

TÉMA DIPLOMOVÉ PRÁCE:

Hodnocení účinnosti entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* pomocí standardního laboratorního biotestu

Autor: Radim Paulič

Studijní obor: Všeobecné zemědělství

Specializace: Rostlinolékařství

Vedoucí diplom. práce: prof. ing. Zdeněk Landa, CSc.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně na základě vlastních zjištění a pozorování a použil jsem pouze pramenů, jenž cituji na konci práce v seznamu literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové 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.

V Českých Budějovicích 29. dubna 2011

.....  
**Radim Paulič**

Děkuji prof. ing. Zdeňku Landovi, CSc. a ing. Aleši Skalickému za cenné rady, připomínky, metodické a odborné vedení, které mi poskytli v průběhu mého zpracovávání diplomové práce.

Dále jsem zavázán ing. Andree Bohaté, PhD. za konzultace a všestrannou pomoc, děkuji také pracovnícím Katedry rostlinné výroby a agroekologie, jmenovitě Olze Divišové a Marii Nýdlové za technickou asistenci při zakládání pokusů.

**Radim Paulič**

**Abstract:**

In laboratory bioassays, the efficacy of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against the yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) was tested under various temperature conditions. Six different strains of fungus *B. bassiana* was investigated. The evaluation was based on vitality bioassays including germination and growth index assessment and the bioassay of virulence based on target organism *T. molitor* was also assessed growth and yield of conidia different strains of fungus *B. bassiana* on natural substrates and artificial nutrient substrates.

**Keywords:** entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, temperature relations, standard laboratory bioassay, in vitro assay, in vivo bioassay

**Souhrn:**

V laboratorních podmínkách byla testována účinnost entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* proti potemníku moučnému (*Tenebrio molitor*) v různých teplotních podmínkách prostředí. Bylo hodnoceno 6 různých kmenů *B. bassiana*. Hodnocení bylo založeno na vitalitě v biotestu, včetně klíčení, hodnocení růstového indexu a biologické virulence na základě cílového organismu *T. molitor*. Byl také posuzován růst a výtěžnost spor různých kmenů *B. bassiana* na přirozených živných substrátech a na umělých živných půdách.

**Klíčová slova:** entomopatogenní houby, *Beauveria bassiana*, teplotní vlivy, standardní laboratorní biotest, in vitro testy, in vivo biotesty

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	3
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	4
2.1. Integrovaná ochrana rostlin .....	4
2.2. Biologická ochrana rostlin .....	4
2.3. Entomopatogenní houby .....	5
2.3.1. Charakteristika vztahu mezi hostitelem a entomopatogenní houbou .....	5
2.3.2. Taxonomický systém entomopatogenních hub .....	6
2.3.3. Vývojový cyklus entomopatogenních hub .....	7
2.3.4. Klíčové faktory prostředí na vývoj entomopatogenních hub .....	9
2.4. Stručný přehled nejvýznamnějších druhů entomopatogenních hub .....	10
2.4.1. <i>Isaria fumosorosea</i> WIZE .....	10
2.4.2. <i>Lecanicillium lecanii</i> R. ZARE et W. GAMS .....	10
2.4.3. <i>Metarhizium anisopliae</i> (METSCH.) SOROKIN .....	11
2.4.4. <i>Beauveria brongniartii</i> (SACCARDO) PETCH .....	11
2.5. <i>Beauveria bassiana</i> (BALSAMO-CRIV.) VUILLEMIN .....	12
2.6. Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub .....	14
2.7. Biotesty a entomopatogenní houby .....	17
2.8. Základní metody v biotestu .....	18
2.8.1. Inokulace .....	18
2.8.2. Inkubace .....	18
2.9. Kultivace entomopatogenních hub v in vitro prostředí .....	18
<b>3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE</b> .....	21
<b>4. MATERIÁL A METODIKA</b> .....	22
4.1. Endemické kmeny entomopatogenní houby <i>B. bassiana</i> .....	22
4.2. Příprava suspenze .....	23
4.3. Larvy potměníka moučného ( <i>Tenebrio molitor</i> ) .....	23
4.4. In vivo testy .....	23
4.5. In vitro testy .....	24
4.6. Klíčivost – GI stupnice .....	25
4.7. Ostatní údaje metodiky .....	26
<b>5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	27

5.1. In vivo testy – laboratorní biotest.....	27
5.2. Klíčivost jednotlivých kmenů <i>B. bassiana</i> (GI – test) .....	36
5.3. Kultivace na různých přirozených živných substrátech.....	39
5.4. Porovnání radiálního růstu u jednotlivých kmenů <i>B. bassiana</i> .....	44
<b>6. DISKUSE</b> .....	<b>52</b>
<b>7. ZÁVĚRY</b> .....	<b>55</b>
<b>8. SEZNAM LITERATURY</b> .....	<b>56</b>
<b>9. PŘÍLOHY</b> .....	<b>61</b>

# 1. ÚVOD

Biologická ochrana je v současné době využívána již mnohem více, než tomu bylo v dřívějších dobách, k omezení výskytu patogenů v porostech kulturních plodin na poli i ve sklenících. Cílem biologické ochrany je omezení chemické ochrany za účelem zlepšení kvality potravin a životního prostředí, které vede ve svém důsledku k podpoře stability ekosystémů v kulturní krajině.

V současnosti při regulaci populací škodlivých organismů vystupují do popředí principy trvale udržitelných systémů, jejichž důležitou součástí je respektování ochrany životního prostředí a zdraví obyvatel.

Především v posledních letech se v biologické ochraně uplatňují přípravky na bázi mikroorganismů, které regulují populace škodlivých organismů. Mezi ně patří entomopatogenní bakterie, viry, entomopatogenní hlístice a především entomopatogenní houby. Vysoký potenciál entomopatogenních hub spočívá především v jejich celosvětovému rozšíření a přirozené přímé asociaci s mnoha druhy organismů, hlavně hmyzu. Zvláštní zřetel je kladen na lokální endemické kmeny, které tvoří přirozenou složku daného ekosystému. K výhodám používání těchto lokálních kmenů je především jejich adaptace na ošetřované prostředí. K cílům biologické ochrany nepatří absolutní odstranění škodlivého organismu, ale jeho udržení pod prahem ekonomické škodlivosti za maximálního využívání přirozených regulačních faktorů.

Tato diplomová práce je zaměřena na studium jednotlivých endemických kmenů entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* v různých podmínkách prostředí – její růst a výtěžnost spor na přirozených druzích substrátu a umělých živných půdách v různých teplotních podmínkách; růst v různých teplotách na larvách potměníka moučného (*Tenebrio molitor*).

## **2. LITERÁRNÍ PŘEHLED**

### **2.1. Integrovaná ochrana rostlin**

*Definice integrované ochrany podle Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2009/128/ES:*

Pod pojmem „integrovaná ochrana rostlin“ se rozumí pečlivé zvažování veškerých dostupných metod ochrany rostlin a následná integrace vhodných opatření, která potlačují rozvoj populací škodlivých organismů a udržují používání přípravků na ochranu rostlin a jiných forem zásahu na úrovních, které lze z hospodářského a ekologického hlediska odůvodnit a které snižují či minimalizují rizika pro lidské zdraví nebo životní prostředí. „Integrovaná ochrana rostlin“ klade důraz na růst zdravých plodin při co nejmenším narušení zemědělských ekosystémů a podporuje přirozené mechanismy ochrany před škodlivými organismy (ANONYM 2009).

### **2.2. Biologická ochrana rostlin**

Pojmem biologická ochrana je obvykle chápáno cílevědomé používání živých organismů (roztočů, hmyzu, hlístic, virů, bakterií, hub aj.) pro potlačování škodlivých biologických činitelů (škůdci, choroby, plevelné rostliny), omezování jejich vývoje, šíření a udržení pod úrovní jejich škodlivého množství v porostech kulturních rostlin.

Cílem biologické ochrany je omezení chemické ochrany za účelem zlepšení kvality potravin a životního prostředí, resp. odstraňování nepřírodných prvků (zvláště toxických) z biologických potravních cyklů, ve svém důsledku vedoucí k podpoře stability ekosystémů v kulturní krajině.

Biologické metody regulace škodlivých organismů jsou lidem známé už z dávné minulosti, ale jejich širšímu uplatnění zabránil na dlouhou dobu rozmach chemické ochrany rostlin, založené na relativně jednoduché a snadné aplikaci často velmi toxických přípravků.

K výraznějšímu rozvoji biologických metod regulace populací škůdců došlo zejména koncem dvacátého století. K jejich širšímu uplatnění v praxi přispěl lepší přístup k informacím a novým poznatkům, rovněž ekologické zemědělství, které nevyužívá klasické přípravky chemické ochrany pro regulaci populací škůdců rostlin (VONDRÁŠKOVÁ 2008).



Hlavním cílem biologické ochrany je především regulace, nikoli úplné vyhubení škůdce. Populace škodlivého organismu by měla být udržována pod hladinou škodlivosti, kdy náklady na ochranu rostlin odpovídají objemu škody vzniklé působením škůdců (NAVRÁTILOVÁ 2000).

Mezi velmi důležité vlastnosti biologické ochrany rostlin patří také „konzervace přirozených nepřátel“ působících proti nejrůznějším škodlivým činitelům, což je významná činnost, jejímž cílem je chránit a udržovat populace přirozených nepřátel (JOHNSON 2000).

### **2.3. Entomopatogenní houby**

Entomopatogenní houby jsou nejdéle známé a nejčastěji determinované entomopatogenní mikroorganismy asociované s hmyzem, protože jejich růst na povrchu těla různých druhů hostitelů je na rozdíl od ostatních skupin entomopatogenních mikroorganismů snadno vizuálně patrný (LANDA 1994). Poměrně velkou skupinu entomopatogenních hub tvoří druhy, které kromě hmyzu rostou i na mrtvém substrátu organických zbytků a jejich patogenita pro hmyz je jen jednou z možností jejich existence (WEISER 1966). Zajímavým rysem těchto hub je schopnost vyvolávat infekci kontaktem, aktivní penetrací kutikuly, zatímco ostatní část entomopatogenů, ke kterým patří viry, bakterie a protozoa musí být bezpodmínečně pozřeny, aby mohla být infekce iniciována. Entomopatogenní houby jsou heterogenní skupina tvořená v současnosti téměř 750 druhy, které jsou zastoupeny ve 100 rodech (AMBETHGAR 2002).

#### **2.3.1. Charakteristika vztahu mezi hostitelem a entomopatogenní houbou**

Entomopatogenní houby převážně působí jako ektoparaziti hmyzu. Endoparaziticky působí jen velmi zřídka. Hmyz bývá infikován konidiemi nebo blastosporami (*Deuteromycotina*), sporami či konidiemi (*Zygomycotina*), askosporami (*Ascomycotina*) a zoosporami (*Mastigomycotina*). Výjimečně bylo zjištěno infikování i sklerociemi a sporodochii (McCOY et al. 1988). Patogen proniká do těla hmyzího hostitele kutikulou, někdy také ústním či řitním otvorem, nebo dýchacím systémem.

Mezi nejčastěji napadané řády hmyzu entomopatogenními houbami patří brouci (*Coleoptera*), dvoukřídlí (*Diptera*), třásnokřídlí (*Thysanoptera*), ploštice (*Heteroptera*), stejnokřídlí (*Homoptera*) a motýli (*Lepidoptera*). Nejčastěji infikovaným stádiem jsou larvy, případně kukly (LANDA 1998). Parazitická valence deuteromycet je velmi

rozmanitá. Většina druhů polyfágních entomopatogenních hub může obecně parazitovat na širokém spektru hmyzích hostitelů (LANDA 1998). Různé kmeny entomopatogenních hub mohou vykazovat i úzkou hostitelskou specializaci. Druhovú specifitu těchto hub ve vztahu k hostiteli je často podmíněna jeho fyziologickým stavem, vlastnostmi kutikuly a nároky patogena na výživu (McCOY et al. 1988).

### 2.3.2. Taxonomický systém entomopatogenních hub

Pro klasifikaci entomopatogenních hub se z několika různých verzí ujal především systém zavedený G. C. Aisworthem, ve kterém jsou nejvyššími jednotkami hub oddělení *Eumycota* a *Myxomycota* (AINSWORTH et al. 1973). Entomopatogenní druhy hub jsou známy v oddělení *Eumycota*, zastoupeny jsou v mnoha řádech různých kmenů. K nejvýznamnějším (GOETTEL et al. 2000, LANDA 1998) patří především entomopatogenní houby v podkmenech *Mastigomycotina* (*Chytridiomycetes: Blastocladales*), *Zygomycotina* (*Zygomycetes: Entomophthorales, Mucorales*), *Ascomycotina* (*Pyrenomycetes: Spaeriales, Laboulbeniales*) a *Deuteromycotina* (*Hyphomycetes: Moniliales*). Uměle vytvořená pomocná skupina *Deuteromycotina* je rozčleněna na pomocné řády, třídy a čeledi a rod pouze na základě morfologické podobnosti, nikoliv však podle vývojového systému (VÁŇA 1998). Velmi významnou a poměrně dobře známou skupinu entomopatogenních hub, ve kterých je jejich velký počet zastoupen, představují houby *Zygomycotina* (*Zygomycetes: Entomophthorales*). Entomopatogenní houby zastoupené v tomto řádu reprezentují převážně obligátně parazitické druhy, jejichž vývojový cyklus je vázán na živého hostitele. U většiny zástupců z řádu *Entomophthorales* je produkce potřebného množství biomasy formou in vitro kultivací na umělých živných půdách doposud buď zcela nemožná nebo je velmi složitá a nákladná (LANDA 1994, 1998).

Z hlediska praktické biologické ochrany mají klíčový význam zástupci několika důležitých rodů deuteromycet (*Hyphomycetes: Moniliales*). K nejznámějším patří entomopatogenní houby rodů *Beauveria*, *Hirsutella*, *Isaria*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Tolypocladium* a *Verticillium* (SAMSON et al. 1988). V těchto rodech je zastoupena řada druhů, z nichž přibližně 25 je v současné době využíváno ve formě standardních biopreparátů. Většina hub této skupiny může realizovat vývojový cyklus i v alternativních systémech, bez přímé vazby na živého hostitele (např. saprofytický cyklus na odumírající organické hmotě různého původu). Statut fakultativních parazitů umožňuje produkci biomasy infekčních jednotek (konidií resp. blastospor) pomocí

velkokapacitních biotechnologií, což je základní technologický předpoklad pro vývoj a tržní realizaci standardního biopreparátu (LANDA 1998).

### 2.3.3. Vývojový cyklus entomopatogenních hub

Vývojový cyklus hub z pomocného oddělení *Deuteromycotina* z hlediska napadení hostitele lze rozdělit do tří důležitých částí, které zahrnují primární interakce mezi patogenem a hostitelem a vývoj patogena od prvního kontaktu s hostitelem do ukončení vývojového cyklu: 1) Nejprve dojde k přichycení na povrchu kutikuly hostitele a následné vyklíčení konidií patogena 2) Dojde k penetraci patogena kutikulou do tělní dutiny hostitele a vytvoření povrchové sítě mycelia 3) Patogen na hostiteli vyvíjí a produkuje nové konidie (LANDA 1998, ZIMMERMANN 2007).

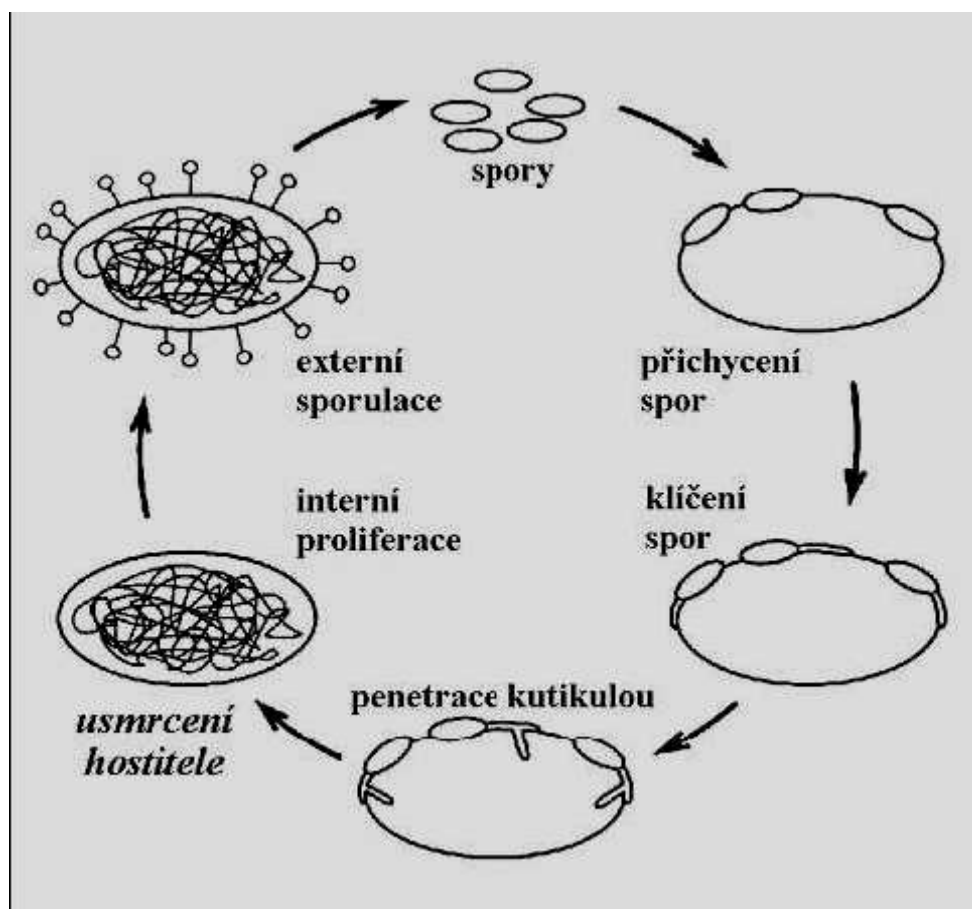
K rozšiřování konidií v přírodě slouží řada abiotických faktorů – nejčastěji dochází k šíření větrem, deštěm, vodními párami. Mezi časté přenosy patogena patří kontakt zdravých a infikovaných jedinců či autodisseminace, při níž dochází k rozšiřování infekce mezi jedinci uvnitř populace (LANDA 1998).

Povrchová struktura konidií sehrává klíčovou roli při vlastní adhezi konidií k povrchu těla hostitele. Některé druhy entomopatogenních hub mají konidie vybaveny mucilagenním či želatinovým povrchem, který umožňuje pevné přitisknutí na povrch kutikuly hostitele (TANADA & KAYA 1993). Jiné druhy entomopatogenních hub (např. *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* aj.) produkují suché, silně hydrofobní konidie s rozmanitě strukturovaným povrchem. Primární adheze takovýchto konidií je zajištěna buď přímou interakcí mezi dvěma hydrofobními povrchy (konidie – kutikula hostitele) nebo prostřednictvím elektrostatických sil, případně i molekulární interakcí mezi látkami, které jsou přítomny na povrchu konidií a kutikuly hostitele. Mezi tyto látky patří např. hemaglutiny, N-acetylglucosamin, glykoproteiny, steroly, polární lipidy a jiné (McCOY et al. 1988, LANDA 1998).

