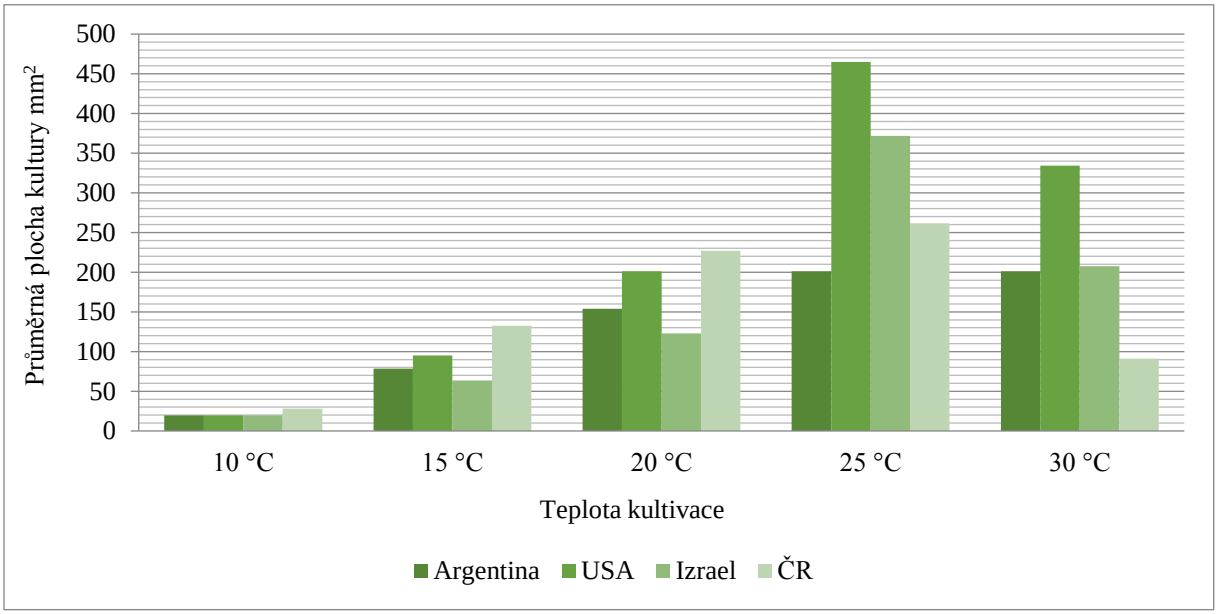
Tabulka 2: Vliv teploty na plochu (mm^2) kultur různých kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana*

Teplota	Kmen	7. den		14. den		21. den	
		Prům.±STDV	Tukey HSD	Prům.±STDV	Tukey HSD	Prům.±STDV	Tukey HSD
10 °C	Argentina	19,63±0,00	m	38,48±0,00	l	108,58±8,36	n
	Izrael	19,63±0,00	m	71,08±7,98	k	154,72±23,51	m
	USA	19,63±0,00	m	38,48±0,00	l	71,08±7,98	o
	ČR	28,27±0,00	l	132,73±0,00	j	354,80±15,63	l
15 °C	Argentina	78,54±0,00	j	283,53±0,00	h	572,55±0,00	k
	Izrael	63,62±0,00	k	230,42±9,72	i	536,13±14,72	k
	USA	95,03±0,00	i	505,89±20,73	fg	1126,75±20,83	h
	ČR	132,73±0,00	h	541,73±36,27	f	1444,84±83,68	g
20 °C	Argentina	153,94±0,00	g	490,87±0,00	g	1003,93±25,81	i
	Izrael	122,91±10,50	h	531,32±30,88	fg	1626,56±66,17	f
	USA	201,06±0,00	ef	875,03±27,23	e	2053,32±66,91	e
	ČR	226,98±0,00	e	1018,27±42,75	d	2073,35±59,77	e
25 °C	Argentina	201,06±0,00	f	829,97±39,04	e	1707,55±37,80	f
	Izrael	371,69±15,63	b	1916,66±132,57	b	4626,97±107,15	b
	USA	464,76±75,14	a	2734,17±49,54	a	5217,00±68,43	a
	ČR	261,73±13,45	d	836,35±38,40	e	1626,17±38,20	f
30 °C	Argentina	201,06±0,00	f	1032,21±26,54	d	2815,94±60,29	d
	Izrael	207,74±17,93	ef	1104,66±31,49	d	2804,07±43,26	d
	USA	334,28±16,67	c	1256,64±0,00	c	3267,65±54,16	c
	ČR	90,91±7,63	i	291,58±26,52	h	643,73±23,17	j

Radiální růst všech testovaných kmenů byl po 7. dnech inkubace významně statisticky průkazný (F=336,0; df=3,140; p=0,0000). Nejmenší plochy kultur byly u všech kmenů houby *B. bassiana* zaznamenány při 10 °C. Tři kmeny (Argentina, USA a Izrael) vytvořily plochu o rozměru 19,63 mm^2, zatímco kmen ČR vytvořil kulturu o ploše 28,27 mm^2. Nejrychleji rostly kmeny v teplotě 25 °C. Největší kolonie vykazoval kmen ČR (464,76 mm^2) a nejmenší kolonie vytvořil americký kmen (201,06 mm^2). Ve 30 °C vytvořil nejmenší kulturu kmen z ČR (90,91

mm^2) a největší plochu vytvořil kmen z USA (334,28 mm^2). Naopak, ve 20 °C byly plochy kultur obou kmenů téměř vyrovnané. Z výsledků po 7. dnech kultivace vyplývá, že teplota má statisticky průkazný vliv na růst kultur vybraných kmenů *B. bassiana* (F=10870,00; df=4,140; p=0,0000). Interakce mezi kmenem a teplotou prokazuje též statisticky významné rozdíly (F=328,00; df=12,140; p=0,0000).

Graf 5: Porovnání plochy kultury vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* po 7. dnech kultivace v různých teplotách

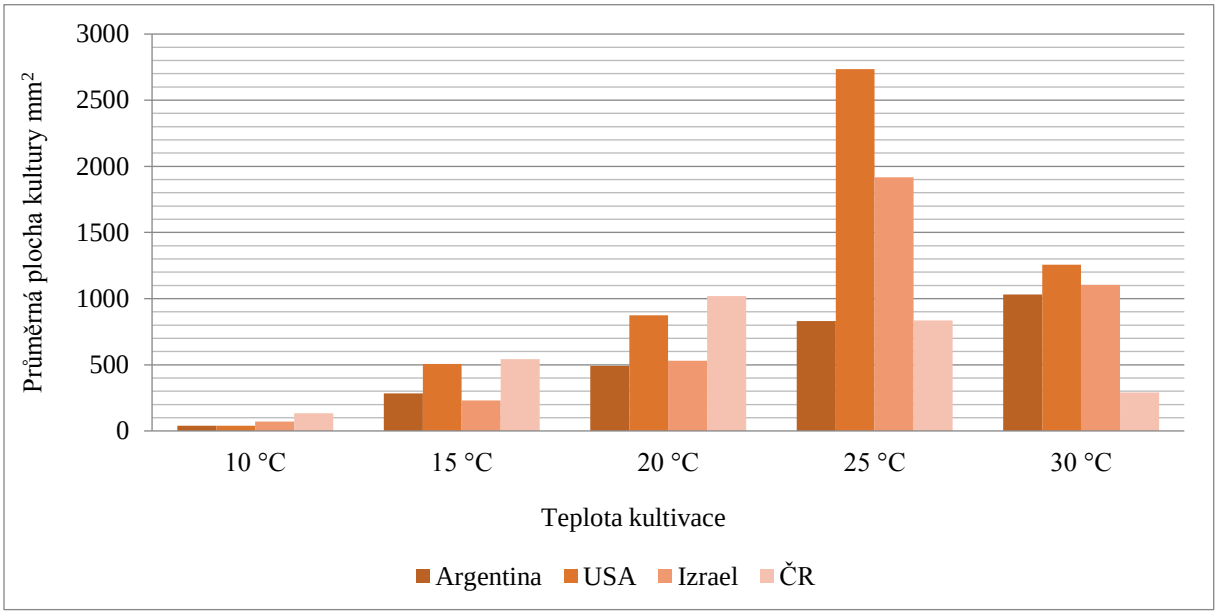


Po 14. dnech hodnocení vytvářely kmeny opět nejmenší plochy kultury v 10 °C. Při 20 °C byl zaznamenán rozdíl ve velikosti kultury, nicméně trend byl zachovaný. Největší kultury vytvářel kmen USA a kmen ČR. Ve 25 °C naopak kmen z ČR vytvořil daleko menší plochu kultury než ve 20 °C. Kmen z Izraele výrazně zvětšil plochu kultury ve srovnání s výsledkem z 20 °C. Ve 30 °C byly kmeny z jiných kontinentů vyrovnané ve srovnání s kmenem z ČR, který vykazoval daleko menší kulturu. Po 14. dnech kultivace vykazovaly kmen (F=761,00; df=3,140; p=0,0000) i teplota kultivace výrazné statistické rozdíly (F=20240,00; df=4,140; p=0,0000). Zároveň i vzájemná interakce mezi oběma faktory byla statisticky průkazná (F=1108,00; df=12,140; p=0,0000).

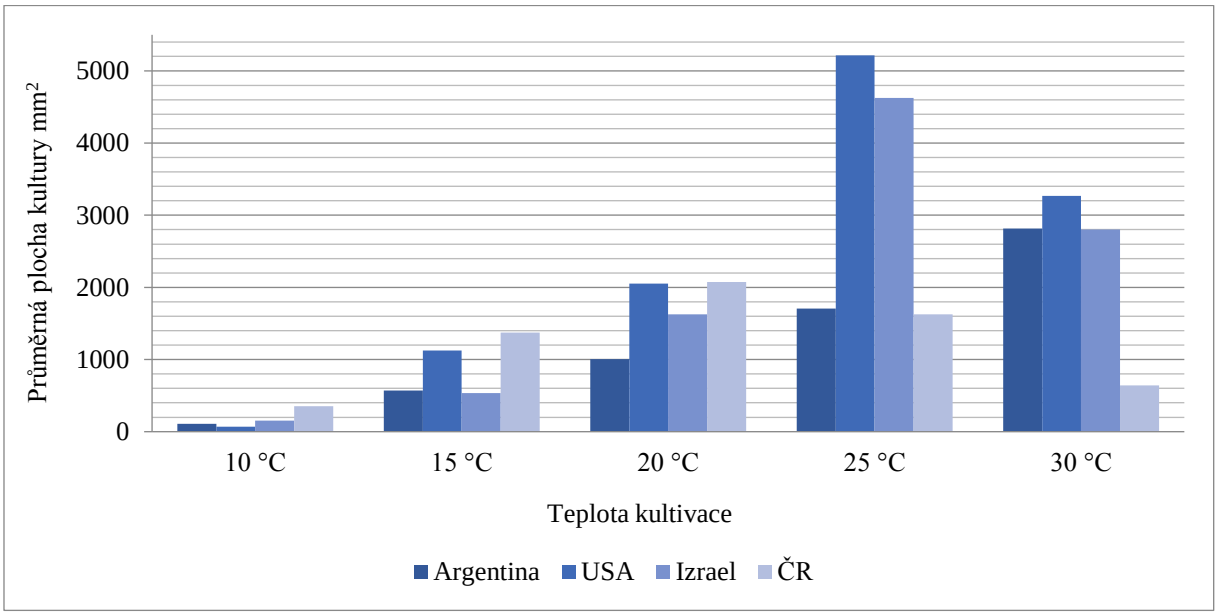
Rychlost kolonizace Petriho misek s různými kmeny byla i po 21. dnech významně statisticky průkazná (F=523,00; df=3,140; p=0,0000) i teplota hrála výraznou roli ve velikosti plochy kultury (F=15940,00; df=4,140; p=0,0000). Po 21. dnech inkubace byla největší plocha kmenů houby B. bassiana zaznamenána při teplotě kultivace 25 °C, a to zejména u kmene USA

a Izrael. Teplota 30 °C opět nebyla optimální pro kmen odizolovaný v ČR z kůrovce. Plocha kultury byla téměř 5x menší než u ostatních třech kmenů. Interakce mezi kmeny a teplotou byla významně statisticky průkazná (F=1143,00; df=12,140; p=0,0000).

Graf 6: Porovnání plochy kultury vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* po 14. dnech kultivace v různých teplotách



Graf 7: Porovnání plochy kultury vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* po 21. dnech kultivace v různých teplotách



Závěr

Z výsledků vyplývá, že u kmene Argentina byl zaznamenán lineární nárůst plochy kultury se stoupající teplotou, kdy optimální se prokázala teplota 30 °C. U kmene USA byla tendence stejná kromě teploty kultivace 30 °C, kde kmen vykázal daleko menší kulturu ve srovnání s teplotou 25 °C. U kmene Izrael se prokázal podobný trend ve srovnání s americkým kmenem. Pro oba tyto kmeny je optimální teplota pro růst a vývoj 25 °C. Naopak, u kmene ČR byla prokázána jako optimální teplota pro růst a vývoj 15 a 20 °C.

5.3 Výtěžnost spor kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na umělém médiu PDA

Tabulka 3: Vliv teploty na výtěžnost spor různých kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na 1 mm^2 kultury po 21. dnech kultivace