S adhezí souvisí také klíčení konidií. Některé povrchové substance na kutikule hostitele a na konidiích se účastní jak adheze, tak i klíčivosti konidií (BOUCIAS et al. 1988). Klíčení konidií je prvou aktivní fází interakce patogena s hostitelem. Většina druhů entomopatogenních hub produkuje konidie, které jsou energeticky dostatečně vybaveny k vyklíčení, bez nutnosti absorbovat externí živiny. Klíčení konidií tak převážně závisí na abiotických faktorech, ke kterým patří především relativní vzdušná vlhkost a teplota. V první fázi dochází k výraznému zvětšení konidie, která začíná klíčit (bobtnání) a dochází ke komplexní přestavbě stěny konidie, po níž následuje tvorba

primárního klíčku. Od určité fáze naklíčení je další vývoj patogena závislý na externím příjmu živin. Houba začíná přijímat látky, které jsou nejprve součástí kutikuly hostitele, následně pak absorbuje živiny, které jsou přítomny v hostitelových vnitřních orgánech a tkáních (BOUCIAS et al. 1988, LANDA 1998). Za tímto účelem proniká přímou penetrací nebo prostřednictvím přirozených otvorů do tělní dutiny hostitele. Při přímé penetraci kutikulou uplatňují houby kombinaci biochemických a fyzikálně mechanických prvků. V první fázi penetrace jsou v oblasti apresoria pronikající hyfy produkovány kutikulou degradující enzymy - lipázy, chitinázy, proteázy. Koncová špička invazní hyfy tlakem proniká narušenou kutikulou hostitele a invaduje do tělní dutiny. Častým místem penetrace do kutikuly jsou méně sklerotizované části na povrchu těla. Kromě přímé penetrace kutikulou, jsou entomopatogenními houby k pronikání do tělní dutiny využívají i přirozené otvory, ke kterým patří především dýchací otvory (LANDA 1998).

**Obr. 1: Schéma vývojového cyklu entomopatogenních hub (LANDA 1998)**



Po proniknutí patogena do těla dutiny, dochází zpravidla k rychlé kolonizaci jednotlivých tělních tkání a orgánů. V této fázi cyklu vývoje patogen rychle kolonizuje tělní dutinu hostitele a využívá při ní látky obsažené v tělních tkáních (WEISER 1966). Za tímto účelem tvoří většina entomopatogenních hub různé typy heterogenních tenkostěnných tělísek, ke kterým se řadí blastospory, kvasničná tělíska, hyfální tělíska a fragmenty. Tato tělíska se rychle namnožují děleným pučením (LANDA 1998). Mimo tyto tělíska jsou v hostitelově hemolymfě nalézány i volné protoplasty (SAMSON et al. 1988).

Smrtí a mumifikací hostitele končí parazitická část vývojového cyklu a nastupuje finální saprofytická fáze patogena. Začíná tvorba povrchového mycelia a sporulace. Pro tuto fázi vývoje jsou opět typické vláknité struktury. Patogen prorůstá na povrch mumifikovaného hostitele a postupně pokrývá celé jeho tělo hustá síť mycelia. V poslední fázi, konidiogenezi, se začíná na vzdušném myceliu vytvářet konidiofory, na kterých se v konečné fázi cyklu vývoje utvářejí nové konidie. Konidie si v přirozeně dormantním stavu udržují vitalitu po dobu několika týdnů až měsíců (LANDA 1998). Konidie jsou produkovány v útvech, které usnadňují šíření infekce kontaktem či šíření prostřednictvím větru a vody (např. HALL 1981, OSBORNE & LANDA 1992). Dormance konidií je zakončena novým šířením a adhezí konidií na povrchu těla nového vhodného hostitele (LANDA 1998).

#### **2.3.4. Klíčové faktory prostředí na vývoj entomopatogenních hub**

Klíčovým faktorem prostředí na vývoj je především vlhkost. Klíčení konidií zpravidla vyžaduje relativní vlhkost vzduchu vyšší než 90%, avšak také ostatní fáze vývoje probíhají nejrychleji při vyšších vlhkostech (LANDA 1994). Pouze v době od proniknutí patogena do tělní dutiny hostitele a do opětovného prorůstání mycelia na povrch těla nejsou nároky na vysokou vlhkost v okolním prostředí tak vysoké. Také v době sporulace patogena stoupají nároky na vyšší relativní vlhkost a velké množství entomopatogenních hub sporuluje dobře pouze při relativní vlhkosti vyšší než 92,5% (WALSTAD et al. 1970). V případě, že v prostředí nastanou nepříznivé vlhkostní poměry vytváří většina entomopatogenních hub uvnitř těla infikovaného hostitele perzistentní hyfy a saprofytickou fázi vývoje kompenzuje až při vhodných podmínkách. Nízká relativní vlhkost je však výhodná v řadě případů, především pak u těch druhů hub, které produkují konidie s hydrofobním povrchem a bez mucilagenního pokryvu (GOTTWALD & TEDDERS 1982).

Tolerance k rozdílným teplotám je u entomopatogenních hub dosti vysoká. Délka vývojového cyklu probíhá v úzké korelaci s okolní teplotou. Optimální teploty jsou v rozmezí 20 – 30°C, krátkodobě mohou entomopatogenní houby přežívat i vysoké teploty v rozmezí 40 – 45°C. Klíčení konidií nejlépe a nejrychleji probíhá při teplotě 25°C. Velká část druhů entomopatogenních hub je však dokonale adaptována a přežívá i dlouhodobé působení velmi nízkých teplot. Ostatní působení abiotických faktorů nedosahuje tak velkého významu, jako je klíčové působení vlhkosti a teploty (McCOY et al. 1988, LANDA 1998).

## **2.4. Stručný přehled nejvýznamnějších druhů entomopatogenních hub**

### **2.4.1. *Isaria fumosorosea* WIZE**

Tento kosmopolitně rozšířený druh, známý pod starším jménem *Paecilomyces fumoso-roseus* (WIZE) BROWN et SMITH, je velmi polyfágní. Na infikovaném hostiteli se nejprve tvoří bílé vatovité mycelium, které je později nafialovělé barvy při plné sporulaci a vatovitý charakter tohoto mycelia přechází v prašný. Konidiofory tvořené na vzdušném myceliu jsou na hyfách umístěny v přeslenech. Konidie mající charakter cylindrického tvaru tvoří řetězkovité útvary, každý řetězek je tvořen až z 50 jednotlivých konidií (SAMSON 1974). Při optimálních podmínkách dokáže rychlá infekce patogena způsobit smrt molice ve všech vývojových stádiích (OSBORNE et al. 2010).

Teploty mezi 30 až 40°C jsou velmi limitující pro růst patogena než teploty 8 – 11°C. Optimum teplot pro růst této houby se pohybuje v rozmezí 20 – 30°C (VIDAL et al. 1997).

### **2.4.2. *Lecanicillium lecanii* R. ZARE et W. GAMS**

Tento druh, poprvé popsáný v roce 1861 a v dřívějších pracích často uváděný pod synonymickým jménem *Verticillium lecanii* (ZIMMERM.) VIERGAS je široce polyfágní entomopatogenní, používaný v biologické ochraně k boji proti třásněnkám, molcím a mšicím v zahradnictví. Druh se v přirozených podmínkách vyskytuje i jako patogen v populacích různých druhů brouků, motýlů a dvoukřídlého hmyzu (LANDA 1998).

Hlavním determinačním znakem tohoto druhu je typická forma sporulace. Na vzdušném myceliu v průběhu konidiogeneze se vytvářejí dlouhé typické lahvovitě

buňky, na jejichž konci se utvářejí elipsoidní konidie. Na myceliu jsou konidiofory utvářeny v přeslenech a protilehle z jedné zóny vyrůstají 2 až 4 konidiofory. Na konci hyf může být přeslen utvářen i větším množstvím konidioforů. Nově vytvořená konidiofora odtlačuje již dříve vytvořenou do shluku, která již drží kompaktní tvar (HALL 1985).

Klíčení patogena začíná pouze při vysoké relativní vzdušné vlhkosti (LANDA 1994), optimum pro klíčení spor je 97%, pro růst pak 85-90%. Teploty by měly být mezi 20 – 25°C (SAMSON & ROMBACH 1985).

#### **2.4.3. *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN**

Tento druh entomopatogenní houby byl poprvé popsán Metschnikoffem v roce 1879 jako entomopatogen proti druhu *Anisoplia austriaca* (*Coleoptera*, *Scarabaeidae*) (ZIMMERMANN 1993).

Vytvořené mycelium zcela pokryje tělo napadeného hostitele, konidiofory jsou v kompaktních shlucích, jednotlivé konidiofory se široce větví. Konidiofory se dosti často shlukují a tvoří sporodochia, která jsou jednoduchá nebo větvená (WATANABE 2002). ZIMMERMANN (1993) uvádí, že tato houba může infikovat více než sto druhů hmyzu, především z řádů *Orthoptera*, *Hemiptera*, *Coleoptera*, *Diptera*, *Lepidoptera* a *Hymenoptera*.

Jednotlivé kmeny mají širokou teplotní valenci pro růst. Je udáváno, že některé rostou při teplotách vyšších než 35°C a některé i při teplotách nižších než 12°C, avšak optimum teplot pro růst je mezi 25 až 30°C (BOUCIAS & PENDLAND 1998).

#### **2.4.4. *Beauveria brongniartii* (SACCARDO) PETCH**

Tato entomopatogenní houba je v přírodě vzácnější než známější *B. bassiana*, avšak je rovněž kosmopolitně rozšířena na hmyzu stejně jako v různých dalších prostředích. Její výskyt byl zaznamenán ve vysokohorských lesních oblastech a na dalších místech (ZIMMERMANN 2007).

Pro tuto houbu je charakteristická tvorba nejprve bílých a později nažloutlých, někdy však i načervenalých kolonií. Elipsoidní konidie jsou uspořádané samostatně či v malých skupinkách (ZIMMERMANN 2007).

Patogen sporuluje a roste při teplotách 2 až 33°C, nejlépe roste v teplotním rozmezí mezi 22 – 33°C (MUELLER-KOEGLER 1965).

## 2.5. *Beauveria bassiana* (BALSAMO-CRIV.) VUILLEMIN

K rodu *Beauveria* v současnosti patří tři významné druhy entomopatogenních hub: *B. bassiana*, *B. tenella* a *B. brogniartii*. *B. bassiana* patří mezi druhy nejvýznamnější (ZIMMERMANN 2007).

Entomopatogenní houba *B. bassiana* (BALSAMO-CRIVELLI) VUILLEMIN byla objevena před cca 170 lety. Objevil ji v roce 1834 italský vědec Agostino Bassi (1773-1856). Její určení provedl Giuseppe Balsamo Crivelli a popsal ji tehdy jako *Botrytis paradoxa*, později však změnil její pojmenování na *Botrytis bassiana* na počest jejího objevitele (DIRLBEKOVÁ 1991). V roce 1912 provedl Vuillemin revizi systematického zařazení a vytvořil v současnosti respektovaný rod *Beauveria* do něhož právě patří i druh *B. bassiana* (ZIMMERMANN 2007).

Taxonomicky lze *B. bassiana* zařadit dvěma způsoby. Jeden na základě anamorfy, neboli nepohlavního stádia a druhý na základě pohlavního stádia – teleomorfy:

- Taxonomické zařazení na základě anamorfy (VÁŇA 1998):

Třída: *Ascomycetes*

Pomocné oddělení: *Deuteromycotina*

Pomocná třída: *Hyphomycetes*

Pomocný řád: *Moniliales*

Rod: *Beauveria*

Druh: *Beauveria bassiana*

- Taxonomické řazení na základě teleomorfy (SUNG et al. 2007):

Třída: *Ascomycetes*

Řád: *Hypocreales*

Čeleď: *Cordycipitacea*

Rod: *Beauveria*

Druh: *Beauveria bassiana*

*B. bassiana* patří k převážně široce polyfágním druhům hub, které se velmi četně vyskytují v půdě a parazitují na půdním hmyzu, resp. na stádiích hmyzu, která se



vyskytují v půdě. Z hostitelů houba napadá především některé zástupce z řádů rovnokřídlí (např. krtonožky), brouci (např. larvy a kukly chroustů a chroustků, mandelinky bramborové, lalokonosců a mnoho dalších druhů), larvy a kukly motýlů a dvoukřídlého hmyzu. V poslední době byly izolovány i kmeny *B. bassiana*, které vykazují vysokou virulenci na různých druzích stejnokřídlého hmyzu (např. na molicích a mšicích) (GOETTEL et al. 2000, LANDA 1998).

Na umělých živných půdách i na infikovaném hostiteli vytváří houba mycelium, které je mléčně bílé barvy. Konidie jsou globoidního až subgloboidního tvaru o velikosti  $2,0 - 3,0 \times 2,0 - 2,5 \mu\text{m}$ . Konidiogenní struktury tvoří husté shluky. Optimální teplota růstu je mezi 23 až 26°C, maximální teplota pro růst mycelia je 28 – 31°C (DIRLBEKOVÁ 1991). Nastanou-li ideální podmínky, začíná klíčení konidií po 10ti hodinách od doby přichycení patogena k povrchu hostitele a je dokončeno zhruba po 20ti hodinách.

*B. bassiana* je snadno kultivovatelná na pevných i tekutých živných půdách. Pro masovou produkci jsou často využívány dvoufázové a submerzní kultivační technologie. Při submerzních kultivacích vzniká směs blastospor a konidií. Konidie vznikají téměř stejně rychle jako blastospor, ale bývají stálejší (FENG et al. 1994).

Stejně jako všechny druhy entomopatogenních hub, tak i *B. bassiana* napadá svého hostitele přes kutikulu. Infekční cyklus se skládá z několika fází (ZIMMERMANN 2007): nejprve dochází k přichycení spor na kutikulu hostitele, poté spory klíčí a dochází k penetraci kutikuly hostitele, pak infekční tlak patogena překoná obranný imunitní systém hostitele a dojde k proliferaci (prorůstání) do těla hmyzího hostitele, nakonec dochází ke smrti hostitele a koniogenezi patogena (saprofytická fáze cyklu vývoje).

K uchycení konidií k povrchu kutikuly hostitele je dosaženo pomocí silných vazebních sil a tento proces je pasivní. Toto uchycení je vytvořeno nesespecifickými adhezními silami mezi epikutikulou hostitele a hydrofobním povrchem konidií či prostřednictvím elektrostatických sil. Na adhezi konidií k tělu hostitele se podílejí také řady látek, zejména hemaglutiny, N-acetylglukosamin či glykoproteiny (BOUCIAS et al. 1988). Klíčení konidií, jsou-li přichyceny na povrchu hostitele, není patrně závislé na příjmu živin z externích zdrojů, neboť konidie má sama zásobních látek dostatečné množství (BOUCIAS et al. 1988).

Hostitelovou smrtí začíná saprofytická fáze vývoje cyklu patogena. Houba *B. bassiana* vytváří uvnitř těla usmrceného hostitele masu mycelia a dochází k mumifikaci

hostitele. Při optimálních podmínkách dochází na povrchu těla mumifikovaného hostitele ke sporulaci. Mycelium vně prorůstá a dochází ke konidiogenezi. Nejsou-li ideální podmínky pro sporulaci, zvláště je-li nízká relativní vzdušná vlhkost, patogen může setrvávat v těle mumifikovaného hostitele v perzistentní fázi v podobě mycelia. (BOUCIAS & PENDLAND 1998).

K méně prozkoumaným oblastem je endofytický růst mitosporických hub, o kterém hovoří ve vztahu ke kukuřici INGLIS et al. (2001). Rostliny kukuřice (*Zea mays*) byly inokulované houbou *B. bassiana* a další studie potvrdily, že tato houba se dostává do rostlinných pletiv a zůstává tam po celou dobu vegetační sezóny (BING & LEWIS 1991). Vytváří tak s rostlinami kukuřice vztah, díky němuž může navodit sezónní supresi zavíječe kukuřičného (COOMBS & COOMBS 2003).

## 2.6. Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub

Prvé masové použití entomopatogenních hub sahá již do roku 1888, kdy bylo použito Krassiltschikem. Jejich vývoj, jako biopesticidů proti škodlivým činitelům byl však velmi pomalý a objevení účinných chemických látek v letech 1939-1945 (především DDT) snížilo zájem jejich používání. Teprve po prokázání negativních dopadů na životní prostředí a vysokých zdravotních rizik používáním chemických (především syntetických polychlorovaných) látek začátkem 60. let 20. století se opět o biopesticidy zvýšil zájem (GLARE 2004).

Konidie nebo blastospory tvoří účinnou složku většiny biopreparátů na bázi entomopatogenních hub. Konidie jsou produkovány formou povrchových kultivací na tekutých živných půdách. Blastospory entomopatogenních hub jsou produkovány ve fermentačních biotechnologiích a využívají fenoménu změny morfologické formy patogena po proniknutí do tělní dutiny hostitele. Přes určité zásadní odlišnosti jsou však biopreparáty na bázi konidií nebo blastospor stejné v tom, že obsahují konkrétní počet vitálních, virulentních infekčních jednotek schopných přímo vyvolat infekci, které jsou doplněny o inertní nebo nutritivní složky. Nejčastěji jsou tyto biopreparáty formulovány do ve vodě rozpustných prášků (WP) nebo granulí (WDG), v současnosti se také začínají používat i olejové suspenzní koncentráty (LANDA 1998).

Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub musejí splňovat řadu kvalitativních a kvantitativních kritérií a podléhají kompletnímu registračnímu procesu. K hlavním parametrům kvalitativní povahy patří garance druhu a kmene patogena; specifikace podílu aktivní a doplňkové složky v biopreparátu a maximální přípustná kontaminace

(zastoupení cizorodých biotických příměsí, např. bakterií, v 1 g/ml přípravku). Mezi hlavní kvantitativní parametry houbových biopreparátů patří především (LANDA 1998):

- počet infekčních jednotek – tzv. titr konidií (blastospor)
- klíčivost konidií (blastospor) – garantovaná vitalita konidií nebo blastospor udávaná v %
- počet kolonie tvořících jednotek – specifický údaj kvalitativní povahy, udávající z kolika jednotek patogena přítomných v 1 g/ml biopreparátu se při kultivaci na umělé živné půdě vytvoří samostatná kolonie.

Zajímavou skupinu biopreparátů na bázi entomopatogenních hub tvoří přípravky jejichž aktivní složku tvoří buď neinfekční formy biomasy hub nebo infekční jednotky imobilizované v organických nebo anorganických nosičích. Tyto formulace byly cíleně vyvinuty pro účely aplikaci do půdy. V podstatě jsou známe dvě základní verze těchto formulací, které popisuje LANDA (1998):

- *biopreparáty na bázi myceliových granulí* – patogen je finalizován do formy sušených myceliových fragmentů, které po aplikaci do půdy jímají vodu a postupně regenerují do standardní formy mycelia, na kterém se tvoří konidie, které mohou infikovat hmyzího hostitele

- *biopreparáty na bázi alginátových pelet* – smíšená biomasa patogena je společně s nutritivní složkou imobilizována do drobných pelet, jež po aplikaci do půdy jímají vodu, imobilizovaná houba regeneruje a s využitím živin, které jsou součástí pelety realizuje kompletní saprofytický cyklus, jehož výsledkem je tvorba nové generace konidií.

Mezi první registrované přípravky lze přiřadit přípravek Mycar<sup>®</sup>, který byl na bázi entomopatogenní houby *Hirsutella thompsonii* zaregistrován v roce 1981. Firma Tate & Lyle v Anglii zaregistrovala přípravek Vertalec<sup>®</sup> na bázi houby *Lecanicillium lacanii*, který je používán proti mšicím a přípravek Mycotal<sup>®</sup> využívaný v ochraně proti molicím ve sklenících. Významné jsou však také mykoinsekticidní přípravky na bázi houby *Isaria fumosorosea* (syn. *Paecilomyces fumosoroseus*) – např. přípravek PreFeRal<sup>®</sup> používaný proti mšicím, molicím a třásněnkám (GLARE 2004). Mezi významné mykoinsekticidy patří také houba *Beauveria bassiana*. Ze všech biopreparátů na bázi entomopatogenních hub, se *B. bassiana* z 33,9% řadí mezi nejpoužívanější (FARIA & WRAIGHT 2007). Velmi dobrých výsledků proti lýkožroutu smrkovému (*Ips typographus*) je dosahováno s biopreparátem Boverol<sup>®</sup>, který v laboratorních

podmínkách v koncentraci  $1,0 \times 10^7$  konidií/ml a při teplotě 25°C způsobuje až 99-100% úmrtnost brouků (KREUTZ et al. 2004).

**Tab. č. 1: Přípravky na bázi *B. bassiana* registrované v Evropě – upraveno dle práce FARIA & WRAIGHT (2007).**

Obchodní název přípravku	Země registrace přípravku	Propagule / formulace <sup>2</sup>	Cílové skupiny organismů řády a čeledi
Boverol <sup>1</sup>	ČR	C/WP	<i>Coleoptera (Chrysomelidae)</i>
Boverosil <sup>1</sup>	ČR	C/WP	<i>Coleoptera (Curculionidae)</i>
Ostrinil	Francie	C+H/TK	<i>Lepidoptera (Crambidae)</i>
Trichobass-L	Španělsko	C/OD	<i>Coleoptera (Curculionidae, Scarabaeidae), Lepidoptera (Castiniidae, Pieridae), Hemiptera (Aleyrodidae, Thysanoptera (Thripidae) + Acari (Tetranychidae)</i>
BotaniGards ES	Dánsko, Itálie, Švédsko, Španělsko	C/OD	<i>Coleoptera (Curculionidae, Scarabaeidae), Hemiptera (Aleyrodidae, Aphididae, Pseudococcidae, Psyllidae), Thysanoptera (Thripidae)</i>
BotaniGards 22WP	Dánsko, Itálie, Švédsko, Španělsko	C/WP	<i>Coleoptera (Curculionidae, Scarabaeidae), Hemiptera (Aleyrodidae, Aphididae, Cicadellidae, Fulgoridae, Miridae, Pseudococcidae, Psyllidae), Thysanoptera (Thripidae)</i>
Mycotrol O	Dánsko, Itálie, Švédsko	C/OD	<i>Coleoptera (Chrysomelidae, Curculionidae, Scarabaeidae), Hemiptera (Aleyrodidae, Aphididae, Cicadellidae, Fulgoridae, Miridae, Pseudococcidae, Psyllidae), Lepidoptera (Crambidae, Noctuidae, Pieridae, Plutellidae), Orthoptera (Acrididae, Tettigoniidae), Thysanoptera (Thripidae)</i>
Mycotrol WP	Dánsko, Itálie, Švédsko	C/WP	<i>Coleoptera (Chrysomelidae, Curculionidae, Scarabaeidae), Hemiptera (Aleyrodidae, Aphididae, Cicadellidae, Fulgoridae, Miridae, Pseudococcidae, Psyllidae), Lepidoptera (Crambidae), Orthoptera (Acrididae, Tettigoniidae), Thysanoptera (Thripidae)</i>
Naturalis L (= Feromone Naturalis L-225)	Řecko, Itálie, Švýcarsko, Španělsko	C/OD	<i>Coleoptera (Chrysomelidae, Curculionidae, Scarabaeidae), Diptera (Ephydriidae, Mycetophilidae, Sciaridae, Tipulidae), Hemiptera (Lygaeidae, Miridae, Cercopidae, Cicadellidae, Aleyrodidae, Aphididae, Pseudococcidae, Psyllidae), Hymenoptera (Formicidae), Lepidoptera (Crambidae, Gelechiidae, Geometridae, Noctuidae, Tortricidae), Orthoptera (Acrididae, Gryllotalpidae), Thysanoptera (Thripidae) + Acari (Eriophyidae, Tetranychidae) + Crustacea + Diplopoda</i>

<sup>1</sup> v současnosti není biopreparát v ČR registrován

<sup>2</sup> C+H – konidie + hyfy (formulaci tvoří kolonizovaný pevný substrát), C – vzdušné konidie, WP – smáčitelné prášky, OD – dispersní olej, TK – technický koncentrát.

## 2.7. Biotesty a entomopatogenní houby

Celkově se dá říci, že neexistují žádné standardní metody biotestů, neboť existuje velké množství entomopatogenních hub se širokým spektrem hostitelských druhů. Proto je využívání biotestů k posuzování vlivu entomopatogenních hub na hmyz téměř neomezené. V rámci konkrétního patogena a hostitele však musí být biotest standardizován. Musí být také stanoveny cíle jeho vypracování. Mezi pět významných vlastností biotestů v rámci entomopatogenních hub patří: determinace virulence, určení spektra hostitelů, porovnání virulence jednotlivých izolátů, determinace epizootického potenciálu a v neposlední řadě také vliv abiotických a biotických faktorů (BUTT & GOETTEL 2000).

Postup biotestu musí být spolehlivý a účinný. Výstupem biotestu mají být objektivní a smysluplné informace. Je potřeba také zvážit volbu vhodného hostitele, infekční propagule, inokulační metody, podmínky inkubace, formulace inokula a metody hodnocení úmrtnosti (mortality) hostitele. K dalším důležitým aspektům v souvislosti s vlivem určitého druhu patogena na necílové organismy patří také hodnocení rizika. Biologická testování, která provádíme, by v sobě měla zahrnovat také tzv. neošetřenou kontrolu. Cílem této metody je monitorování přežívání hostitele v postinokulačním prostředí inkubace ve srovnání s hostitelem, který byl inokulován námi vybraným druhem cílového patogenu. Tato metoda je ošetřena pouze nosičem, jenž je používán k aplikaci inokula. Vždy je však nutné, ať již používáme testování na jednotlivých druzích vybraných hostitelů, nebo na necílových organismech, aby hostitel, u něhož je prokázána citlivost na testovaného patogena, byl paralelně ošetřen společně s necílovými organismy pro účely pozitivní kontroly. Jinak by se negativní výsledek dal jen velmi těžko interpretovat, neprokážeme-li virulenci inokula vybraného druhu hostitele za stejných podmínek biotestu (BUTT & GOETTEL 2000).

Ke známým standardizovaným biotestům patří např. biotest zaměřený na mortalitu zavíječe kukuřičného (*Ostrinia nubilalis*) při určení věku efektu specifické dávky entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* (FENG et al. 1985). K dalším patří biotest na bázi entomopatogenních hub *B. bassiana*, *Isaria fumosorosea* a *Lecanicillium lacanii* proti molicím, jenž je založen na rychlém tempu růstu a vývoje vybrané entomopatogenní houby na nymfách hostitele (LANDA et al. 1994). FRANSEN et al. (1987) zkoumal vliv entomopatogenní houby *Aschersonia aleyrodis* (Ascomycota, *Hypocreales*) na mortalitu jednotlivých vývojových stádiích hostitele tohoto patogena – molici skleníkové (*Trialeurodes vaporariorum*).

## **2.8. Základní metody v biotestu**

### **2.8.1. Inokulace**

Tato metoda (inokulační metoda) je závislá na druhu hostitele a na formě a především množství inokula. Inokulum bývá většinou naneseno na povrch hostitelovy kutikuly přímými metodami – např. máčením, práškováním, stříkáním nebo nepřímými metodami s využitím návnad (FARGUES et al. 1996).

### **2.8.2. Inkubace**

Při inkubační metodě je hostitel po inokulaci patogena silně ovlivněn několika významnými parametry. K těm nejdůležitějším podmínkám, kterým je hostitel vystaven, patří teplota, vlhkost a záření. Jak bylo zjištěno v laboratorních testech, tak infekci mohou vyvolávat entomopatogenní houby v širokém rozmezí teplot (10 – 30°C), při čemž k optimálním teplotám patří rozpětí mezi 20 – 25°C. Růst přestává u většiny entomopatogenních hub při teplotě nižší než 10°C, při teplotě vyšší než 35°C se růst už téměř zastavuje. K dalším významným faktorům inkubace patří relativní vlhkost. Pro klíčení i myceliální růst je u většiny hub potřeba, aby tato hodnota byla vyšší než 90-95% (BUTT & GOETTEL 2002). K dalším neméně důležitým podmínkám inkubace patří záření. Propagule většiny entomopatogenních hub nejsou odolné proti UV-B záření (280 – 320 nm) a v menší míře i proti UV-A (320 – 400 nm). V rámci jednotlivých rodů a kmenů však byl pozorován významný rozdíl citlivosti k ozařování (FARGUES et al. 1996).

## **2.9. Kultivace entomopatogenních hub v in vitro prostředí**

HUMBER (1997) považuje drtivou většinu entomopatogenních vláknitých hub za dobře rostoucí na mnoha běžných druzích umělých médií, pouze malé množství z nich nelze či je velmi obtížné pěstovat v in vitro podmínkách nebo jen se zvláštními nutričními požadavky. Velká část entomopatogenních vláknitých hub jsou fakultativními patogeny a většinou snadno rostou v kulturách na definovaných médiích (GOETTEL & INGLIS 1997).

### ***Povrchová kultivace***

Drtivá většina entomopatogenních vláknitých hub vytváří velké množství malých hydrofobních konidií v kompaktních shlucích (WRAIGHT et al. 2001).

Mikromycety mohou klíčit, růst a produkovat množství konidií i přes značnou variabilitu vzhledem k velikosti kolonií a potenciálu k produkci konidií (FENG et al. 1994). Pro produkci masy konidií se používá povrchová kultivace (GOETTEL & INGLIS 1997). Pro kultivaci hub je potřeba pevné či tekuté půdy nebo substrátu, jako je agar, řepa, brambory, rýže, proso, Sabouraud's dextrose agar, sladinka aj. (WEISER 1991). K nejpoužívanějším médiím patří Sabouraud's dextrose agar, což je agar obohacený o kvasnicový extrakt (SDAY). K dalším často používaným patří „corn meal agar“ (CMA), „Czapeck-Dox“, „malt extract agar“ (MEA), „nutrient agar“ (NA) či „Potato dextrose agar“ (PDA). K produkci větší masy konidií se častěji používají substráty jako je rýže, otruby nebo obiloviny (GOETTEL & INGLIS 1997).

### ***Vliv kultivace na vlastnosti spor***

K důležitým vlastnostem především patří zjistit jaké je teplotní optimum a teplotní limity pro kultivaci hub, aby mohla být získána požadovaná produkce. Prostředí kultivace mohou významně ovlivnit toleranci *B. bassiana* k teplotnímu stresu. Optimální teplota růstu je udávána mezi 23 – 26°C, maximální teplota myceliálního růstu je mezi 28 – 31°C (DIRLBEKOVÁ 1991). Kultivace se dá významně ovlivnit také složením média. Přizpůsobení podmínek pro živiny během růstu a sporulace *B. bassiana* ovlivňuje jejich životnost i životnost konidií (LANE et al. 1991). K důležitým vlastnostem patří také množství dostupných nutričních látek, které výrazně ovlivňují růst kultury, sporulaci a také morfologii entomopatogenních hub. Růst a sporulaci kultury lze ovlivnit také objemem média v jedné Petriho misce (KAMP & BIDOCHKA 2002).

Živným médiem lze ovlivnit nejen růst kultur, avšak může dojít i k negativnímu ovlivnění kultury. Dlouhodobou kultivací na umělých živných půdách může dojít až ke snížení virulence, případně dalších fenotypových vlastností, např. omezení vitality, hustoty a již zmíněné schopnosti napadat patogena (GOETTEL & INGLIS 1997). U některých entomopatogenních hub může vzniknout vzhledem k opakované či i jednorázové kultivaci na umělém živném médiu (BUTT 2002). Při opětovné kultivaci některých kmenů entomopatogenních hub na umělých živných médiích může v budoucnu dojít ke snížení virulence k hostiteli nebo může dojít až k úplné ztrátě virulence (GOETTEL 1992).

Rychlost snižování virulence nebo úplné ztráty virulence závisí více na jednotlivém kmeni než na druhu entomopatogenní houby. Svojí virulenci jsou některé

kmeny *B. bassiana* schopny si udržet i po dlouhodobé opakované kultivaci v in vitro podmínkách (INGLIS et al. 2001).



### 3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této diplomové práce je objektivní porovnání virulence jednotlivých endemických kmenů entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* na mortalitu larev potemníka moučného (*Tenebrio molitor*) v různých teplotách prostředí.

Dalším důležitým cílem této práce je zjištění vlivu různých teplot (při 10°C, 20°C a 30°C) na produkci spor vybraných kmenů *B. bassiana* při kultivaci na přirozených substrátech (rýže dlouhozrná, ječné kroupy, semena řepky olejky).

Třetím cílem je porovnání růstu a produkce spor středových kultur vybraných kmenů *B. bassiana* při kultivaci na umělých živných půdách (PDA, SDA, CMA) za rozdílných teplot.

## 4. MATERIÁL A METODIKA

### 4.1. Endemické kmeny entomopatogenní houby *Beauveria bassiana*

V pokusech bylo testováno několik kmenů entomopatogenní houby *Beauveria bassiana*. Byly používány různé kmeny ze mykologických sbírek Katedry rostlinné výroby a agroekologie ZF JČU v Českých Budějovicích. Všechny kmeny *B. bassiana* byly uschovány ve formě suchých alginátových pelet zmrazené a skladované při teplotě -20°C až -24°C. Testované kmeny *B. bassiana* - viz Tab. č. 1.

**Tab. č. 2: Jednotlivé testované kmeny houby *Beauveria bassiana*.**

Označení kmene <i>B. bassiana</i>	zdroj	původ	rok
NP 0004	<i>Ips typographus</i>	NP Šumava	2008
NP 0008	<i>Ips typographus</i>	NP Šumava	2008
I 101	<i>Ips typographus</i>	NP Šumava	2004
T 08	<i>Ips typographus</i>	SR, Tatry	2006
A32	kůra	Rumunsko	2006
USA 01	půda	U.S.A. - Florida	2003

Při této formulaci je biomasa patogena inkorporována do alginátových pelet, které se získávají přípravou základní směsi biomasy patogena s nutričním či inertním aditivem, do něhož se přidá Na-alginát (sodná sůl kys. albinové). Tato směs s Na-alginátem se pomalu nakapává do roztoku CaCl<sub>2</sub>, kde se tvoří kuličky. Kuličky se nechávají 1 až 2 hodiny vydrtit. Takto vytvrzené kuličky se opláchnou vodou a usuší na malé „alginátové pelety“, které umožňují uchovávání kmenů *Beauveria bassiana* v mykologických sbírkách.

Aktivace pelet jednotlivých kmenů *B. bassiana* byla prováděna v Petriho miskách na povrchu 2% vodního agaru. Pelety, které jsou vystaveny vysoké vlhkosti, začínají zanedlouho bobtnat. Konidie na povrchu reaktivovaných pelet jsou vytvořeny za 5 až 7 dnů. Konidie, které se získají z vysporulovaných pelet se použijí pro inokulaci na povrch živného media PDA („Potato Dextrose Agar“). Získané médium se musí vysterylizovat a poté se rozlije do sterilních plastových Petriho misek. Po vychladnutí média byla na jeho povrch inokulována houba *B. bassiana*. Houby byly kultivovány 14 dní. Získané kultury testovaných kmenů byly použity k pokusům.

## 4.2. Příprava suspenze

Povrch vyspolulované kultury jednotlivých endemických kmenů *B. bassiana* byl přelit roztokem sterilní destilované vody s přídavkem detergentu 0,05 % Tween 80. Koncentrace konidií v získané suspenzi byla počítána pomocí počítačící komůrky – hematocytometru (Neubauerova vylepšená komůrka) (viz Grafická příloha 1). Suspenze byly adjustovány na standardní titr  $1,0 \times 10^6$  konidií v 1 ml adekvátním ředěním původní suspenze.

## 4.3. Larvy potemníka moučného (*Tenebrio molitor*)

V pokusech byly používány larvy potemníka moučného (*Tenebrio molitor*), které byly pořizovány z chovů specializovaných prodejen (snadná dostupnost, není nutné udržovat vlastní chov, věková synchronizace larev). Larvy byly trvale přechovávány v klimatizovaných místnostech KRV ZF JČU. Při zakládání pokusů byly larvy vždy sterilizovány, aby nedošlo ke kontaminaci pokusů. Do biotestů byly vybírány vždy larvy bez vnějších znaků poškození.

## 4.4. In vivo testy

Pro ověření vlivu virulence různých kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na mortalitu larev *Tenebrio molitor* bylo vypracováno základní schéma biotestu. Nejprve bylo připraveno potřebné množství sterilních vlhkých komůrek na každý jednotlivý kmen *B. bassiana* pro 25 opakování (pro teploty 10°C, 20°C a 30°C). Do sterilních komůrek byl vložen sterilní filtrační papír a přidáno 150 µl destilované vody. Byly vybrány larvy stejné velikosti, které byly nejprve vysterilizovány v 0,05 roztoku NaClO (1% roztok přípravku Savo, který obsahuje 5% zmíněné chemické látky) a poté třikrát opláchnuty ve sterilní destilované vodě. Pak byly dány na sterilní papír k oschnutí. Poté byly na 2 sekundy ponořeny do suspenze s danými kmeny entomopatogenní houby *B. bassiana* a přebytek suspenze byl vysušen sterilním filtračním papírem (GOETTEL et INGLIS 1997). Do každé z připravených komůrek byla vložena vždy 1 takto ošetřená larva. Ke každému pokusu zvlášť byla vždy připravena kontrolní varianta – larvy byly namočeny pouze v 0,05 % roztoku Tween 80. Inkubace larev probíhala při teplotách 10°C, 20°C a 30°C.

Test byl vyhodnocován každý druhý den po dobu následujících 20 dní ode dne založení. Při vyhodnocování jednotlivě založených pokusů byl každý jedinec zařazen do

stupnice FDI (Fungus Development Index), kterou již dříve popsal HORŇÁK (2004) – viz Grafický list 2.

#### **4.5. In vitro testy**

##### **Kultivace a výtěžnost spor vybraných kmenů *B. bassiana* na různých přirozených substrátech za rozdílných teplot**

U vybraných kmenů *B. bassiana* (viz výše) byla testována výtěžnost spor při různých teplotách inkubace (10°C, 20°C a 30°C). Jako přirozených substrátů bylo použito: rýže dlouhozrná, ječné kroupy, semena řepky olejky. Suspenze spor daných kmenů byly připraveny na koncentraci  $1,0 \times 10^6$  konidií/1 ml (kultury pro přípravu inokula byly kultivovány na PDA po dobu 14 dní a teplotě 20°C).

Do Erlenmayerových baněk o objemu 250 ml bylo vždy naváženo 25 g vzorku daného substrátu a následně byly baňky důkladně vysterilizovány. Do každé z baněk bylo odměřeno 12,5 ml suspenze daného kmene a byla připravena 3 opakování pro každou kultivační teplotu (10°C, 20°C a 30°C) a pro každý z jednotlivých hodnocených kmenů (1 opakování bylo děláno jako rezervní).