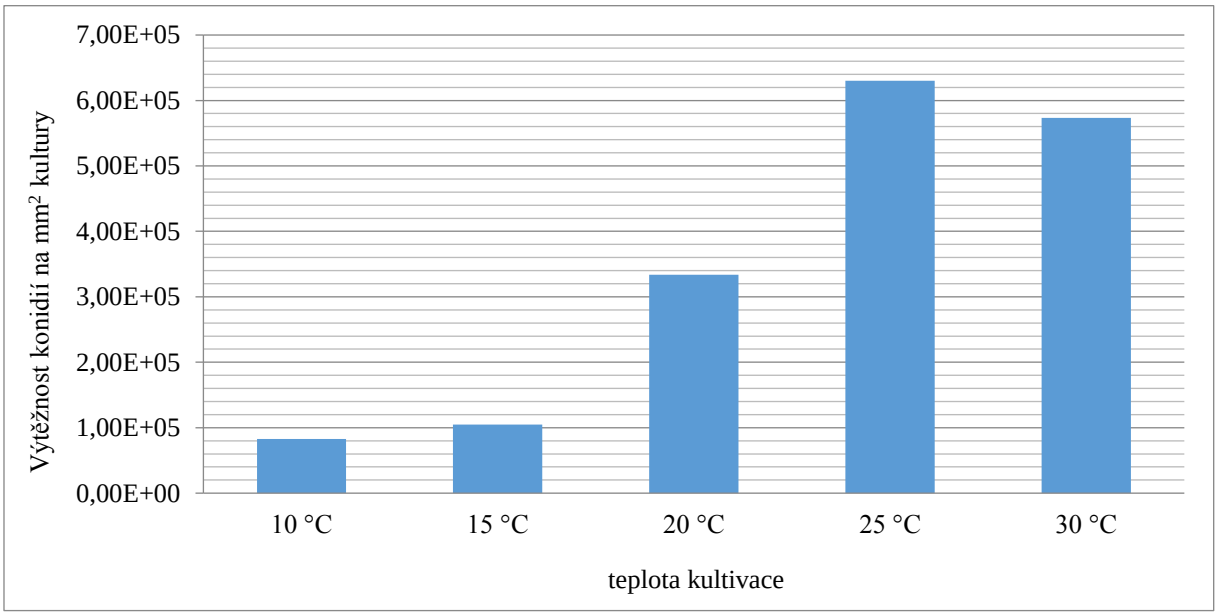
	Argentina		Izrael		USA		ČR	
10 °C	8,29±0,65 x10^4	Cc	7,27±0,69 x10^4	Ec	1,67±0,02 x10^6	Ba	4,45±0,04 x10^5	Eb
15 °C	1,05±0,00 x10^5	Cd	3,62±0,11 x10^6	Aa	1,26±0,03 x10^6	Cb	5,99±0,15 x10^5	Dc
20 °C	3,34±0,35 x10^5	Bd	1,17±0,03 x10^6	Bc	2,95±0,17 x10^6	Aa	2,07±0,14 x10^6	Cb
25 °C	6,31±0,46 x10^5	Ac	5,21±0,09 x10^5	Dc	1,44±0,02 x10^6	BCb	3,66±0,04 x10^6	Ba
30 °C	5,74±0,13 x10^5	Ab	7,47±0,13 x10^5	Cb	2,37±0,15 x10^5	Db	8,00±0,33 x10^6	Aa

*A.B.C: průměry ve sloupci se stejným velkým písmenem kmene jsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda. α=0.05; Tukey HSD test)
**a.b.c: Průměry v řádce se stejným malým písmenem kmene jsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda. α=0.05; Tukey HSD test)

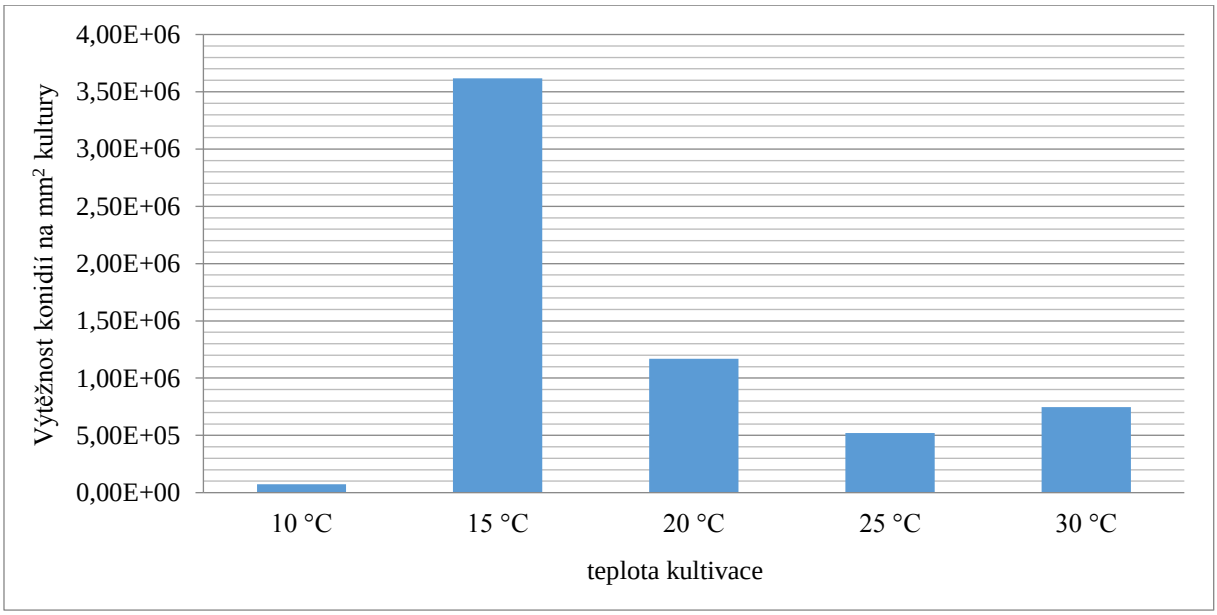
Kmen Argentina byl nejméně produktivní v 10 °C. Výtěžnost spor byla pouze 8,29x104 na mm2 kultury. Nejoptimálnější teplota pro produkci spor tohoto kmene byla 25 °C (6,31x105/1mm2 kultury). Kmen Argentina se v produkci spor na mm2 v různých teplotách významně statisticky lišil (F=183,18; df=4,5; p=0,0000). Pro kmen Izrael byla nejoptimálnější teplota pro produkci spor 15 °C na rozdíl od radiálního růstu, kde byla nejoptimálnější teplota 25 °C. Rozmezí produkce spor v různých teplotách bylo u kmene Izrael od 7,27x104 (10 °C) do 3,62x106 na mm2 kultury (15 °C). Kmen Izrael se od ostatních kmenů ve výtěžnosti spor významně statisticky odlišoval (F=1540,50; df=4,5; p<0,0000). Ostatní kmeny USA a ČR byly v produkci spor také významně statisticky odlišné (USA: F=295,82; df=4,5; p=0,0000, ČR: F=745,73; df=4,5; p<0,0000). Kmen USA byl nejvíce produktivní při teplotě 20 °C (2,95±0,17 x10^6/1mm^2 kultury) a nejméně při 30 °C (2,37±0,15 x10^5/1mm^2 kultury). Velmi vysokou výtěžnost spor vykazoval kmen USA i při 10 °C, produkce spor (1,67x10^6/1mm^2 kultury) byla nejvyšší v porovnání s ostatními kmeny při této teplotě. U kmene ČR se výtěžnost spor zvyšovala společně s teplotou. Při teplotě 30 °C dosáhl nejvyšší produkce spor ze všech

testovaných kmenů. Výtěžnost spor byla 8,00x10^6 na 1 mm^2 kultury. Kmeny ČR a USA patřily ve výtěžnosti spor v různých teplotách k nejproduktivnějším. Na produkci spor měly významný statistický vliv také teplotní podmínky (10 °C: F=6305,61; df=3,4; p<0,0000, 15 °C: F=1569,71; df=3,4; p=0,0000, 20 °C: F=201,09; df=3,4; p=0,0000, 25 °C: F=3765,48; df=3,4; p<0,0000 a 30 °C: F=1028,85; df=3,4; p=0,0000).