Pokus byl vyhodnocen za 14 dní od jeho založení, obsah Erlenmayerových baněk byl vymyt v 2% roztoku jaru s vodou a následně byla spočítána koncentrace konidií pomocí hemacytomu pod mikroskopem (viz Grafický list 1).

##### **Kultivace spor jednotlivých kmenů *B. bassiana* na umělých živných půdách za rozdílných teplot**

U vybraných kmenů *B. bassiana* (viz výše) byla otestována výtěžnost spor při kultivaci na umělých živných substrátech za rozdílných teplot inkubace (10°C, 20°C a 30°C). Jako umělého živného media bylo použito těchto půd: PDA („Potato Dextrose Agar“), SDA („Sabouraud Dextrose Agar“), CMA („Corn Meal Agar“). Inokulum - suspenze spor daných kmenů byly připraveny na koncentraci  $1,0 \times 10^6$  konidií/1 ml (kultury pro přípravu inokula byly 14 dní kultivovány na PDA při teplotě 20°C).

Středové kultury byly připraveny pomocí inokulační kličky nanesením kapky inokula daného kmene *B. bassiana* do středu Petriho misky s různým druhem umělé živné půdy (viz Grafický list 4). Bylo připraveno vždy 5 kultur pro jednu variantu (kmen) a kultivační teplotu (1 kultura byla brána jako rezerva).

Vyhodnocení pokusu bylo provedeno po 21 dnech kultivace, přičemž byly hodnoceny tyto parametry: radiální růst a výtěžnost. Velikost kolonií (radiální růst) byla změřena pod binokulárním mikroskopem. Výtěžnost konidií byla počítána pomocí počítačící komůrky – hematocytometru (Neubauerova vylepšená komůrka) (viz Grafická příloha 1).

#### 4.6. Klíčivost – GI stupnice

Klíčivost byla hodnocena dle vývoje spor pomocí GI testu (Germination Index) (LANDA et al. 1994). Jako substrátu bylo použito 2% vodního agaru, jenž neobsahuje žádné živiny. Příprava testu začínala rozlitím sterilního agaru na podložní mikroskopické sklíčko, které bylo dostatečně tlusté. Toto sklíčko bylo poté vloženo do vlhké komůrky, v níž byl navlhčený filtrační papír 0,5 ml sterilní destilované vody. Po zaschnutí agaru na sklíčku byla na jeho povrch nanášena suspenze spor houby tak, že se v řadě probíhající středem sklíčka nanaslo inokulační kličkou deset kapek suspenze, která se nechala důkladně zaschnout a poté se takto připravené sklíčko uložilo do vlhké komůrky, která se kultivovala uzavřená v plastovém sáčku zabraňujícím ztrátě vlhkosti v teplotě 20°C. Hodnocení klíčivosti a GI probíhalo po 24 hodinách. Hodnotilo se minimálně 100 náhodně vybraných konidií, které byly hodnoceny pod optickým mikroskopem. Konidie byla považována za klíčivou pokud nabobtnala a na jejím konci se objevil počátek klíčící hyfy. Z poměru neklíčivých konidií k celkovému počtu hodnocených konidií se poté stanovila klíčivost v procentech. GI index byl hodnocen pomocí indexové stupnice od 0 do 3 (viz Tab. č. 3).

**Tab. č. 3: Stupnice používaná pro hodnocení klíčivosti spor entomopatogenních hub (GI - stupnice).**

0	Na konidii nejsou viditelné žádné morfologické změny, konidie ve vzorku mají uniformní tvar
0,5	Konidie je již zřetelně protáhlejší Jednostranný klíček je v poměru přibližně 1:0,5
1,0	Velikost klíčku je v poměru 1:1 k velikosti matečné konidii
1,5	Klíček je 2-3x delší než matečná konidie Na matečné konidii jsou zřejmé 2 kratší klíčky
2,0	Klíček je více než 3x tak dlouhý jako matečná konidie Sekundární větvení Dva dlouhé klíčky
2,5	Na hyfách jsou zjištěny konidiofory bez nových konidií nebo s 1 konidií
3,0	V hodnoceném vzorku jsou zjištěny konidiofory, na kterých jsou vytvořené nové konidie, více než 3-5 na konidioforu

#### **4.7. Ostatní údaje metodiky**

Ve vyhodnocování pokusů byl použita binokulární lupa a mikroskop Zeiss. Všechny použité obrázky byly zpracovány ve formátu „.jpg“ a upraveny pomocí programu Adobe – PhotoShop. Obrázky byly v konečné formě upraveny v programu MS Word 2003, grafické listy byly zpracovány v programu MS Excel 2003.

## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1. In vivo testy – laboratorní biotest

#### Porovnání průběhu FDI kmenů *Beauveria bassiana* v rámci různých teplot standardního biotestu na larvách potěmníka moučného (*Tenebrio molitor*)

##### Základní schéma pokusu:

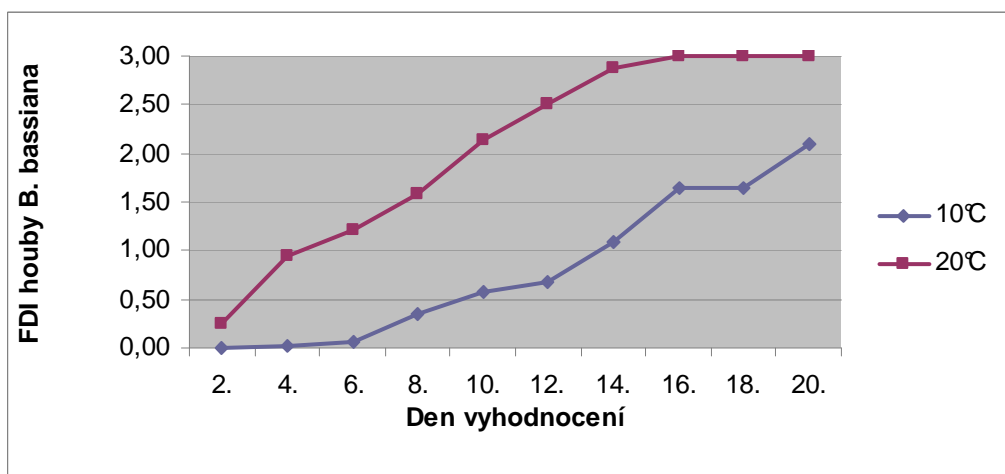
- do 25 sterilních komůrek byl vložen sterilní filtrační papír
- poté bylo přidáno 150  $\mu$ l destilované vody
- byly vybrány larvy stejné velikosti, které byly nejprve vysterilizovány v 0,05% roztoku NaClO a poté opláchnuty vodou
- larvy byly poté na 2 sekundy ponořeny do suspenze o koncentraci spor  $1 \times 10^6$ /ml s daným kmenem *B. bassiana* a dány do jednotlivých komůrek
- ke každému pokusu zvlášť byla vždy připravena kontrolní varianta – larvy byly namočeny pouze v 0,05 % roztoku Tween 80
- test byl vyhodnocován každý druhý den po dobu následujících 20 dní
- každý inokulovaný jedinec *Tenebrio molitor* byl zařazen do příslušné hodnoty na stupnici FDI

**Tab. č. 4: Vyhodnocení průběhu testu virulence kmene NP 0004 entomopatogenní houby *B. bassiana* při rozdílných teplotách inkubace (FDI  $\pm$  SE)**

Den / teplota	10°C	20°C	30°C*
2.	0,00 $\pm$ 0,00	0,44 $\pm$ 0,50	-
4.	0,00 $\pm$ 0,00	1,32 $\pm$ 0,31	-
6.	0,00 $\pm$ 0,00	2,08 $\pm$ 0,44	-
8.	0,30 $\pm$ 0,24	2,40 $\pm$ 0,24	-
10.	0,66 $\pm$ 0,23	2,70 $\pm$ 0,24	-
12.	0,92 $\pm$ 0,23	2,88 $\pm$ 0,21	-
14.	1,30 $\pm$ 0,24	3,00 $\pm$ 0,00	-
16.	1,50 $\pm$ 0,00	3,00 $\pm$ 0,00	-
18.	1,62 $\pm$ 0,21	3,00 $\pm$ 0,00	-
20.	1,92 $\pm$ 0,23	3,00 $\pm$ 0,00	-

\* Teplota 30°C nemohla být u kmene NP 0004 vyhodnocena z důvodu rozvinutí bakteriální infekce v založeném pokusu.

**Graf č. 1: Grafické znázornění průběhu testu virulence kmene NP 0004 entomopatogenní houby *B. bassiana* ve všech hodnocených teplotách prostředí**



Šumavský kmen NP 0004 vykazuje v laboratorním biotestu při teplotě 20°C velmi podobných výsledků jako kmen NP 0008. Při teplotě 10°C je hodnoty FDI 1,5 dosaženo již po 8,2 dnech, při teplotě 20°C je hodnota FDI 1,5 dosažena již po 3,7 dnech (viz Tab. č. 10). Kmen NP 0004 velmi dobře roste ve 20°C, při teplotě 10°C je rychlost vývoje na larvách již podstatně pomalejší. Při teplotě 20°C byla mortalita larev *T. molitor* po 6 dnech biotestu již 100%, při teplotě 10°C byla mortalita larev 100% až v 16. den pokusu. Teplota 30°C nemohla být vyhodnocena z důvodu silného rozvinutí bakteriální infekce v pokusu.

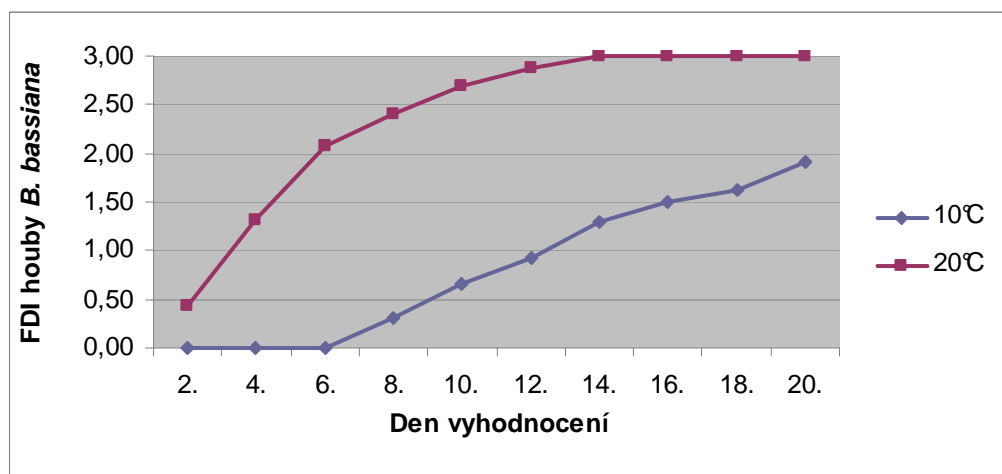
**Tab. č. 5: Vyhodnocení průběhu testu virulence kmene NP 0008 entomopatogenní houby *B. bassiana* při rozdílných teplotách inkubace (FDI ± SE)**

Den / teplota	10°C	20°C	30°C*
2.	0,00±0,00	0,24±0,43	-
4.	0,02±0,10	0,94±0,45	-
6.	0,06±0,22	1,22±0,47	-
8.	0,34±0,42	1,58±0,18	-
10.	0,58±0,23	2,14±0,30	-
12.	0,68±0,24	2,50±0,32	-
14.	1,08±0,28	2,88±0,21	-
16.	1,64±0,22	3,00±0,00	-
18.	1,64±0,22	3,00±0,00	-
20.	2,10±0,24	3,00±0,00	-

\* Teplota 30°C nemohla být u kmene NP 0008 vyhodnocena z důvodu rozvinutí bakteriální infekce v založeném pokusu.



**Graf č. 2: Grafické znázornění průběhu testu virulence kmene NP 0008 entomopatogenní houby *B. bassiana* ve všech hodnocených teplotách prostředí**



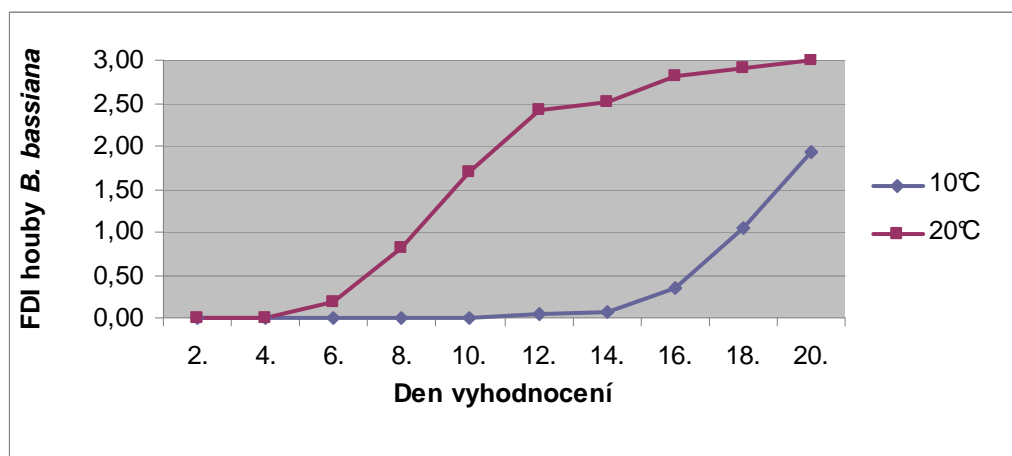
Dosti podobných výsledků při teplotě 20°C stejně jako šumavský kmen NP 0004 vykazuje v laboratorním biotestu i tento šumavský kmen NP 0008. Hodnota FDI 1,5 je při teplotě 20°C dosažena již po 3,9 dnech, naopak při teplotě 10°C je hodnoty FDI 1,5 dosaženo až po 16,6 dnech (viz Tab. č. 10). Obdobně jako šumavský kmen NP 0004, tak i kmen NP 0008 velmi dobře roste při teplotě 20°C, při 10°C je rychlost vývoje na larvách již podstatně pomalejší. Při teplotě 20°C byla 100% mortalita larev *T. molitor* již ve 4. den biotestu, při teplotě 10°C byla 100% mortalita larev až ve 14. den pokusu. Teplota 30°C nemohla být vyhodnocena z důvodu silného rozvinutí bakteriální infekce v pokusu.

**Tab. č. 6: Vyhodnocení průběhu testu virulence kmene I 101 entomopatogenní houby *B. bassiana* při rozdílných teplotách inkubace (FDI ± SE)**

Den / teplota	10°C	20°C	30°C*
2.	0,00±0,00	0,00±0,00	-
4.	0,00±0,00	0,00±0,00	-
6.	0,00±0,00	0,18±0,24	-
8.	0,00±0,00	0,82±0,55	-
10.	0,00±0,00	1,70±0,79	-
12.	0,04±0,14	2,42±0,88	-
14.	0,08±0,18	2,52±0,87	-
16.	0,36±0,44	2,82±0,40	-
18.	1,04±0,69	2,90±0,24	-
20.	1,94±0,96	3,00±0,00	-

\* Teplota 30°C nemohla být u kmenu I 101 vyhodnocena z důvodu rozvinutí bakteriální infekce v založeném pokusu.

**Graf č. 3: Grafické znázornění průběhu testu virulence kmene I 101 entomopatogenní houby *B. bassiana* ve všech hodnocených teplotách prostředí**



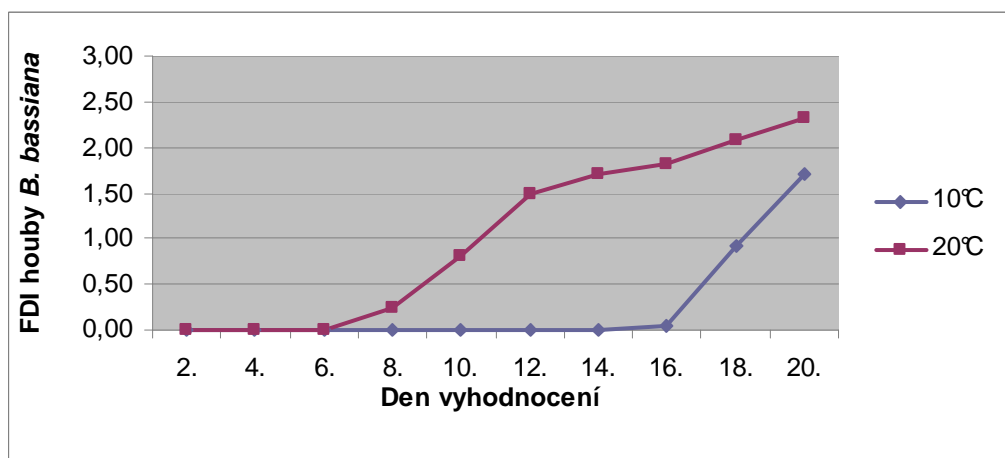
Tento kmen *B. bassiana* I 101, původem ze Šumavy, vykazuje v laboratorním biotestu již citelné rozdíly než předešlé dva šumavské kmeny. Ze všech hodnocených teplot se kmen I 101 vyvíjí na larvách *T. molitor* nejlépe při teplotě 20°C. Při teplotě 10°C je rychlost vývoje na larvách již podstatně pomalejší. Hodnota FDI 1,5 je při teplotě 20°C dosažena již po 10,3 dnech, naopak při teplotě 10°C je hodnoty FDI 1,5 dosaženo až po 25,1 dnech (viz Tab. č. 10). Při teplotě 20°C byla po 8 dnech biotestu mortalita larev *T. molitor* 97%. Při teplotě 10°C byla mortalita larev 99% ve 20. den biotestu. Teplota 30°C nemohla být vyhodnocena z důvodu silného rozvinutí bakteriální infekce v pokusu.

**Tab. č. 7: Vyhodnocení průběhu testu virulence kmene T 08 entomopatogenní houby *B. bassiana* při rozdílných teplotách inkubace (FDI ± SE)**

Den / teplota	10°C	20°C	30°C*
2.	0,00±0,00	0,00±0,00	-
4.	0,00±0,00	0,00±0,00	-
6.	0,00±0,00	0,00±0,00	-
8.	0,00±0,00	0,24±0,32	-
10.	0,00±0,00	0,80±0,87	-
12.	0,00±0,00	1,50±1,18	-
14.	0,00±0,00	1,70±1,17	-
16.	0,04±0,20	1,82±1,17	-
18.	0,92±0,37	2,08±1,11	-
20.	1,70±0,66	2,32±1,11	-

\* Teplota 30°C nemohla být u kmene T 08 vyhodnocena z důvodu rozvinutí bakteriální infekce v založeném pokusu.

**Graf č. 4: Grafické znázornění průběhu testu virulence kmene T 08 entomopatogenní houby *B. bassiana* ve všech hodnocených teplotách prostředí**



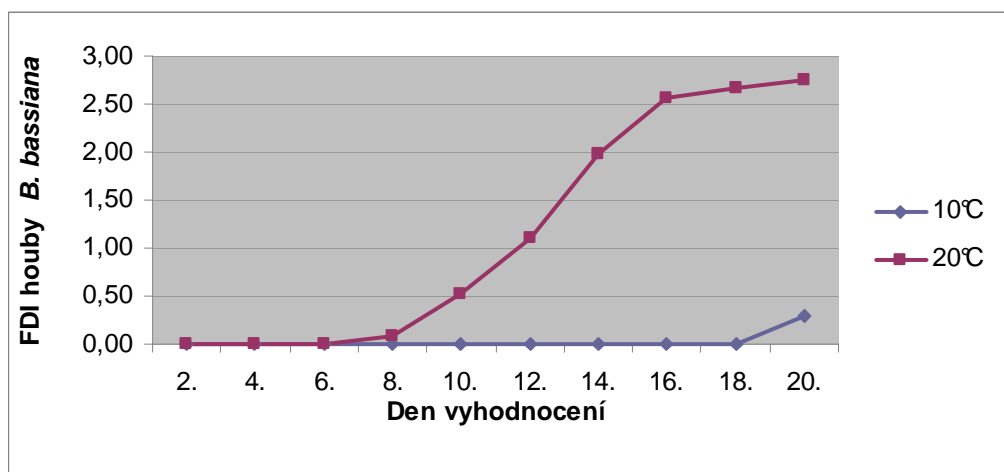
Kmen T 08, původem ze slovenských Tater, vykazuje v hodnocení nejlepší vývoj na larvách *T. molitor* při teplotě 20°C. Při teplotě 10°C je rychlost vývoje tohoto kmene na larvách již podstatně pomalejší. V teplotním prostředí 20°C je hodnota FDI 1,5 dosažena po 14ti dnech, naopak při teplotě 10°C je hodnoty FDI 1,5 dosaženo až po dlouhých 29,5 dnech (viz Tab. č. 10). Při teplotě 20°C byla po 20ti dnech biotestu mortalita larev *T. molitor* 95%. Při teplotě 10°C byla po 20ti dnech biotestu mortalita larev 99%. Teplota 30°C nemohla být vyhodnocena z důvodu silného rozvinutí bakteriální infekce v založeném pokusu.

**Tab. č. 8: Vyhodnocení průběhu testu virulence kmene A 32 entomopatogenní houby *B. bassiana* při rozdílných teplotách inkubace (FDI ± SE)**

Den / teplota	10°C	20°C	30°C*
2.	0,00±0,00	0,00±0,00	-
4.	0,00±0,00	0,00±0,00	-
6.	0,00±0,00	0,00±0,00	-
8.	0,00±0,00	0,08±0,32	-
10.	0,00±0,00	0,52±0,44	-
12.	0,00±0,00	1,10±0,37	-
14.	0,00±0,00	1,98±0,22	-
16.	0,00±0,00	2,56±0,54	-
18.	0,00±0,00	2,66±0,50	-
20.	0,30±0,62	2,74±0,35	-

\* Teplota 30°C nemohla být u kmenu A 32 vyhodnocena z důvodu rozvinutí bakteriální infekce v založeném pokusu.

**Graf č. 5: Grafické znázornění průběhu testu virulence kmene A 32 entomopatogenní houby *B. bassiana* ve všech hodnocených teplotách prostředí**

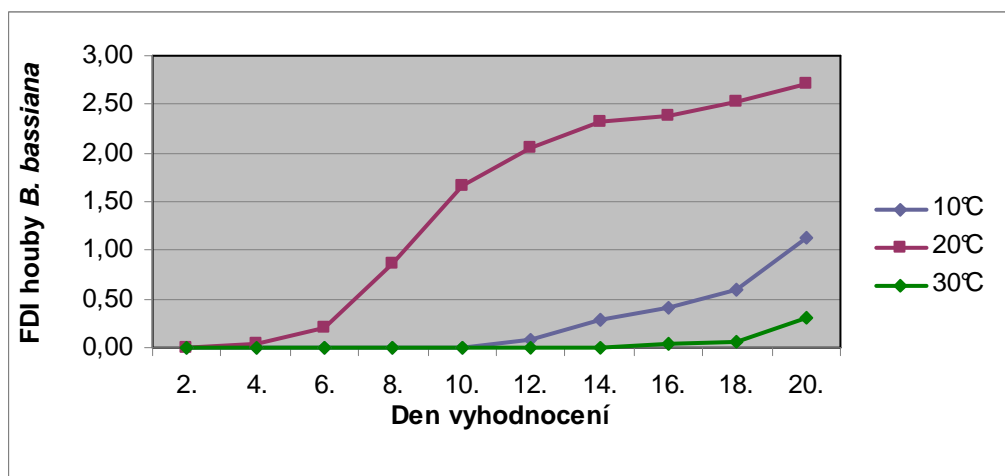


Rumunský kmen *B. bassiana* A 32 se ze všech hodnocených teplot na larvách *T. molitor* vyvíjí nejlépe opět při teplotě 20°C. Teplota 10°C je pro rychlost vývoje na larvách již limitní a vývoj houby tohoto kmene velmi pomalý. Hodnoty FDI 1,5 je v teplotním prostředí 20°C dosaženo po 12,7 dnech, naopak při teplotě 10°C je hodnota FDI 1,5 dosažena až po 29,8 dnech (viz Tab. č. 10). Při teplotě 20°C byla po 12ti dnech biotestu mortalita larev 100%. V teplotním prostředí 10°C byla po 20ti dnech biotestu mortalita larev *T. molitor* velmi nízká – pouhých 18%. Podobně jako všechny předešlé laboratorní pokusy, byl i tento pokus při teplotě 30°C napaden bakteriální infekcí a tato teplota nemohla být proto hodnocena.

**Tab. č. 9: Vyhodnocení průběhu testu virulence kmene USA 01 entomopatogenní houby *B. bassiana* při rozdílných teplotách inkubace (FDI ± SE)**

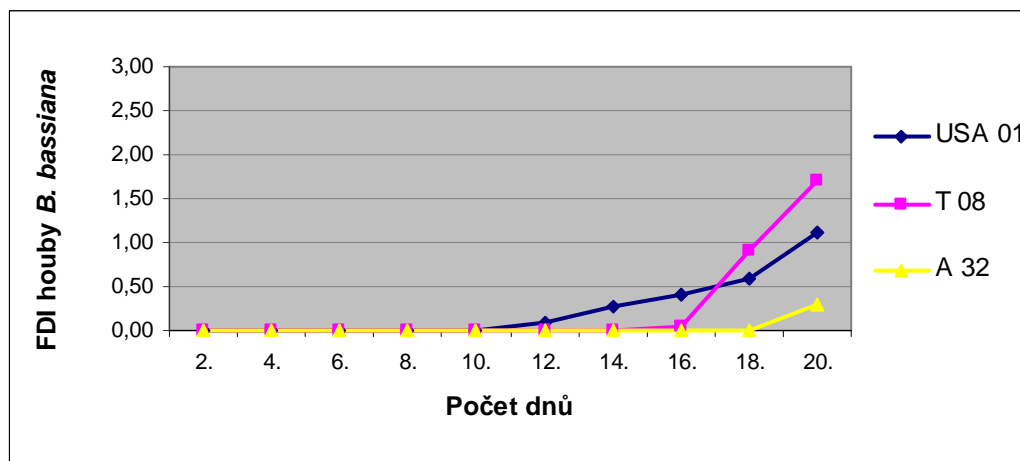
Den / teplota	10°C	20°C	30°C
2.	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
4.	0,00±0,00	0,04±0,14	0,00±0,00
6.	0,00±0,00	0,20±0,32	0,00±0,00
8.	0,00±0,00	0,86±0,48	0,00±0,00
10.	0,00±0,00	1,66±0,74	0,00±0,00
12.	0,08±0,12	2,06±0,71	0,00±0,00
14.	0,28±0,45	2,32±0,65	0,00±0,00
16.	0,42±0,59	2,38±0,60	0,04±0,14
18.	0,60±0,63	2,52±0,61	0,06±0,16
20.	1,12±0,74	2,72±0,45	0,30±0,49

**Graf č. 6: Grafické znázornění průběhu testu virulence kmene USA 01 entomopatogenní houby *B. bassiana* ve všech hodnocených teplotách prostředí**

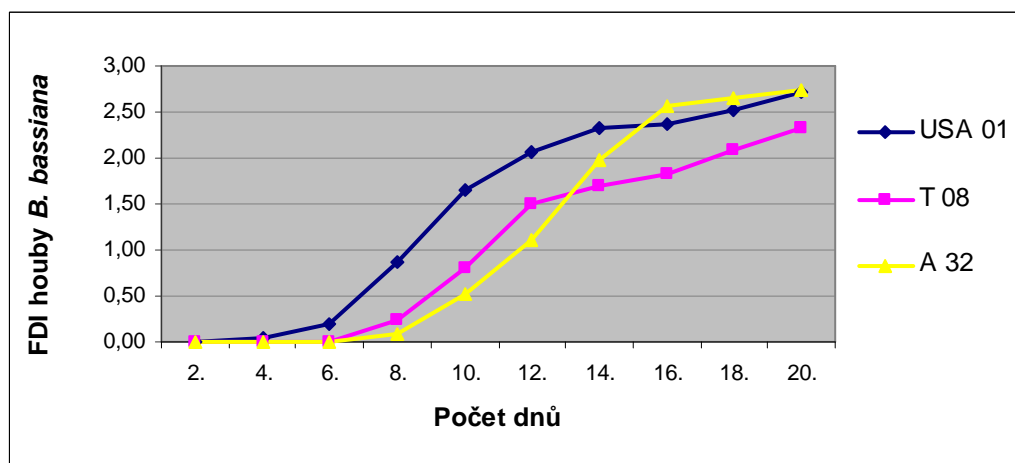


Tento kmen *B. bassiana* USA 01, který je původem z americké Floridy, projevuje značnou teplomilnost. Ze všech hodnocených kmenů rostl tento i v založeném pokusu při teplotě 30°C a nebyl napaden rozvojem bakteriální infekce. Na larvách *T. molitor* se kmen USA 01 vyvíjí nejlépe při teplotě 20°C. Teploty 10°C a 30°C jsou pro rychlost vývoje na larvách již limitní a vývoj houby tohoto kmene je velmi pomalý. Hodnoty FDI 1,5 je v teplotním prostředí 20°C dosaženo po 11,4 dnech, naopak při teplotě 10°C je hodnota FDI 1,5 dosažena až po 34,8 dnech a při teplotě 30°C po 44,7 dnech (viz Tab. č. 10). Po 20ti dnech biotestu byla při teplotě 20°C mortalita larev 100%, při teplotě 10°C byla mortalita 97% a při teplotě 30°C byla 20%.

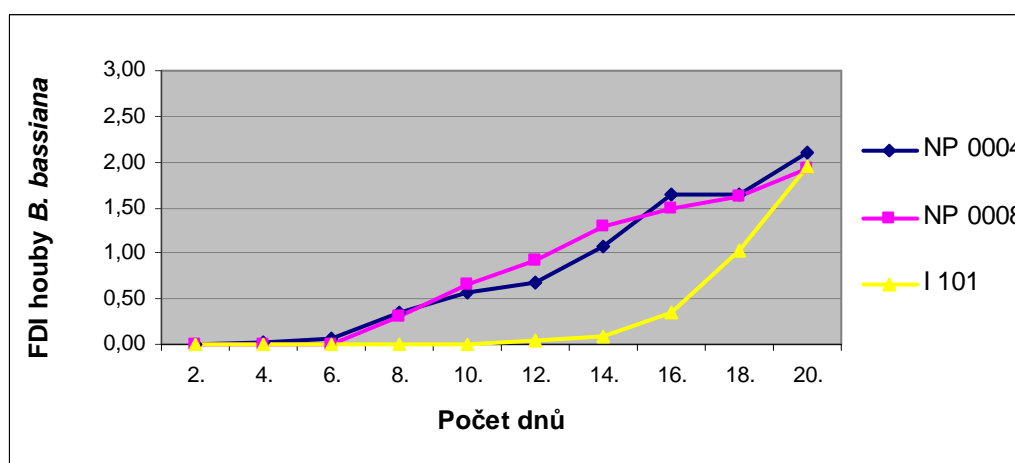
**Graf č. 7: Porovnání zahraničních kmenů *B. bassiana* (kmeny USA 01, T 08, A 32) v průběhu testu virulence při teplotě prostředí 10°C**



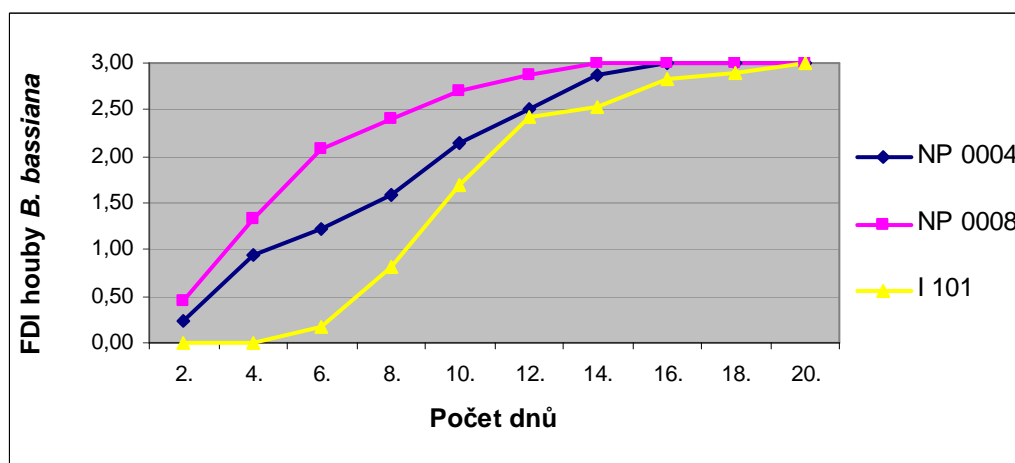
**Graf č. 8: Porovnání zahraničních kmenů *B. bassiana* (kmeny USA 01, T 08, A 32) v průběhu testu virulence při teplotě prostředí 20°C**



**Graf č. 9: Porovnání šumavských kmenů *B. bassiana* (kmeny NP 0004, NP 0008, I 101) v průběhu testu virulence při teplotě prostředí 10°C**



**Graf č. 10: Porovnání šumavských kmenů *B. bassiana* (kmeny NP 0004, NP 0008, I 101) v průběhu testu virulence při teplotě prostředí 20°C**



**Tab. č. 10: Vyjádření délky průběhu biotestu virulence jednotlivých hodnocených kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na larvách *Tenebrio molitor* potřebné k dosažení hodnoty FDI 1,5.**

Kmen	Teplota inkubace	Lineární rovnice	R <sup>2</sup> *	Počet dnů potřebných k dosažení FDI 1,5
NP 0004	10°C	y = 0,2453x - 0,5347	0,9454	8,29
NP 0004	20°C	y = 0,3177x + 0,3027	0,9226	3,76
NP 0008	10°C	y = 0,1193x - 0,4907	0,9658	16,68
NP 0008	20°C	y = 0,1254x + 1,0027	0,7556	3,96
I 101	10°C	y = 0,0813x - 0,548	0,5758	25,19
I 101	20°C	y = 0,201x - 0,5747	0,9256	10,31
T 08	10°C	y = 0,0665x - 0,4653	0,4813	29,55
T 08	20°C	y = 0,1504x - 0,608	0,9423	14,01
A 32	10°C	y = 0,0670x - 0,5132	0,5327	29,89
A 32	20°C	y = 0,189x - 0,9147	0,9068	12,77
USA 01	10°C	y = 0,0524x - 0,3267	0,7252	34,86
USA 01	20°C	y = 0,1743x - 0,4413	0,9292	11,13
USA 01	30°C	y = 0,0351x - 0,0707	0,4917	44,74

\*R<sup>2</sup> – koeficient spolehlivosti

*pozn.:* U kmenů NP 0004, NP 0008, I 101, T 08 a A 32 nemohla být data hodnocena z důvodu rozvinutí bakteriální infekce.

#### Vyhodnocení pokusu:

Z grafického znázornění a z tabulek vyplývá, že k nejlépe virulentním kmenům patří především kmeny NP 0004 a NP 0008, které velmi rychle rostou na larvách *T. molitor* při teplotě 20°C (FDI 1,5 dosažena za 3,76 dne u kmene NP 0004 a u kmene NP 0008 za 3,96 dne). Tyto dva kmeny rostou také dosti rychle a dobře při teplotě 10°C, kdy je u kmene NP 0004 dosaženo FDI 1,5 po 8,29 dnech a u kmene NP 0008 po 3,96 dnech. Šumavský kmen I 101 a kmen z Tater T 08 byly v hodnocení virulence velmi podobné, neboť u kmene I 101 dochází k dosažení FDI 1,5 při teplotě 10°C za 25,19 dnů a u kmene T 08 za 29,5 dnů, při teplotě 20°C dochází k FDI 1,5 za 10,3 dne u kmene I 101 a za 14 dnů u kmene T 08. Rumunský kmen A 32 velmi pomalu roste při teplotě 10°C, při teplotě 20°C je u tohoto kmene FDI 1,5 dosahováno za 12,7 dne. Teplota 30°C nemohla být u kmenů NP 0004, NP 0008, I 101, T 08 a A 32 vyhodnocena, neboť v pokusu byla velmi silně rozvinuta bakteriální infekce, byla však hodnocena u kmene USA 01. Floridský kmen USA 01 patří ke kmenům rostoucím v nižších nadmořských výškách než ostatní uvedené kmeny, proto při chladnějších teplotách roste pomalu. FDI 1,5 je u něj dosaženo při teplotě 10°C po 34,8 dnech, při teplotě 20°C po 11,1 dnech, teplota 30°C je již omezujícím faktorem a tento kmen při ní roste již velmi pomalu (FDI 1,5 je dosaženo po 44,74 dnech). Všechny založené kontrolní varianty byly negativní.