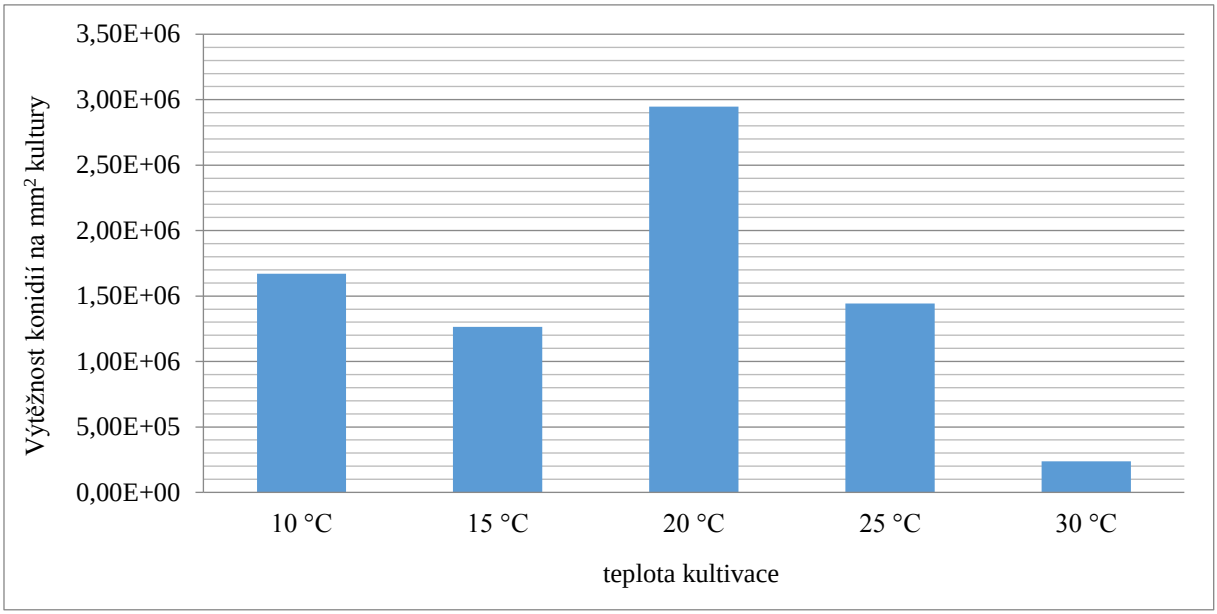
Graf 8: Vliv teploty na produkci spor kmene Argentina entomopatogenní houby *B. bassiana*



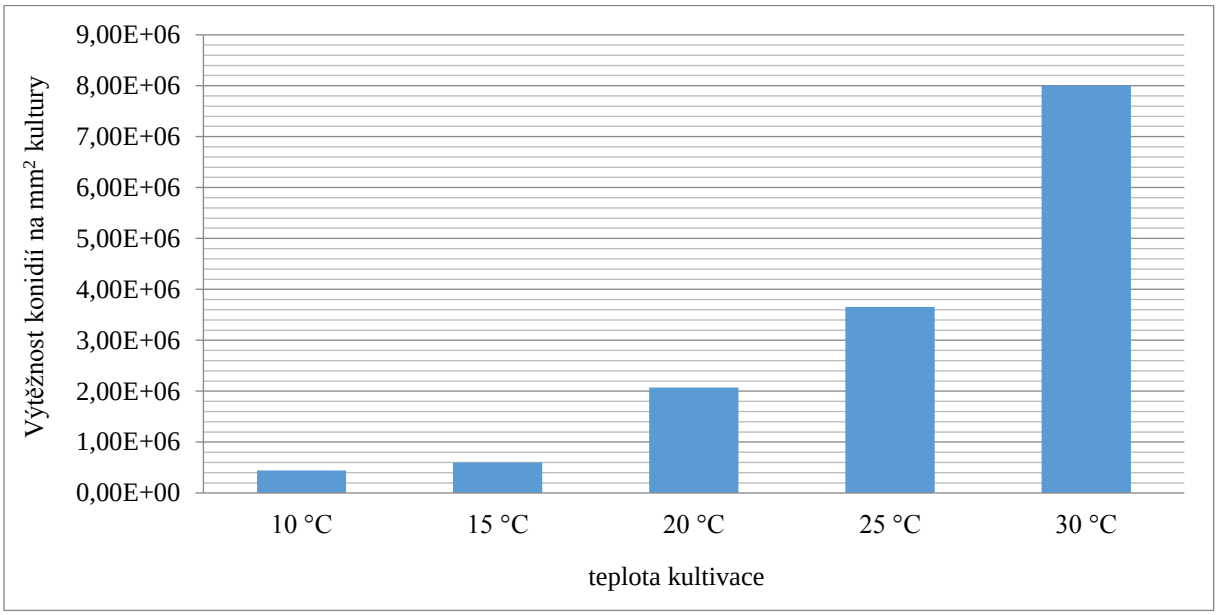
Graf 9: Vliv teploty na produkci spor kmene Izrael entomopatogenní houby *B. bassiana*



Graf 10: Vliv teploty na produkci spor kmene USA entomopatogenní houby *B. bassiana*



Graf 11: Vliv teploty na produkci spor kmene ČR entomopatogenní houby *B. bassiana*



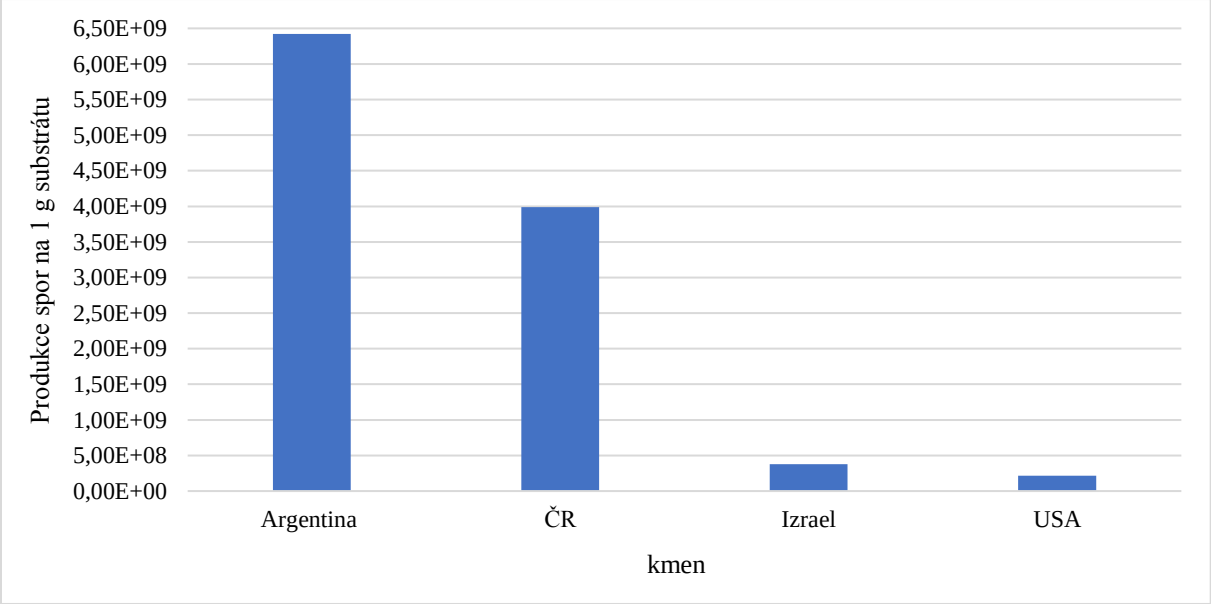
Závěr

Výsledky ukazují, že nejproduktivnějšími kmeny *B. bassiana* na umělém médiu PDA byly kmeny ČR a USA. Pro každý kmen byla nejoptimálnější teplota pro výtěžnost spor jiná. Kmen Argentina byl nejproduktivnější při teplotě 25 °C, kmen Izrael při 15 °C, kmen USA při 20 °C a kmen ČR při 30 °C. Optimální teploty pro radiální růst a výtěžnost spor nemusí být totožné, jak ukazují výsledky.