## 5.2. Klíčivost jednotlivých kmenů *Beauveria bassiana* (GI – test)

### Základní údaje k pokusu:

- byly hodnoceny jednotlivé endemické kmeny *B. bassiana*
- byly připraveny standardní suspenze konidií testovaných kmenů ( $1,00 \times 10^7$  v 1 ml suspenze)
- z každého kmene *B. bassiana* bylo hodnoceno 100 konidií a byl vypočítán průměrný index klíčivosti se směrodatnou odchylkou
- hodnocení klíčivosti probíhalo po 24 hodinách
- spory byly hodnoceny pomocí stupnice používané pro hodnocení klíčivosti spor entomopatogenních hub: GI – stupnice (viz Tab. č. 3)

**Tab. č. 11: Klíčivost *B. bassiana* (kmen NP 0004) po 24 hodinách**

<i>Konidie číslo:</i>									
1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100
1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2	2	1,5	2	2	2	2	2	2	2
2	2	1,5	2	2	2	2	2	1,5	2
2	2	1,5	2	2	2	2	2	1,5	2
2	2	1,5	2	2	1,5	2	2	1,5	2
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<b>Klíčivost (Germination): 100%</b>									
<b>Průměrný index vývoje: GI 1,95 ± 0,17</b>									

**Tab. č. 12: Klíčivost *B. bassiana* (kmen NP 0008) po 24 hodinách**

<i>Konidie číslo:</i>									
1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100
2	2	2	0	2	2	2	2	2	2
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2	2	2	2	2	2	2	2	1,5	2
2	2	1,5	2	2	2	2	2	1,5	2
2	2	1,5	2	2	2	2	2	2	2
2	2	1,5	2	2	2	2	2	2	2
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<b>Klíčivost (Germination): 99%</b>									
<b>Průměrný index vývoje: GI 1,96 ± 0,22</b>									





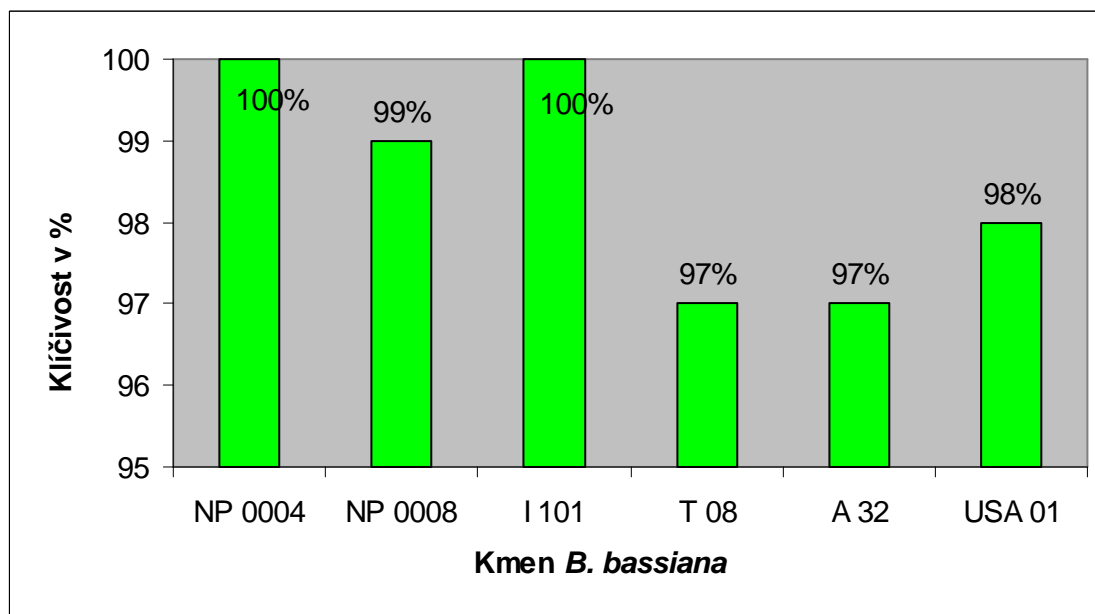
**Tab. č. 16: Klíčivost *B. bassiana* (kmen USA 01) po 24 hodinách**

<i>Konidie číslo:</i>									
1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100
2	2	2	2	1,5	2	2	2	2	2
2	0,5	2	2	1,5	2	1,5	2	2	2
2	0,5	2	2	1,5	2	1,5	2	2	2
2	0,5	2	2	1,5	2	1,5	2	2	2
2	2	2	2	1,5	2	1,5	2	2	2
2	0,5	2	2	1,5	2	1,5	2	2	2
2	0,5	2	2	1,5	2	1,5	2	2	2
2	0,5	2	2	1,5	2	1,5	2	2	2
2	0,5	2	2	2	2	1,5	2	2	2
2	0	2	2	2	2	1,5	2	2	2
<b>Klíčivost (Germination): 98%</b>									
<b>Průměrný index vývoje: GI 1,79 ± 0,44</b>									

**Tab. č. 17: Hodnocení klíčivosti všech kmenů *B. bassiana***

<i>Kmen</i>	<i>GI ± STDV</i>	<i>Klíčivost v %</i>
NP 0004	1,95 ± 0,17	100
NP 0008	1,96 ± 0,22	99
I 101	1,99 ± 0,07	100
T 08	1,88 ± 0,38	97
A 32	1,87 ± 0,40	97
USA 01	1,79 ± 0,44	98

**Graf č. 11: Klíčivost hodnocených kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana***



#### Vyhodnocení pokusu:

U všech hodnocených kmenů houby *B. bassiana* byla prokázána velmi vysoká klíčivost po 24 hodinách. V hodnocení klíčivosti nejlépe dopadly šumavské kmeny – I 101 a NP 0004 – u kterých byla klíčivost 100%. Velmi vysokou klíčivost měl také šumavský kmen NP 0008 – 99%. Nepatrně nižší klíčivost byla zaznamenána u floridského kmene USA 01, která byla 98%. U rumunského kmene A 32 a kmene z Tater T 08 byla klíčivost také nepatrně nižší, a to 97%.

### **5.3. Kultivace na různých přirozených živných substrátech**

#### Základní údaje k pokusu:

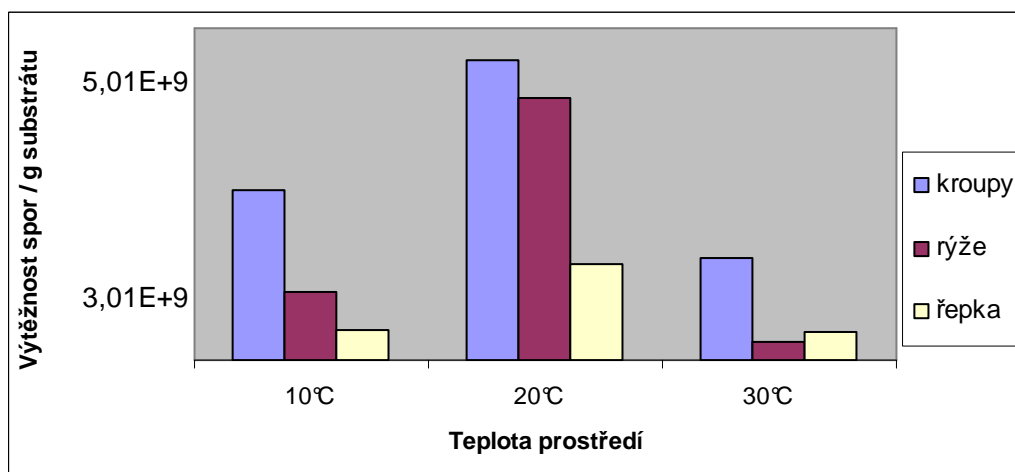
- v pokusech bylo použito těchto přirozených substrátů: rýže, řepka a kroupy
- suspenze spor jednotlivých hodnocených kmenů byla připravena na koncentraci  $1,0 \times 10^6$  konidií/1 ml
- do Erlenmayerových baněk o objemu 250 ml bylo naváženo 25 g vzorku daného substrátu
- do každé z baněk bylo odměřeno 12,5 ml suspenze daného kmene a byla připravena 3 opakování pro každou kultivační teplotu
- vyhodnocení pokusu proběhlo za 14 dní od jeho založení, obsah Erlenmayerových baněk byl vymyt v 2% roztoku jaru s vodou
- baňky byly uloženy do jednotlivých hodnocených teplot
- hodnocení probíhalo na základě výtěžnosti spor jednotlivých kmenů, která byla přepočtena na 1g substrátu

**Tab. č. 18: Výtěžnost spor houby *B. bassiana* kmene NP 0004 z jednotlivých živných přirozených substrátů přepočtená na 1 g substrátu**

substrát / teplota	10°C	20°C	30°C
kroupy	$3,06 \pm 0,22 \times 10^9$	$5,43 \pm 0,43 \times 10^9$	$1,84 \pm 0,06 \times 10^9$
rýže	$1,24 \pm 0,02 \times 10^9$	$4,75 \pm 0,10 \times 10^9$	$3,38 \pm 0,08 \times 10^8$
řepka	$5,56 \pm 0,56 \times 10^8$	$1,75 \pm 0,00 \times 10^9$	$5,06 \pm 0,24 \times 10^8$

V tomto testu, který probíhal po dobu 14 dnů dosáhly výtěžnosti spor kmene NP 0004 nejvyšších hodnot kroupy ve všech hodnocených teplotách. Naopak řepka se projevila jako méně vhodný substrát, neboť výtěžnost spor ve všech přirozených substrátech byla v tomto případě jedna z nejnižších. Rýže se jevila ve 20°C také jako dobrý substrát.

**Graf č. 12: Výtěžnost spor houby *B. bassiana* kmen NP 0004 získaná kultivací na přirozených substrátech v různých teplotách prostředí.**

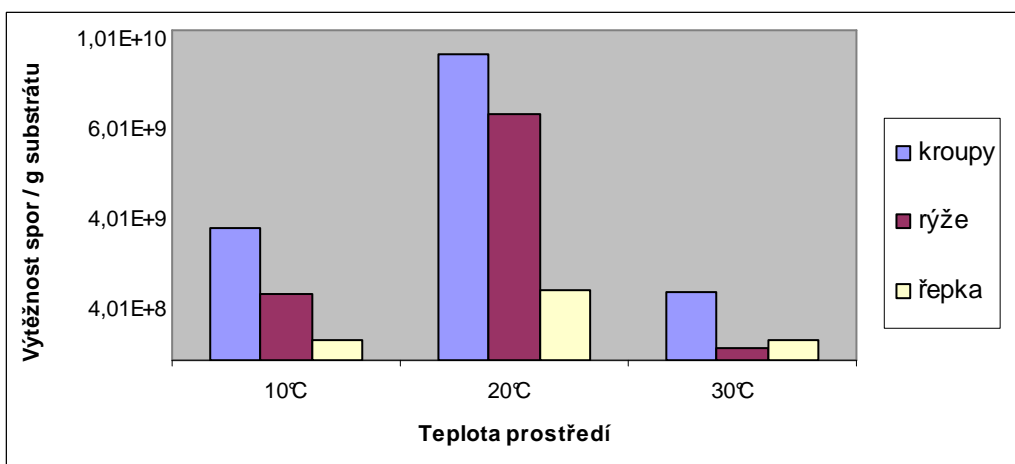


**Tab. č. 19: Výtěžnost spor houby *B. bassiana* kmene NP 0008 z jednotlivých živných přirozených substrátů přepočtená na 1 g substrátu**

substrát / teplota	10°C	20°C	30°C
kroupy	$4,03 \pm 0,11 \times 10^9$	$9,30 \pm 0,15 \times 10^9$	$2,07 \pm 0,05 \times 10^9$
rýže	$1,99 \pm 0,21 \times 10^9$	$7,48 \pm 0,03 \times 10^9$	$3,86 \pm 0,16 \times 10^8$
řepka	$6,07 \pm 0,21 \times 10^8$	$2,11 \pm 0,12 \times 10^9$	$6,25 \pm 0,39 \times 10^8$

V tomto 14ti denním testu dosáhly výtěžnosti spor kmene NP 0008 nejvyšších hodnot kroupy ve všech hodnocených teplotách, největší produkce spor byla při teplotě 20°C. Velmi vysoká produkce spor tohoto kmene byla při teplotě 20°C také u rýže, která byla velmi podobná jako při stejné teplotě u krup. Výtěžnost spor na kroupách při teplotě 20°C byla  $9,3 \times 10^9$  spor / 1 g substrátu. Řepka je nevhodný substrát.

**Graf č. 13: Výtěžnost spor houby *B. bassiana* kmen NP 0008 získaná kultivací na přirozených substrátech v různých teplotách prostředí.**

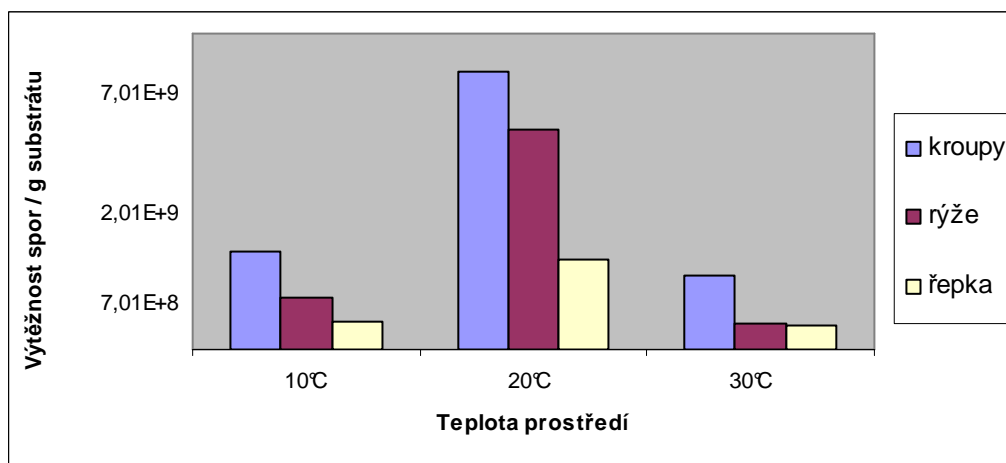


**Tab. č. 20: Výtěžnost spor houby *B. bassiana* kmene I 101 z jednotlivých živných přirozených substrátů přepočtená na 1 g substrátu**

substrát / teplota	10°C	20°C	30°C
kroupy	$2,47 \pm 0,25 \times 10^9$	$7,02 \pm 0,89 \times 10^9$	$1,89 \pm 0,27 \times 10^9$
rýže	$1,34 \pm 0,09 \times 10^9$	$5,58 \pm 0,57 \times 10^9$	$6,34 \pm 0,89 \times 10^8$
řepka	$6,99 \pm 0,95 \times 10^8$	$2,28 \pm 0,40 \times 10^9$	$6,22 \pm 0,49 \times 10^8$

Ve vyhodnocení tohoto testu kmene I 101 bylo opět nejvyšší výtěžnosti spor dosaženo na kroupách – nejvyšší výtěžnost byla při 20°C. Vysoká výtěžnost spor byla také u rýže, kdy při 20°C je výtěžnost  $5,58 \times 10^9$  spor / 1 g substrátu. Limitující teplotou u všech hodnocených přirozených živných substrátů se opět projevila teplota 10°C a 30°C, kdy se produkce spor již zpomaluje či již úplně zastavuje. Výtěžnost spor na řepce byla opět velmi nízká, při teplotě 10°C byla pouze  $6,99 \times 10^8$ , při teplotě 20°C byla  $2,28 \times 10^9$  a při teplotě 30°C byla  $6,22 \times 10^8$  na 1 g substrátu, což je srovnatelné s výtěžností spor na rýži, která byla při teplotě 30°C  $6,34 \times 10^8$  spor / 1 g substrátu.

**Graf č. 14: Výtěžnost spor houby *B. bassiana* kmen I 101 získaná kultivací na přirozených substrátech v různých teplotách prostředí.**

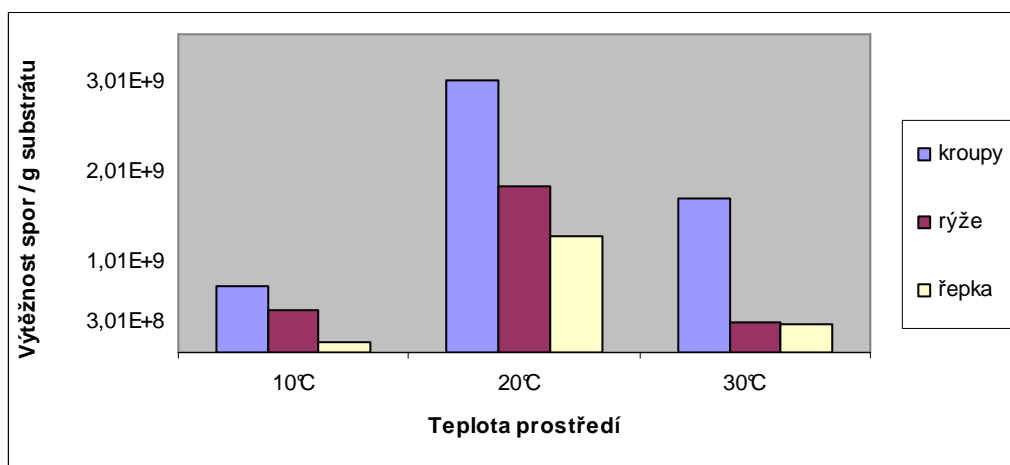


**Tab. č. 21: Výtěžnost spor houby *B. bassiana* kmene T 08 z jednotlivých živných přirozených substrátů přepočtená na 1 g substrátu**

substrát / teplota	10°C	20°C	30°C
kroupy	$7,20 \pm 0,16 \times 10^8$	$2,99 \pm 0,29 \times 10^9$	$1,69 \pm 0,07 \times 10^9$
rýže	$4,70 \pm 0,17 \times 10^8$	$1,83 \pm 0,27 \times 10^9$	$3,37 \pm 0,07 \times 10^8$
řepka	$1,00 \pm 0,06 \times 10^9$	$1,28 \pm 0,00 \times 10^9$	$3,12 \pm 0,04 \times 10^8$

Kroupy dosáhly opět nejvyšší výtěžnosti spor při vyhodnocení tohoto testu ve všech živných přirozených substrátech. Vysoká výtěžnost spor byla také u rýže, kdy při 20°C byla výtěžnost  $1,83 \times 10^9$  spor / 1 g substrátu. Při 30°C dosahovala nejmenší výtěžnosti spor téměř shodně řepka a rýže (u řepky činila výtěžnost  $3,12 \times 10^8$  a u rýže  $3,37 \times 10^8$  spor / 1 g substrátu).

**Graf č. 15: Výtěžnost spor houby *B. bassiana* kmen T 08 získaná kultivací na přirozených substrátech v různých teplotách prostředí.**

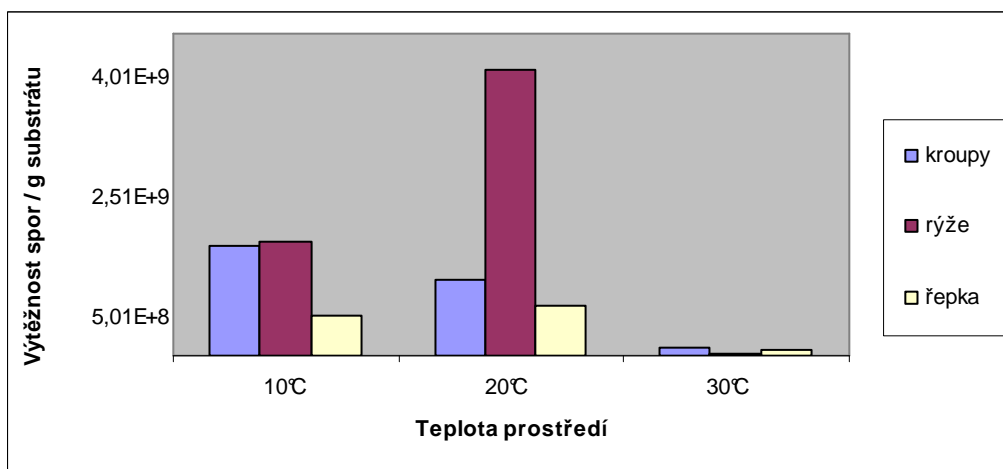


**Tab. č. 22: Výtěžnost spor houby *B. bassiana* kmene A 32 z jednotlivých živných přirozených substrátů přepočtená na 1 g substrátu**

substrát / teplota	10°C	20°C	30°C
kroupy	$1,55 \pm 0,26 \times 10^9$	$1,07 \pm 0,26 \times 10^9$	$1,01 \pm 0,01 \times 10^8$
rýže	$1,58 \pm 0,12 \times 10^9$	$3,99 \pm 0,68 \times 10^9$	$2,55 \pm 0,05 \times 10^7$
řepka	$5,60 \pm 0,01 \times 10^8$	$7,10 \pm 0,11 \times 10^8$	$7,75 \pm 0,10 \times 10^7$

V tomto testu, který probíhal po dobu 14 dnů u kmene A 32 dosáhla výtěžnosti spor nejvyšších hodnot rýže při teplotě 20°C – výtěžnost byla vysoká:  $3,99 \times 10^9$  spor / 1 g substrátu. Limitující teplotou u všech hodnocených přirozených živných substrátů byla teplota 30°C, kdy bylo dosahováno velmi nízkých výtěžností spor – u krup činila výtěžnost  $1,01 \times 10^8$ , u řepky  $7,75 \times 10^7$  a u rýže pouhých  $2,55 \times 10^7$  spor / 1 g. Řepka se znovu projevila jako nejméně vhodný substrát pro výtěžnost spor, protože výtěžnost byla ve všech hodnocených teplotách ze všech substrátů nejnižší. Vhodnost řepky, jako přirozeného živného substrátu, je u tohoto rumunského kmene A 32 jedna z nejnevhodnějších možností.

**Graf č. 17: Výtěžnost spor houby *B. bassiana* kmen A 32 získaná kultivací na přirozených substrátech v různých teplotách prostředí.**

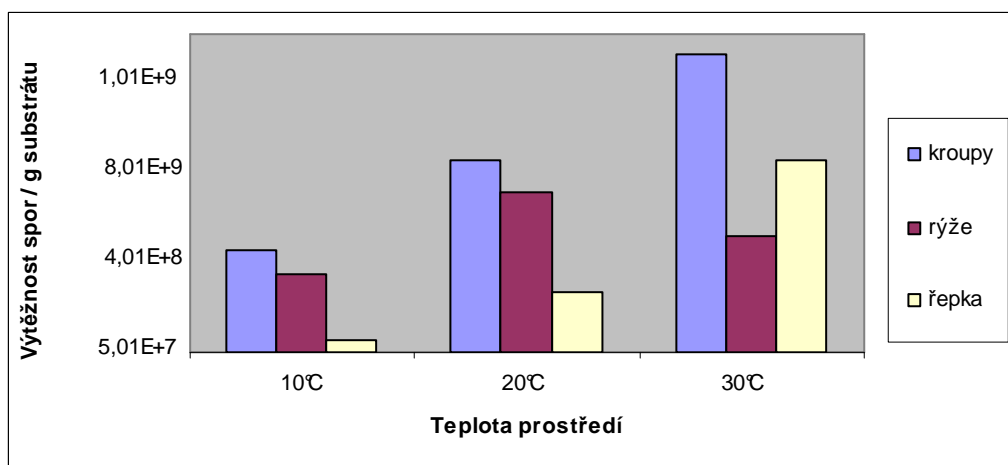


**Tab. č. 23: Výtěžnost spor houby *B. bassiana* kmene USA 01 z jednotlivých živných přirozených substrátů přepočtená na 1 g substrátu**

substrát / teplota	10°C	20°C	30°C
kroupy	$5,14 \pm 0,36 \times 10^8$	$9,77 \pm 1,19 \times 10^8$	$1,49 \pm 0,27 \times 10^9$
rýže	$3,88 \pm 1,07 \times 10^8$	$8,13 \pm 0,57 \times 10^8$	$5,87 \pm 0,65 \times 10^8$
řepka	$6,06 \pm 0,26 \times 10^7$	$3,06 \pm 0,40 \times 10^8$	$9,62 \pm 1,01 \times 10^8$

U kmene USA 01 bylo nejmenší výtěžnosti dosaženo při teplotě 10°C na všech substrátech. Naopak podstatně vyšší výtěžnost byla při teplotě 30°C, což značí, že tento floridský kmen *B. bassiana* je značně teplomilný. Při teplotě 30°C byla výtěžnost na kroupách  $1,49 \times 10^9$  spor / 1 g substrátu.

**Graf č. 18: Výtěžnost spor houby *B. bassiana* kmen USA 01 získaná kultivací na přirozených substrátech v různých teplotách prostředí.**



#### Vyhodnocení pokusu:

V těchto testech, které probíhaly po dobu 14 dnů dosáhl nejlepší výtěžnosti spor kmen NP 0008 při teplotě 20°C a sice na kroupách – výtěžnost činila  $9,30 \times 10^9$  spor/1 g. Výtěžnost při teplotě 10°C a 30°C u ostatních přirozených substrátů (rýže, řepka) u tohoto kmene byla již nižší. Vysokých hodnot dosáhl také šumavský kmen I 101, u něhož byla při teplotě 20°C na kroupách výtěžnost spor  $7,02 \times 10^9$  v 1 g substrátu. Rumunský kmen A 32 rostl při teplotě 20°C velmi dobře na rýži (výtěžnost byla  $3,99 \times 10^9$  spor / 1 g), na rozdíl od ostatních hodnocených kmenů, kde bylo nejvyšších hodnot při této teplotě dosaženo na kroupách. Kmen z Tater T 08 vykazoval ve všech hodnocených teplotách a na všech hodnocených substrátech velmi nápadnou shodu se všemi šumavskými kmeny. To je s vysokou pravděpodobností dáno podobnými ekologickými nároky a nadmořskou výškou jakou u kmenů šumavských. U kmene USA 01 bylo nejnižších výtěžností dosaženo při teplotě 10°C na všech substrátech. Naopak nejvyšší výtěžnost ze všech hodnocených kmenů byla právě u kmene USA při teplotě 30°C. Tento floridský kmen *B. bassiana* je značně teplomilný. Jako nevhodný substrát u všech vyhodnocených kmenů se ukázala řepka, neboť výtěžnost zde byla jedna z nejnižších.

#### **5.4. Porovnání radiálního růstu u jednotlivých kmenů *Beauveria bassiana***

##### Základní údaje k pokusu:

- v pokusech bylo použito těchto umělých substrátů: PDA, SDA, CMA
- suspenze spor hodnocených kmenů byla připravena na koncentraci  $1,0 \times 10^6$  konidií/1 ml
- každá středová kultury byla připraveny nanesením potřísněné tyčinky s připraveným inokulem jednotlivého kmene *B. bassiana* do středu Petriho misky
- vyhodnocení pokusu bylo provedeno po 21 dnech kultivace
- výtěžnost konidií byla počítána pomocí hematocytometru
- v testu byly hodnoceny tyto parametry: byla hodnocena plocha středové kultury, průměr kultury v  $\text{mm}^2$ , výtěžnost spor na 1 kulturu a množství spor, které bylo přepočtené na  $1 \text{ mm}^2$

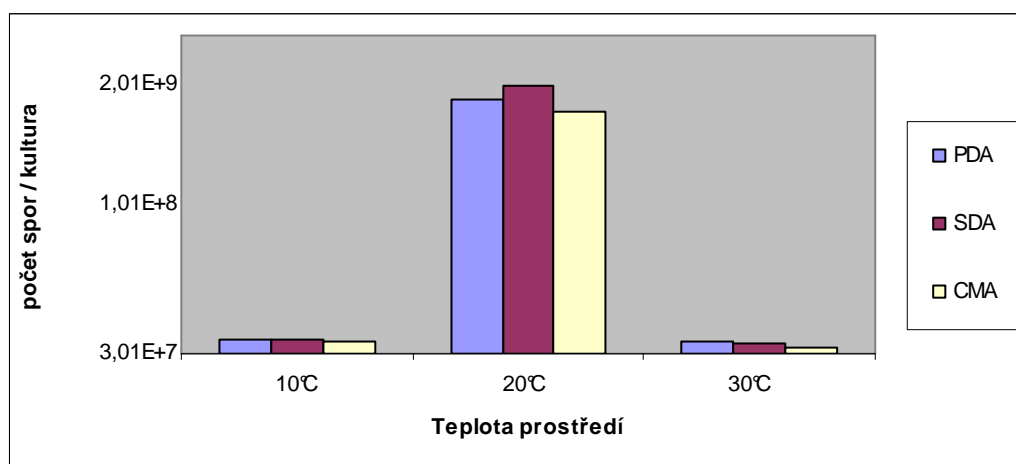


**Tab. č. 24: Jednotlivé ukazatele získané z radiálního růstu středových kultur kmene NP 0004**

živná půda	parametr	teplota		
		10°C	20°C	30°C
PDA	plocha kultury (mm <sup>2</sup> )	276,17±7,36	1529,19±8,66	310,35±11,71
	průměr kultury (mm)	18,75±0,25	44,13±0,13	19,88±0,38
	spor/mm <sup>2</sup>	4,03x10 <sup>5</sup>	2,71x10 <sup>6</sup>	2,83x10 <sup>5</sup>
	spor/kultura	1,11±0,00x10 <sup>8</sup>	2,07±0,00x10 <sup>9</sup>	8,75±0,25x10 <sup>7</sup>
SDA	plocha kultury (mm <sup>2</sup> )	70,88±14,72	2687,83±0,00	375,84±4,30
	průměr kultury (mm)	18,75±0,50	58,50±0,00	21,88±0,13
	spor/mm <sup>2</sup>	3,97x10 <sup>5</sup>	8,12x10 <sup>5</sup>	2,06x10 <sup>5</sup>
	spor/kultura	1,09±0,01x10 <sup>8</sup>	2,18±0,02x10 <sup>9</sup>	7,75±0,25x10 <sup>7</sup>
CMA	plocha kultury (mm <sup>2</sup> )	261,59±0,00	1025,07±21,28	213,87±6,48
	průměr kultury (mm)	18,25±0,00	36,13±0,38	16,50±0,25
	spor/mm <sup>2</sup>	3,94x10 <sup>5</sup>	1,83x10 <sup>6</sup>	1,73x10 <sup>5</sup>
	spor/kultura	1,03±0,02x10 <sup>8</sup>	1,88±0,01x10 <sup>9</sup>	3,69±0,18x10 <sup>7</sup>

V tomto testu, který probíhal po dobu 21 dnů u kmene NP 0004 dosáhla výtěžnosti nejvyšších hodnot SDA při teplotě 20°C – výtěžnost byla 2,18 x 10<sup>9</sup> spor / kultura. Podobných výsledků dosahovaly při teplotě 20°C i ostatní umělé živné půdy – PDA a CMA. Při teplotě 30°C byla zaznamenána nejnižší výtěžnost na všech hodnocených umělých půdách.

**Graf č. 19: Výtěžnost spor houby *B. bassiana* kmen NP 0004 získaná kultivací na umělých živných substrátech v různých teplotách prostředí.**

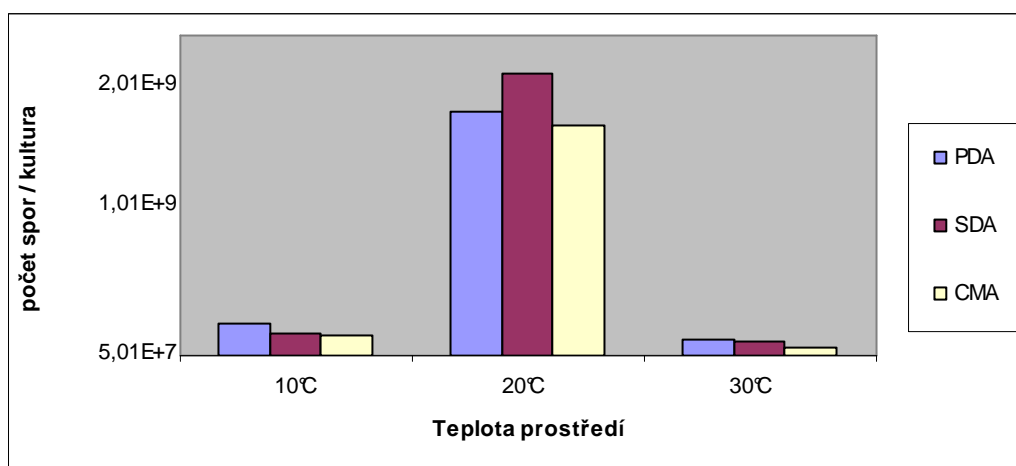


**Tab. č. 25: Jednotlivé ukazatele získané z radiálního růstu středových kultur kmene NP 0008**

živná půda	parametr	teplota		
		10°C	20°C	30°C
PDA	plocha kultury (mm <sup>2</sup> )	291,04±0,00	1460,77±25,40	371,54±0,00
	průměr kultury (mm)	19,25±0,00	43,13±0,38	21,75±0,00
	spor/mm <sup>2</sup>	8,53x10 <sup>5</sup>	1,33x10 <sup>6</sup>	3,16x10 <sup>5</sup>
	spor/kultura	2,48±0,78x10 <sup>8</sup>	1,95±0,00x10 <sup>9</sup>	1,18±0,05x10 <sup>8</sup>
SDA	plocha kultury (mm <sup>2</sup> )	283,58±7,46	2734,17±46,34	367,30±4,25
	průměr kultury (mm)	19,00±0,25	59,00±0,50	21,63±0,13
	spor/mm <sup>2</sup>	6,00x10 <sup>5</sup>	8,35x10 <sup>5</sup>	3,10x10 <sup>5</sup>
	spor/kultura	1,70±0,01x10 <sup>8</sup>	2,28±0,02x10 <sup>9</sup>	1,14±0,04x10 <sup>8</sup>
CMA	plocha kultury (mm <sup>2</sup> )	276,31±14,73	921,32±0,00	243,99±3,46
	průměr kultury (mm)	18,75±0,50	34,25±0,00	17,63±0,13
	spor/mm <sup>2</sup>	5,45x10 <sup>5</sup>	2,02x10 <sup>6</sup>	1,82x10 <sup>5</sup>
	spor/kultura	1,50±0,01x10 <sup>8</sup>	1,86±0,00x10 <sup>9</sup>	4,44±0,06x10 <sup>7</sup>

U kmene NP 0008 byla nejvyšší výtěžnost při teplotě 20°C a to opět na SDA – výtěžnost činila 2,28 x 10<sup>9</sup> spor / kultura. Velmi podobné hodnoty výtěžnosti byly při teplotě 20°C i na ostatních umělých půdách. Teploty 10°C a 30°C jsou pro radiální růst tohoto kmene již limitním faktorem. Při teplotě 30°C byla zaznamenána nejnižší výtěžnost na všech hodnocených umělých půdách.

**Graf č. 20: Výtěžnost spor houby *B. bassiana* kmen NP 0008 získaná kultivací na umělých živných substrátech v různých teplotách prostředí.**

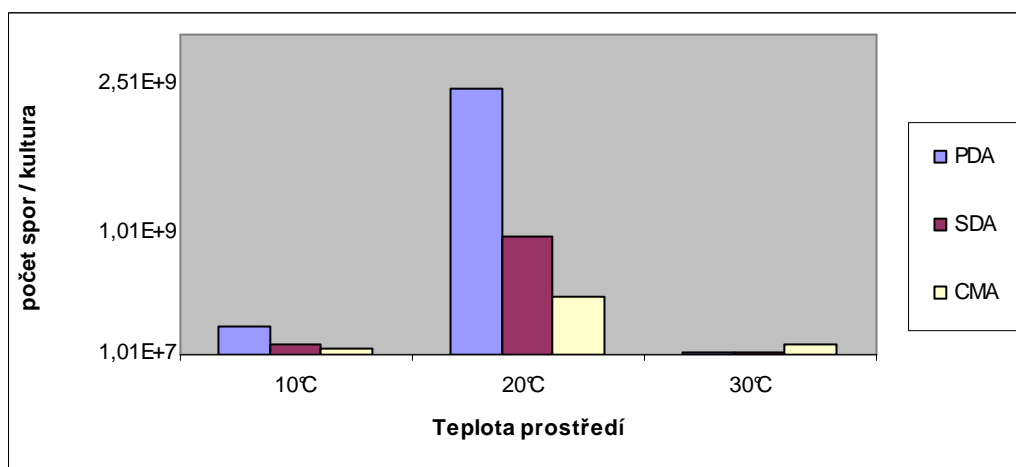


**Tab. č. 26: Jednotlivé ukazatele získané z radiálního růstu středových kultur kmene I 101**

živná půda	parametr	teplota		
		10°C	20°C	30°C
PDA	plocha kultury (mm <sup>2</sup> )	283,72±14,92	669,99±62,07	233,70±0,00
	průměr kultury (mm)	19,00±0,5	35,12±1,12	17,25±0,00
	spor/mm <sup>2</sup>	9,39x10 <sup>5</sup>	2,65x10 <sup>6</sup>	8,02x10 <sup>4</sup>
	spor/kultura	2,65±0,12x10 <sup>8</sup>	2,55±0,03x10 <sup>9</sup>	1,87±0,25x10 <sup>7</sup>
SDA	plocha kultury (mm <sup>2</sup> )	298,65±0,00	1272,44±0,00	330,06±0,00
	průměr kultury (mm)	19,50±0,50	40,25±0,25	20,50±0,00
	spor/mm <sup>2</sup>	2,86x10 <sup>5</sup>	8,69x10 <sup>5</sup>	5,49x10 <sup>4</sup>
	spor/kultura	8,56±0,31x10 <sup>7</sup>	1,10±0,01x10 <sup>9</sup>	1,81±0,18x10 <sup>7</sup>
CMA	plocha kultury (mm <sup>2</sup> )	254,67±14,14	1304,20±0,00	93,19±10,68
	průměr kultury (mm)	18,00±0,50	40,75±0,00	10,87±0,62
	spor/mm <sup>2</sup>	1,75x10 <sup>5</sup>	4,06x10 <sup>5</sup>	8,93x10 <sup>6</sup>
	spor/kultura	4,44±0,06x10 <sup>7</sup>	5,22±0,01x10 <sup>8</sup>	8,31±0,81x10 <sup>7</sup>

Šumavský kmen I 101 vykazuje v radiálním růstu na umělých půdách při teplotě 20°C již podstatné rozdíly než předešlé dva kmene. Nejvyšší výtěžnost spor / kultura byla na PDA při teplotě 20°C, činila  $2,55 \times 10^9$ . Teplota 30°C je pro radiální růst u tohoto kmene již limitním faktorem. Při teplotě 10°C byla zaznamenána nejvyšší výtěžnost na PDA.