5.4 Výtěžnost spor kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na přirozeném substrátu

Kmeny entomopatogenní houby *B. bassiana* byly dále testovány na výtěžnost spor na přirozeném substrátu ječných kroupách. Po 14. dnech kultivace byla zaznamenána nejvyšší produkce spor u kmene odizolovaného z Argentiny. Výtěžnost spor byla na 1 g krup 6,42E+09 spor. Velmi produktivní byl také kmen ČR, který vykazoval produkci spor 3,99E+09/1g substrátu. Kmeny Izrael a USA byly nejméně produktivní. Výtěžnost spor byla pouze 3,80E+08, respektive 2,17E+08 spor/1g.

Graf 12: Produkce spor kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na přirozeném substrátu ječných kroupách



Závěr

Na přirozeném substrátu byl nejproduktivnější kmen entomopatogenní houby *B. bassiana* odizolovaný z Argentiny. Kmeny z Izraele a ČR byly na kroupách nejméně produktivní. Z výsledku je patrné, že na produkci spor mají vliv nejen teplota, ale i živné médium a přirozený substrát. Pro produkci spor je důležité vybrat takový nosič, který poskytne danému kmeni entomopatogenní houby optimální podmínky. Výtěžnost spor kmene Argentina je na živném médiu markantně nižší než na kroupách. Kmenům z Izraele a USA naopak prospívá živné médium PDA více než přirozený substrát.

6. DISKUZE

Studium entomopatogenních hub nabývá v současné době stále většího významu. Velmi často bývají využívány v biologické ochraně rostlin k potlačení výskytu celé řady druhů významných škůdců (Behie, Bidochka 2014). Jednou z nejvýznamnějších entomopatogenních hub, které se využívají v biologické ochraně rostlin jako součást integrované ochrany rostlin je druh *B. bassiana*. Tento druh má široký hostitelský okruh a je šetrný k životnímu prostředí, necílovým organismům a zdraví člověka (Lacey *et al.,* 2015). Ve světě se komerční biopreparáty na bázi *B. bassiana* používají, ale v České republice zatím žádný biopreparát na bázi entomopatogenních hub registrován není. Kromě virulence jsou základními parametry pro výrobu biopreparátů na bázi entomopatogenních hub vitalita spor a schopnost produkce na vybraných médiích respektive přirozených substrátech, kde nejdůležitějším faktorem je výtěžnost spor (Safavi 2012). Na tyto parametry se tato bakalářská práce zaměřila. Byly testovány 4 kmeny houby *B. bassiana* z různých geografických oblastí, světadílů.

První část bakalářské práce se zaměřovala na klíčení spor kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana*. Klíčivost entomopatogenních hub je jedním z prvních kroků v infekčním procesu, který aktivně ovlivňuje patogenitu nebo virulenci, je to jeden ze základních hodnotících parametrů hub (Magalhães *et al.,* 1990). Nejoptimálnější teplota pro klíčovost spor kmenů byla v této práci 25 a 30 °C. Tento výsledek se shoduje např. se studií Skinner *et al.,* (2014), kde autoři uvádějí toto rozmezí teplot jako optimální, ale spory mohou klíčit i při teplotách mimo tento rozsah. V bakalářské práci byl kmen ČR schopen klíčit po 24 h i při 10 °C. Teplotní rozsah může být u každého kmene jiný, je to dáno specifitou konkrétního kmene entomopatogenní houby. Zimmermann (2007) ve své studii uvádí, že obecná klíčivost konidií *B. bassiana* začíná přibližně po 10 hodinách a je z velké části dokončena do 20 hodin při teplotě 20 až 25 °C což naším výsledkům odpovídá.

Další část práce se zaměřovala na radiální růst a výtěžnost spor kmenů hub *B. bassiana* v různých teplotních podmínkách. Optimální teplota pro většinu entomopatogenní hub se pohybuje v rozmezí mezi 20 a 25 °C (Inglis *et al.,* 2001; Jaronski *et al.,* 2007; Bugeme *et al.,* 2008). Autoři Goettel, Inglis (1997), udávají jako optimální teplotu pro infikování hostitele, růst a sporulaci mezi 20 až 30 °C. Velmi podobné výsledky publikovali i Hallsworth, Magan (1999), kteří došli k závěru, že pro *M. anisopliae, B. bassiana* a *I. farinosa* jsou optimální teploty pro růst v rozmezí 20-30 °C. Výsledky studií jsou téměř shodné i s výsledky této bakalářské práce. Optimální teploty pro růst kmenů *B. bassiana* byly 20, 25 a 30 °C. Teploty pro produkci spor se mezi kmeny *B. bassiana* lišily, rozmezí bylo od 15 do 30 °C. Teplotní

optimum je dalším specifickým rysem kmenů entomopatogenních hub. Spory těchto druhů hub mohou přežívat i pod 0 °C. Krátkodobě jsou entomopatogenní houby schopny přežívat i teploty 40-45 °C (Landa *et al*., 2008). Obecné rozpětí teplot není univerzální, protože kmeny získané z určitých geografických oblastí se často v podmínkách nápadně odlišují.

Posledním sledovaným parametrem v této práci bylo hodnocení výtěžnosti spor vybraných kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na přirozeném substrátu ječných kroupách. Hromadná produkce entomopatogenních hub je důležitým krokem k úspěšné výrobě biopreparátů. Houby mohou být masově a levně vyráběny na různých přírodních substrátech, jako jsou např. kroupy, kukuřice, otruby, pšenice, rostlinný odpad a jiné (Goettel, Inglis 1997; Seema *et al.,* 2013). Nejvyšší výtěžnost spor na kroupách dosahoval v této práci kmen odizolovaný z Argentiny. Výtěžnost spor byla po 14. dnech $6{,}42\times10^{9}$ spor *B. bassiana* na 1 g krup. Autoři Lee Yong *et al.,* (2019), dospěli k podobným výsledkům ve své práci, kde pro produkci spor 6 kmenů *B. bassiana* použili jako přirozený substrát proso. Rozsah výtěžnosti spor na 1 g substrátu byl v rozsahu od 2,1 do $3{,}8\times10^{9}$. Výtěžnost spor na přirozených substrátech je opět parametr, který je kmenově specifický.

Téma bakalářské práce bylo zaměřeno na porovnání růstových a produkčních vlastností vybraných kmenů, což je jedním z hlavních ukazatelů pro výrobu biopreparátů. Nicméně, dalším velmi důležitým ukazatelem pro výrobu biopreparátů na bázi entomopatogenních hub je virulence potencionálních kmenů, proto musí být v budoucnu realizována studie zaměřená na hodnocení virulence těchto konkrétních kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana*.

7. ZÁVĚRY BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

1. Nejoptimálnější byly pro klíčivost spor kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* teploty 25 a 30 °C. Naopak při teplotě 10 °C se klíčivost spor hub inhibovala, po 24 h klíčil pouze kmen odizolovaný z ČR.

2. Argentinský kmen rostl nejrychleji při teplotě 30 °C. Kmeny odizolované z USA a Izraele vykazovaly nejrychlejší kolonizaci živného média PDA při teplotě 25 °C. Optimální teplota pro růst a vývoj kmene z ČR byla 20 °C. Nejpomaleji kmeny *B. bassiana* rostly při teplotě 10 °C, tato teplota není pro růst a vývoj kmenů optimální.

3. Teplotní požadavky kmenů *B. bassiana* pro produkci spor nekorelovaly s teplotními požadavky pro růst a vývoj. Kmen Argentina byl nejproduktivnější při teplotě 25 °C, kmen Izrael při 15 °C, kmen USA při 20 °C a kmen ČR při 30 °C. Nejproduktivnějšími kmeny *B. bassiana* na umělém médiu PDA byly kmeny ČR a USA.

4. Na přirozeném substrátu byl nejproduktivnější kmen entomopatogenní houby *B. bassiana* odizolovaný z Argentiny. Druhý nejproduktivnější kmen byl z ČR. Kmeny z Izraele a USA byly na kroupách nejméně produktivní.

8. PŘEHLED LITERATURY

Al-mazra'awi M.S., Shipp L., Broadbent B., Kevan P. (2006): Dissemination of *Beauveria bassiana* by honey bees (Hymenoptera: Apidae) for control of tarnished plant bug (Hemiptera: Miridae) on canola. *Environmental Entomology 35: 1569-1577.*

Augustyniuk-Kram A., Kram K.J. (2012): Entomopathogenic Fungi as an Important Natural Regulator of Insect Outbreaks in Forests (Review). In: Forest Ecosystems - More than Just Trees, Dr Juan A. Blanco (Ed.), 265-282.

Antwi F.B., Olson D.L., Carey D.R. (2007): Comparative of ecorational and chemical insecticides against crucifer flea beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) on canola. *Journal of Economic Entomology, 100: 1201-1209.*

Bartlett M.C., Jaronski S.T. (1988): Mass production of entomogenous fungi for biological control of insects. In: Burge M.N. (Ed.): Fungi in Biological Control Systems. *Manchester University Press, Manchester, UK, 61-85.*

Bateman R.P., Carey M., Moore D., Prior C. (1993): The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. *Annals of Applied Biology, 122: 145-152.*

Behie S.W., Bidochka M.J. (2014): Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: an additional branch of the soil nitrogen cycle. *Applied and Environmental Microbiology 80: 1553-1560.*

Benz G. (1987): "Environment" In: Fuxa J.R., Tanada Y. [eds.]: "Epizootiology of insect diseases", *Wiley, New York, 177-214.*

Boucias D.G., Pendland J.C. (1991): Attachment of mycopathogens to cuticle. The initial event. of mycoses in arthropod hosts. In: Cole G.T., Hoch H.C. (Eds.): The fungal spore and diseases inintiation in plants and animals. *Plenum, New York, 101-128.*

Brunner-Mendoza C., Navarro-Barranco H., León-Mancilla B., Pérez-Torres A., Toriello C. (2017): Biosafety of an entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* in an acute dermal test in rabbits. *Cutaneous and Ocular Toxicology, 36: 12-18.*

Bugeme D.M., Maniania N.K., Knapp M., Boga H.I. (2008): Effect of temperature on virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to *Tetranychus evansi.* Experimental and *Applied Acarology, 46: 275-285.*

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.*

Butt T. M., Goettel M. S., Papierok B. (1999): Directory of specialists involved in the development of fungi as biocontrol agents. *Colin Butt Design & Print, Warley, West Midlands, 48 p.*

Butt T.M., Carreck N.L., Ibrahim L., Williams I.H. (1998): Honey bee-mediated infection of pollen beetle (Meligethes aeneus Fab.) by the insect-pathogenic fungus, Metarhizium anisopliae. *Biocontrol Science and Technology, 8: 533-538.*

Chase A. R., Osborne L. S., Ferguson V. M. (1986): Selective isolation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from an artificial potting medium. *Florida Entomologist, 69: 285-292.*

Copping L.G. (2004): The Manual of Biocontrol Agents, third ed. *British Crop Protection Council, Aston, UK.*

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 Hoog G.S. (1972): "The genera *Beauveria, Isaria, Tritirachium* and *Acrodontium* gen". *Studies in Mycology, 1: 1-41.*

Douthwaite B., Langewald J., Harris J. (2001). Development and commercialization of the Green Muscle biopesticide. *International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria, 22 p.*

Eilenberg J., Hajek A., Lomer C. (2001): Suggestion for unifying the terminology in biological control. *BioControl 46(4): 387-400.*

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.*

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.*

Federici B.A. (2007): Bacteria as biological control agents for insect: economics, ingeneering, and enviromental safety. In Gresel J., Vurro M. (eds.): Novel biotechnologies for biocontrol enhancement and management. *Dotrecht 25-51.*

Federici B.A. (1999): A perspective on pathogens as biological control agents for insect pests. In: Bellows T.S., Fisher T.W. (eds): Handbook of Biological Control. *Academic Press, San Diego, 517-548.*

Feng M.G., Poprawski T.J., Khachatourians G.G. (1994): Production, formulation, and application of entomopatogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control. *Biocontrol Science and Technology, 4: 3-34.*

Feng Z., Carruthers R.I., Roberts D.W., Robson D.S. (1985): Age-specific dose-mortality effects of *Beauveria bassiana* on the Europien corn borer *Ostrinia nubilalis*. *Journal of Invertebrate Pathology, 46: 259-264.*

Fernandes E.K.K., Rangel D.E.N., Moraes A.M.L., Bittencourt V.R.E.P., Roberts D.W. (2007): Variability in tolerance to UV- B radiation among *Beauveria* spp. isolates. *Journal of Invertebrate Pathology, 96: 237-243.*

Ferron P. (1981): Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In: Burgess H.D., editor. Microbial Control of Pests and Plant Diseases. *London, Academic Press 1970–1980, 24: 465-482.*

Flexner J.L., Lighart B., Croft B.A. (1986): The effects of mikrobial pesticides on non-target, benefitial arthropods. *Agriculture, Ecosystem and Environment, 16: 203-254.*

Godfray H.C.J. (1994): Parasitoids, Behavioral and Evolutionary Ecology. *Princeton University Press, Princeton, NJ, USA.*

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.*

Greathead D.J. (1986): Parasitoids in classical biological control. In: Waage J., Greathead D. (eds.): Insect parasitoids. *Académie Press, London, 290-319.*

Hajek A. (2004): Natural enemies: an introduction to biological control. *Cambridge university press, UK, 378 p.*

Hajek A.E., Leger R.J. (1994): Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology, 39: 293-322.*

Hall R.W., Ehler L.E. (1979): Rate of esta-blishment of natural enemies in classical biological control. *ESA Bulletin, 25: 280-282.*

Hallsworth J.E., Magan N. (1999): Water and Temperature Relations of Growth of the Entomogenous Fungi *Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae,* and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology, 74: 261-266.*

Hedgecock S., Moore D., Higgins P.M., Prior C. (1995): Influence of moisture content on temperature tolerance and storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in an oil formulation. *Biocontrol Science and Technology, 5: 371-378.*

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.*

Hong T.D., Ellis R.H., Moore D. (1997): Development of a model to predict the effect of temperature and moisture on fungal spore longevity. *Annals* of *Botany, 79: 121-128.*

Hokkanen H.M.T., Babendreier D., Bigler F., Burgio G., Kuske S., van Lenteren J.C., Loomans A.J.M., Menzler-Hokkanen I., van Rijn P.C.J., Thomas M.B., Tommasini M.G., Zeng Q.-Q. (2003): Evaluating Environmental Risks of Biological Control Introductions into Europe. Final report of project EU-FAIR5–CT97-3489 (’ERBIC’), Commission of the European Communities, Brussels. Available at: http://honeybee.helsinki.fi/MMSBL/MAEL/Hankkeet/ERBIC/index.htm

Hokkanen H.M.T. (1993): Overwintering survival and spring emergence in *Meligethes aeneus*: effects of body weight, crowding, and soil treatment with *Beauveria bassiana. Entomologia Experimentalis et Applicata 67: 241–246.*

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 R.A. (1997): Fungi: Identification. *In:* Lacey L.A. (Ed.): Manual of techniques in insect pathology. *Academic Press, London, 153-185.*

Hurst G.D.D., Jiggins F.M. (2000): Male-killing bacteria in insects: Mechanisms, incidence, and implications. *Emerging Infectious Diseases, 6(4): 329-336.*

Husberg G.B., Hokkanen H.M.T. (2001): Effect of Metharizium anisoplae on the pollen beetle Melighetes aeneus, and its parasitoids *Phradis morionellus* and *Diospilus capito*. *Biocontrol, 46: 261-273.*

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.*

Inglis G.D., Johnson D.L., Cheng K.J., Goettel M.S. (1997): Use of pathogen combinations to overcome the constraints of temperature on entomopathogenic hyphomycetes against grasshoppers. *Biological Control, 8: 143-152.*

Inyang E., Mccartney H., Oyejola B., Ibrahim L., Pye B., Archer S., Butt T. (2000): Effect of formulation, application and rain on the persistence of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* on oilseed rape. *Mycological Research, 104(6): 653-661.*

Jackson L.E., Calderon F.J., Steenwerth K.L., Scow K.M., Rolston D.E. (2003): Responses of soil microbial processes and community structure to tillage events and implications for soil quality. *Geoderma, 114: 305-317.*

Jaronski S.T. (2007): Soil ecology of the entomopathogenic Ascomycetes: A critical examination of what we (think) we know. In: Ekesi S., Maniania N.K. (Eds.): Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management. *Research Signpost, Kerala, 91-143.*

Kabaluk T., Gazdik K. (2005): Directory of Microbial Pesticides forAgricultural Crops in OECD Countries. Agriculture and Agri-Food Canada. Available online at http://www.agr.gc.ca/env/pest/index_-e.php??s1=pub& page=micro.

Kalina T., Váňa J. (2005): Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. *Karolinum, Praha, 229-236.*

Keller S., Zimmermann G. (1989): Mycopathogens of soil insects. In: Wilding N., Collins N.M., Hammond P.M., Webber J.F. (eds.): Insect-fungus interactions. *London: Academic Press, 240-270.*

Kirby W., Spence W. (1815): An introduction to Entomology. *Longman, Brown, Green & Longmans, London, Kollar, Vincent 285p.*

Kůdela V., Bartoš P., Čača Z., Dirlbek J., Frič F., Lebeda A., Šebesta J., Ulrychová M., Valášková E., Veselý D. (1989): Obecná fytopatologie. *Academia, Praha, 388 p.*

Lacey L.A., Grzywacz D., Shapiro-Ilan D.I., Frutos R., Brownbridge M., Goettel M.S. (2015): Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology* 132: 1-41.

Landa Z., Bohatá A., Kalista M. (2008): Záměrné využívání autochtonních kmenů vybraných druhů entomopatogenních hub. *Jihočeská univerzita, České Budějovice, 47 p.*

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 udržateľné technológie v záhradnictve. *Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 225-280.*

Landa Z. (1994): Entomopatogenní houby v biologické ochraně rostlin (habilitační práce). *ZF JU, České Budějovice, 14-50.*

MacLeod D. M. (1954): Investigations on the genera *Beauveria* Vuill. and *Tritirachium* Limber. *Canadian* Journal of *Botany, 32: 818-890.*

Magalhães B.P., Butt T.M., Shields E.J., Roberts D.W., Humber R.A. (1990): Formation of apressoria in vitro by the entomopathogenic fungus *Zoophthora radicans* (Zygomycetes: Entomophthorales). *Journal of Invertebrate Pathology 55: 284-288.*

Malsam O., Kilian M., Oerke E.C., Dehne H.W. (2002): Oils for Increased Efficacy of *Metarhizium anisopliae* to Control Whiteflies. *Biocontrol Science and Technology, 12(3): 337-348.*

Markova G. (2000): Pathogenisity of several entomogenous fungi to some of the most serious forest insect pests in Europe. In: Smits P. H. (Ed.): *Proceedings of the 7th European Meeting of IOBC/WPRS. Bulletin OILB/SROP 23(2): 231-239*

McCabe D., Soper R.S. (1985): "Preparation of an Entomopathogenic Fungal Insect Control Agent." *U.S. Patent 4,530,834. July 23.*

McCoy C.W., Heimpel A.M. (1980): Safety of the potential mycoacaricide, *Hirsutella thompsonii*, to vertebrates. *Enviromental enthomology, 9: 47-9.*

McCoy C.W., Hill A.J., Kanavel R.F. (1975): Large-scale production of the fungal pathogen *Hirsutella thompsonii* in submerged culture and its formulation for application in the field. *Entomophaga, 20: 229-240.*

Moore D., Bridge P.D., Higgins P.M., Bateman R.P., Prior C. (1993): Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. *Annals of Applied Biology, 122: 605-616.*

Morrow B.J., Boucias D.G., Heath M.A. (1989): Loss of virulence in an isolate of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi* after serial in vitro passage. *Journal of Economic Entomology, 82: 404-407.*

Müller-Kögler E. (1965): Pilzkrankenheiten bei Insekten. Anwendung zur biologischen Schädlingsbekämpfung und Grundlagen der Insektenmykologie. *Paul Parey, Berlin und Hamburg, 444 pp.*

Nielsen C., Keena M., Hajek A.E. (2005): Virulence and fitness of the fungal pathogen *Entomophaga maimaiga* in its host *Lymantria dispar*, for pathogen and host strains originating from Asia, Europe, and North America. *Journal of Invertebrate Pathology, 89(3): 232-242.*

Ortega-García L., Tabone E., Beaudoin-Ollivier L., Ment D., Buradino M., Jaques J.A., Garrido-Jurado I., Dembilio O., Quesada-Moraga E. (2017): Natural Enemies of *Rhynchophorus ferrugineus* and *Paysandisia archon*. In: Soroker V., Colazza S. (Eds.): Handbook of Major Palm Pests: Biology and Management. *John Wiley & Sons Ltd., United Kingdom, 171-186.*

Podgwaite J.D. (1986): Effect of insect pathogens on the environment. Pages 279-187. International Symposium of the AKademie der Wissenschaften und der Literature, Mains, at Mains & Darmstadt. *Fortschritte der Zoologie, (Vlium 32, pp. 341), Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, Germany.*

Quesada-Moraga E.; Landa B.B., Muñoz-Ledesma J., Jiménez-Diáz R.M., Santiago-Alvarez C. (2006): Endophytic colonization of Opium poppy, *Papaver somniferum*, by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. *Mycopathologia, 161: 323-329.*

Rehner S.A. (2005): Phylogenetics of the insect pathogenic genus *Beauveria*. In: Vega F.E., Blackwell M. (Eds.): Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution. *Oxford University Press, New York, 3-27.*

Safavi S.A. (2012): Attenuation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* following serial *in vitro* transfers. *Biologia, 67(6): 1062-1068.*

Sandhu S.S., Sharma A.K., Beniwal V., Goel G., Batra P., Kumar A., Sundeep J., Sharma A.K., Malhotra S. (2012): Myco-Biocontrol of Insect Pests: Factors Involved, Mechanism, and Regulation. *Journal of Pathogens, Article ID 126819, 1–10.*

Seema Y., Neeraj T., Krishan K. (2013): Mass production of entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* using rice as a substrate by diphasic liquid-solid fermentation technique. *I.J.A.B.R 3(3): 331-335.*

Skinner M., Parker B.L., Kim J.S. (2014): Role of entomopathogenic fungi. In: Abrol D.P. (ed): Integrated pest management. *Academic Press, Cambridge 169-191.*

Steinhaus E.A. (1975): Disease in a Minor Chord. *Ohio State University Press, Columbus.*

Storey G.K., Gardner W.A. (1989): Movement of aqueous spray of *Beauveria bassiana* into the profile on four Georgia soils. *Environmental Entomology, 18: 835-839.*

Strasser H., Vey A., Butt, T.M. (2000): Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium, Tolypocladium* and *Beauveria* species? *Biocontrol Science and Technology, 10: 717-735.*

Walker S.D., Clark R.V., King C.T., Humphries J.E., Lytle L.S., Butkus D.E. (1992): Fatal Disseminated *Conidiobolus* coronatus Infection in a Renal Transplant Patient, *American Journal of Clinical Pathology, 98(6): 559-564.*

Tanada Y., Kaya H.K. (1993): Insect Pathology, *Academic Press, San Diego, CA, 318-366.*

Tichá K. (2001): Biologická ochrana rostlin. *Grada Publishing, Praha, 88 p.*

Van Driesche R, Heinz R.G. (2004): An overview of biological control in protected culture. *Ball Publishing, Batavia, 1-24.*

Van Driesche R., Mark H., Center T.D. (2008): Control of pests and weeds by natural enemies: an introduction to biological control. *Malden M.A., Blackwell Pub 290-300.*

Van Winkelhoff A.J., McCoy C.W. (1984): Conidiation of *Hirsutella thompsonii* var. synnematosa in submerged culture. *Journal of Invertebrate Pathology, 43: 59-68.*

Vänninen L., Tyni-Juslin J., Hokkanen H. (2000): Persistence of augmented *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Finnish agricultural soils. *BioControl, 45: 201-222.*

Vänninen I., Husberg G.B., Hokkanen H.M.T. (1989): Occurrence of entompathogenic fungi and entomopathogenic nematodes in cultivated soils in Finland. *Acta Entomologica Fennica, 53: 65-71.*

Vänninen I., Hokkanen H. (1988): Effects of pesticides on four species of entomopathogenic fungi. *Annales Agriculturae Fenniae, 27: 345-353.*

Vega F.E., Meyling N., Luangsa-ard J., Blackwell M. (2012): Fungal Entomopathogens. *Insect Pathology, 171-220.*

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.*

Williams I.H. (2010): Biocontrol based integrated management of oilseed rape pests. *London: Springer, 16-367.*

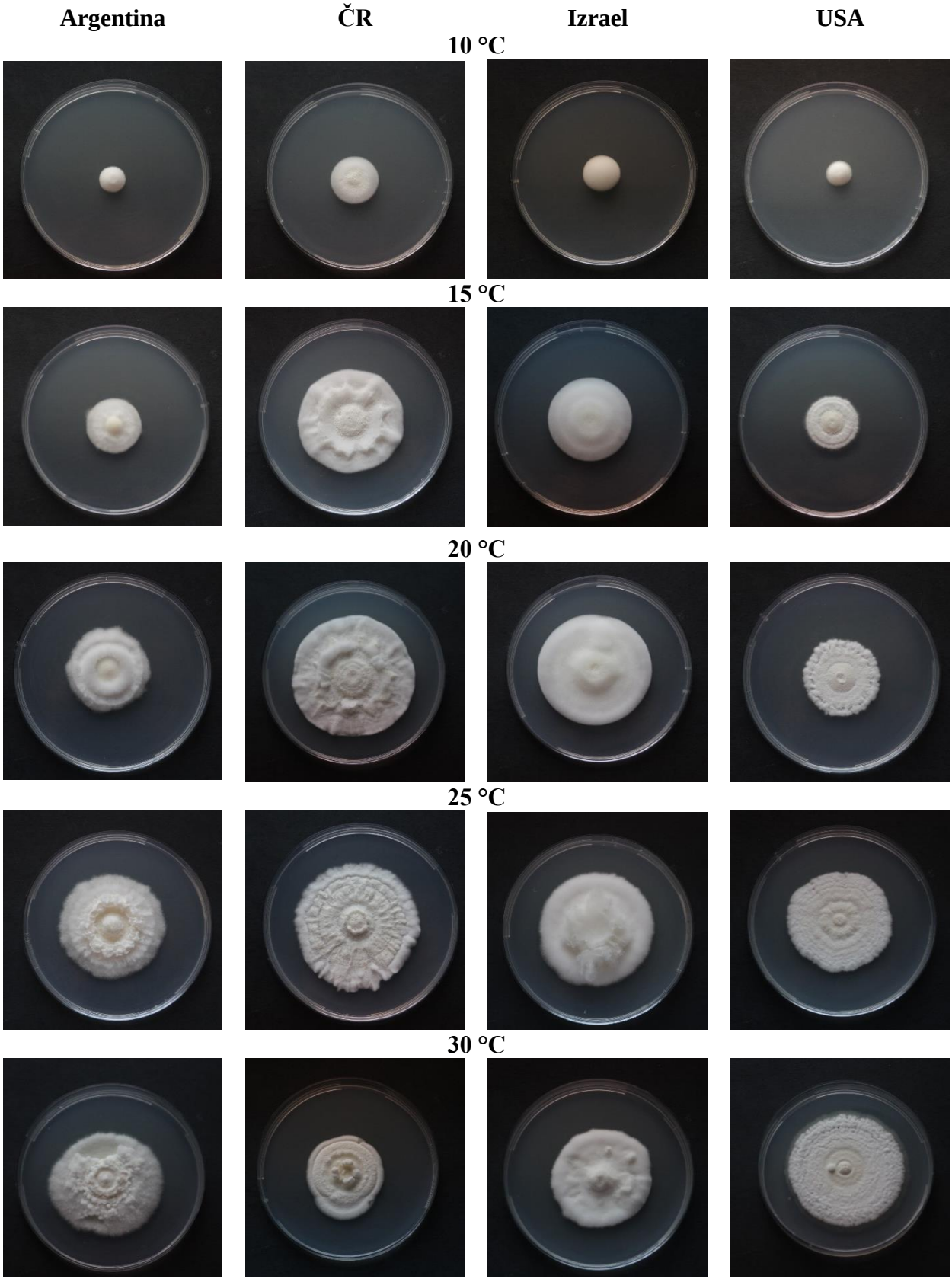
Wraight S.P., Jackson M.A., de Kock S.L. (2001): Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: Butt T.M., Jackson C., Magan N. (Eds.): Fungi as Biocontrol Agents: Progress,Problems and Potential. *CAB International, Wallingford, UK, 253-287.*

Wraight S.P., Carruthers R.I. (1999): Production, delivery and use of mycoinsecticides for control of insect pests of field crops. *Human Press, Totowa, NJ, 233-269.*

Yong L.J., Woo R.M., CHoi V.J., Shin T.Y., Gwak W.S., Woo S.D. (2019): *Beauveria bassiana* for the simultaneous control of Aedes albopictus and Culex pipiens mosquito adults shows high conidia persistence and productivity. AMB Express [online]. 9(1).

Zec-Vojinovic M., Hokkanen H.M.T., Büchs W., Klukowski Z., Luik A., Nilsson C., Ulber B., Williams I. (2006): Natural occurrence of pathogens of oilseed rape pests in agricultural fields in Europe. *Proceedings of the MASTER Final Symposium, Göttingen (in prep.).*

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

9. PŘÍLOHY

Grafický list 1: Středové kultury kmenů houby *B. bassiana* v různých teplotách kultivace