**Graf č. 21: Výtěžnost spor houby *B. bassiana* kmen I 101 získaná kultivací na umělých živných substrátech v různých teplotách prostředí.**



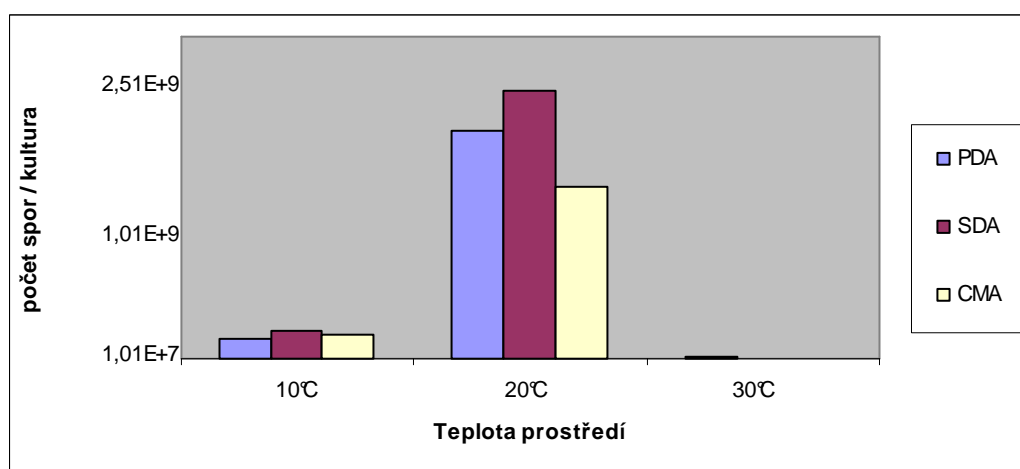
**Tab. č. 27: Jednotlivé ukazatele získané z radiálního růstu středových kultur kmene T 08**

živná půda	parametr	teplota		
		10°C	20°C	30°C
PDA	plocha kultury (mm <sup>2</sup> )	103,87±0,00	457,13±4,74	15,14±2,58
	průměr kultury (mm)	11,50±0,00	24,12±0,13	4,73±0,37
	spor/mm <sup>2</sup>	6,88x10 <sup>5</sup>	1,89x10 <sup>6</sup>	1,14x10 <sup>5</sup>
	spor/kultura	6,99±0,02x10 <sup>7</sup>	8,65±0,02x10 <sup>8</sup>	1,68±0,06x10 <sup>6</sup>
SDA*	plocha kultury (mm <sup>2</sup> )	70,93±3,73	338,60±24,45	-
	průměr kultury (mm)	9,50±0,25	20,75±0,75	-
	spor/mm <sup>2</sup>	3,37x10 <sup>6</sup>	3,51x10 <sup>6</sup>	-
	spor/kultura	1,03±0,02x10 <sup>8</sup>	1,06±0,01x10 <sup>9</sup>	-
CMA*	plocha kultury (mm <sup>2</sup> )	30,68±0,00	1121,01±88,95	-
	průměr kultury (mm)	6,25±0,00	33,75±1,50	-
	spor/mm <sup>2</sup>	3,11x10 <sup>6</sup>	5,77x10 <sup>5</sup>	-
	spor/kultura	9,50±0,02x10 <sup>7</sup>	6,41±0,21x10 <sup>8</sup>	-

\* teplota 30°C nemohla být u SDA a CMA neboť tento kmen *B.bassiana* při této teplotě na těchto umělých živných půdách nerostl

Kmen T 08 dosahoval nejvyšší výtěžnosti opět při teplotě 20°C na SDA – výtěžnost činila 1,06 x 10<sup>9</sup> spor / kultura. Nižší hodnoty výtěžnosti byly při teplotě 20°C i na ostatních umělých půdách. Teplota 30°C je pro radiální růst u tohoto kmene již velmi limitním faktorem, na umělých půdách SDA a CMA tento kmen vůbec nerost. Při teplotě 10°C byla zaznamenána nejvyšší výtěžnost na CMA.

**Graf č. 22: Výtěžnost spor houby *B. bassiana* kmen T 08 získaná kultivací na umělých živných substrátech v různých teplotách prostředí.**

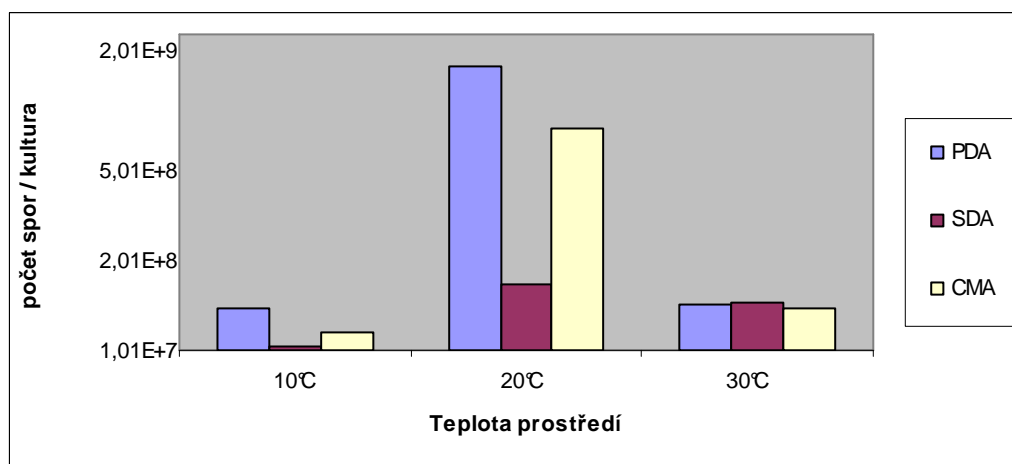


**Tab. č. 28: Jednotlivé ukazatele získané z radiálního růstu středových kultur kmene A 32**

živná půda	parametr	teplota		
		10°C	20°C	30°C
PDA	plocha kultury (mm <sup>2</sup> )	210,61±3,22	1264,61±23,64	525,85±5,08
	průměr kultury (mm)	16,37±0,12	40,12±0,37	25,87±0,12
	spor/mm <sup>2</sup>	4,90x10 <sup>5</sup>	1,56x10 <sup>6</sup>	2,73x10 <sup>5</sup>
	spor/kultura	1,03±0,35x10 <sup>8</sup>	1,97±0,20x10 <sup>9</sup>	1,43±0,06x10 <sup>8</sup>
SDA	plocha kultury (mm <sup>2</sup> )	125,20±2,48	1217,78±23,19	1179,32±0,00
	průměr kultury (mm)	12,62±0,12	39,37±0,37	38,75±0,00
	spor/mm <sup>2</sup>	1,14x10 <sup>5</sup>	1,71x10 <sup>5</sup>	1,27x10 <sup>5</sup>
	spor/kultura	1,43±0,06x10 <sup>7</sup>	2,09±0,18x10 <sup>8</sup>	1,50±0,00x10 <sup>8</sup>
CMA	plocha kultury (mm <sup>2</sup> )	151,21±2,72	1067,97±7,24	334,11±4,05
	průměr kultury (mm)	13,82±0,12	36,87±0,12	20,62±0,12
	spor/mm <sup>2</sup>	3,72x10 <sup>5</sup>	1,45x10 <sup>6</sup>	3,93x10 <sup>5</sup>
	spor/kultura	5,62±0,37x10 <sup>7</sup>	1,55±0,05x10 <sup>9</sup>	1,31±0,06x10 <sup>8</sup>

V tomto testu, který probíhal po dobu 21 dnů dosáhla výtěžnosti u kmene NP 0004 nejvyšších hodnot PDA při teplotě 20°C – výtěžnost byla 1,97 x 10<sup>9</sup> spor / kultura. Velmi podobného výsledku bylo dosaženo při této teplotě i na CMA. Naopak umělá živná půda SDA se projevila jako méně vhodný substrát, neboť výtěžnost spor zde při této teplotě byla nejnižší.

**Graf č. 23: Výtěžnost spor houby *B. bassiana* kmen A 32 získaná kultivací na umělých živných substrátech v různých teplotách prostředí.**

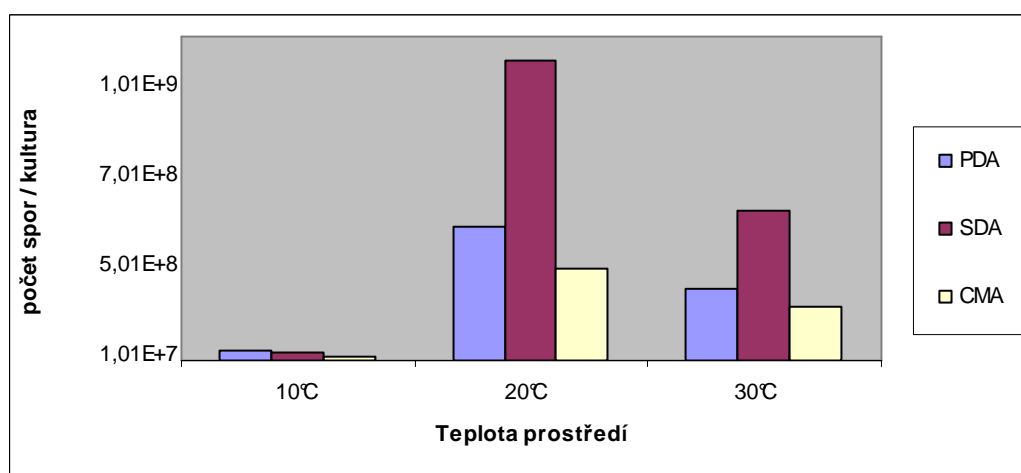


**Tab. č. 29: Jednotlivé ukazatele získané z radiálního růstu středových kultur kmene USA 01**

živná půda	parametr	teplota		
		10°C	20°C	30°C
PDA	plocha kultury (mm <sup>2</sup> )	226,98±0,00	2322,15±10,68	1511,91±8,61
	průměr kultury (mm)	17,00±0,00	54,37±0,12	43,87±0,12
	spor/mm <sup>2</sup>	1,76x10 <sup>5</sup>	2,53x10 <sup>5</sup>	2,06x10 <sup>5</sup>
	spor/kultura	4,00±0,75x10 <sup>7</sup>	5,87±0,62x10 <sup>8</sup>	3,12±0,15x10 <sup>8</sup>
SDA	plocha kultury (mm <sup>2</sup> )	298,65±0,00	1134,16±14,92	1272,39±0,00
	průměr kultury (mm)	19,50±0,00	38,00±0,25	40,25±0,00
	spor/mm <sup>2</sup>	1,08x10 <sup>5</sup>	1,16x10 <sup>6</sup>	5,15x10 <sup>5</sup>
	spor/kultura	3,25±0,25x10 <sup>7</sup>	1,31±0,51x10 <sup>9</sup>	6,56±0,38x10 <sup>8</sup>
CMA	plocha kultury (mm <sup>2</sup> )	397,61±14,14	3447,21±26,02	1082,60±21,87
	průměr kultury (mm)	22,50±0,00	66,25±0,25	37,12±0,37
	spor/mm <sup>2</sup>	4,24x10 <sup>4</sup>	1,16x10 <sup>5</sup>	2,12x10 <sup>5</sup>
	spor/kultura	1,68±0,18x10 <sup>7</sup>	4,03±0,28x10 <sup>8</sup>	2,31±0,68x10 <sup>8</sup>

Floridský kmen *B. bassiana* USA 01 rostl ze všech hodnocených teplot nejlépe při teplotách 20°C a 30°C. Teplota 10°C je pro tento teplomilný kmen již velmi omezujícím faktorem. Nejlepší výtěžnosti spor bylo dosahováno na SDA, velmi dobré pak na PDA. Při 20°C byla výtěžnost na SDA 1,31 x 10<sup>9</sup> spor / kultura, u PDA 5,87 x 10<sup>8</sup> spor / kultura Umělý živný substrát CMA byl vyhodnocen jako méně vhodný.

**Graf č. 24: Výtěžnost spor houby *B. bassiana* kmen USA 01 získaná kultivací na umělých živných substrátech v různých teplotách prostředí.**



### Vyhodnocení pokusu:

Při kultivaci na umělých živných půdách, která probíhala po dobu 21 dnů byla jako nejlépe vyhovující vyhodnocena teplota 20°C. Nejlepší výtěžnosti spor při této teplotě dosáhly šumavské kmeny NP 0004 a NP 0008 – nejlepší výtěžnost spor / kulturu byla na SDA, u substrátů PDA a CMA pak byla výtěžnost jen nepatrně nižší. Naopak kmen I 101 při teplotě 20°C nejlépe rostl na SDA a i výtěžnost byla při této teplotě nejvyšší. Slovenský kmen T 08 při teplotě 30°C rostl pouze na PDA, na CMA a SDA nerostl vůbec. U kmene A 32 se jako nejméně vhodného umělého živného substrátu jeví použití SDA, neboť růst i výtěžnost na této živné půdě byla vyhodnocena jako méně vhodná. Teplota 30°C byla téměř u všech kmenů omezujícím faktorem, radiální růst byl při této teplotě velmi malý, stejně tak jako i výtěžnost. Při teplotě 30°C však dosti dobře rostl kmen USA 01, což značí jeho teplomilnost. Limitní teplotní prostředí u tohoto kmene představovala teplota 10°C. U kmene USA 01 se jako dobrá umělá živná půda nejlépe jeví SDA V průměru byl u všech hodnocených kmenů *B. bassiana* jako méně vhodná umělá živná půda vyhodnocen CMA.

## 6. DISKUSE

Studium entomopatogenních hub získává v posledním desetiletí stále většího významu. Velmi často bývají využívány v biologické ochraně rostlin k potlačení výskytu řady druhů škůdců. Entomopatogenní houby mají velmi široké spektrum hostitelských druhů a také mají schopnost infikovat různá vývojová stádia. Houba *Beauveria bassiana* je kosmopolitně rozšířena a patří k druhům, jež bývají s největší četností izolovány z hmyzu a půdních vzorků (ALVES 1996). Vliv endemických kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* bude v budoucnosti mít jistě velmi významnou roli především k boji proti lýkožroutu smrkovému (*Ips typographus*) a jeho eliminaci ve smrkových porostech (LANDA et al. 2007).

Pokusy prováděné v této diplomové části byly zaměřeny na studiu vitality spor, virulenci, růstu, vývoji a produkci spor vybraných endemických kmenů houby *B. bassiana* pomocí in vivo biotestu a in vitro testů v různých teplotních profilech a různých podmínkách prostředí (růst na přirozených substrátech a na umělých živných půdách). Velká pozornost byla při hodnocení virulence a vitality spor také věnována vývoji *B. bassiana*, což má vypovídací hodnotu o postupu vývoje a možnosti potenciálního šíření infekce.

V předkládané diplomové práci byly využívány dva významné testy. Klíčivost spor byla vyhodnocena pomocí stupnice používané pro hodnocení klíčivosti spor entomopatogenních hub: GI – stupnice (LANDA et al. 1994). Tato stupnice má rozmezí od 0 do 3. Je-li index 0, znamená to, že houba *B. bassiana* nejeví žádné známky vitality. Index 3 značí již plně vysporulovaný konidiofor. U všech hodnocených kmenů houby *B. bassiana* byla v tomto testu prokázána velmi vysoká klíčivost. V hodnocení klíčivosti po 24 hodinách se nejlépe projevíly šumavské kmeny (I 101 a NP 0004) u kterých byla klíčivost 100%. Velmi vysokou klíčivost měl také šumavský kmen NP 0008, která byla 99%. U ostatních hodnocených kmenů pak byla klíčivost již nepatrně nižší (97-98%).

Dalším důležitým testem je vývoj *B. bassiana* na larvách *Tenebrio molitor* hodnocený podle FDI indexové stupnice (Fungus development index). Obdobně jako v předchozím stupnici značí index 0 u FDI nečinnost houby a larva zůstává bez jakýchkoli známek infekce. Hostitel napadený *B. bassiana* vykazuje jako první příznaky malé melanizační skvrny na povrchu kutikuly (WEISER 1991) a je mu přiřazen index 0,5 ve stupnici FDI. Saprofytická fáze *B. bassiana* končí plnou sporulací na hostiteli. V průběhu biotestů se v souvislosti s teplotou se objevily u jednotlivých kmenů houby *B.*



*bassiana* velmi výrazné rozdíly ve vývoji. Teplota 20°C byla u všech hodnocených kmenů vyhodnocena pro růst a sporulaci houby jako neoptimálnější. Při teplotě 10°C se rychlost vývoje houby již zpomaluje. Výjimku tvořil teplomilný floridský kmen USA 01, pro který se teplota 10°C jevila jako velmi omezující faktor, naopak při 30°C tento kmen rostl dobře.

U řady druhů entomopatogenních hub je klíčivost, růst a produkce spor velmi významně ovlivněna použitým médiem a teplotou. V první fázi práce byl tedy zkoumán vliv přirozených substrátů na výtěžnost spor jednotlivých kmenů houby *B. bassiana*. Produkce spor je realizována na substrátech, ke kterým patří většinou obiloviny, rýže nebo jiné substráty se škrobovým základem (FENG et al. 1994). V pokusech bylo jako přirozených substrátů zvolena: rýže dlouhozrná, ječné kroupy a semena řepky olejky. Nejvyšší výtěžnost spor byla téměř u všech hodnocených kmenů při teplotě 20°C. Výjimku tvořil floridský kmen USA 01, u kterého byla nejvyšší výtěžnost spor při 30°C. Tento floridský kmen *B. bassiana* pochází na rozdíl od ostatních hodnocených kmenů z nížiny a jeví se jako značně teplomilný. Z hlediska použitého substrátu bylo ve všech případech získáno nejnižší množství výtěžnosti spor na řepce. Jako neoptimálnější substrát se jevilo použití ječných krup, kdy výtěžnost spor byla nejvyšší.

Vlastnosti radiálního růstu a výše produkce spor jsou velmi výrazně ovlivněny výběrem vhodných umělých živných substrátů. V laboratorních podmínkách se běžně používá několik agarizovaných půd. V práci byly hodnoceny tři umělé živné půdy – PDA, SDA a CMA. Radiální růst mycelia, produkce spor a klíčivost je v laboratorních podmínkách závislá jak na teplotě, tak i na živné půdě (ALI-SHTAYEH et al. 2002). V práci byla při kultivaci na umělých živných půdách, která probíhala po dobu 21 dnů jako nejlépe vyhovující vyhodnocena teplota 20°C. Nejlepší výtěžnosti spor při této teplotě dosáhly šumavské kmeny NP 0004 a NP 0008 – nejlepší výtěžnost spor / kulturu byla u umělé půdy SDA, u substrátů PDA a CMA pak byla výtěžnost jen nepatrně nižší. Naopak kmen I 101 při teplotě 20°C nejlépe rostl na SDA a i výtěžnost byla při této teplotě nejvyšší. Slovenský kmen T 08 při teplotě 30°C rostl pouze na PDA, na CMA a SDA nerostl vůbec. U kmene A 32 se jako nejméně vhodného umělého živného substrátu jevilo použití SDA. Teplota 30°C byla téměř u všech kmenů limitní, radiální růst byl při této teplotě velmi malý, stejně tak jako i výtěžnost. Při teplotě 30°C však dosti dobře rostl kmen USA 01, což značí jeho teplomilnost. V průměru byl u všech hodnocených kmenů *B. bassiana* jako méně vhodná umělá živná půda vyhodnocen CMA.

Ze všech prováděných pokusů je zřejmé, že jednotlivé kmeny houby *B. bassiana* se nejlépe vyvíjí v teplotním prostředí 20°C. Všechny kmeny jsou však schopny růst i v teplotě 10°C, avšak jejich vývoj je již razantně pomalejší. V rychlosti vývoje a růstu zvýhodňovala vyšší teplota (30°C) pouze floridský kmen USA 01. Šumavské kmeny NP 0004 a NP 0008 měly ze všech hodnocených kmenů velmi podobné výsledky, což také značí jejich geografickou příbuznost. Ze všech hodnocených kmenů dopadly také tyto dva kmeny v pokusech nejlépe.

## 7. ZÁVĚRY

- Všechny hodnocené kmeny houby *B. bassiana* se nejlépe vyvíjely při teplotě 20°C, přičemž při teplotách 10°C a 30°C byl již vývoj kmenů značně pomalejší.
- V laboratorním biotestu bylo prokázáno, že k nejlépe virulentním kmenům patří především NP 0004 a NP 0008, které velmi rychle rostou na larvách *T. molitor* při teplotě 20°C.
- Schopnost růstu všech hodnocených kmenů houby *B. bassiana* byla prokázána jak na obilovinách, tak i na olejnině (řepka). Mezi výtěžnostmi spor byly v hodnocených teplotách a použitím živného substrátu značné rozdíly. K nejvíce vhodným přirozeným živným substrátům pro kultivaci a výtěžnost spor kmenů houby *B. bassiana* byly kroupy při teplotě 20°C.
- V hodnocení umělých živných médií se umístila ve výtěžnosti spor mezi nejlepší půdy SDA a PDA. Nejlepších výtěžností spor bylo dosaženo při teplotě 20°C. Naopak půda CMA se v průměru projevila jako méně vhodný substrát.
- Schopnost růstu a vývoje jednotlivých kmenů houby *B. bassiana* byla závislá na jejich geografickém původu, což bylo nejlépe markantní při srovnání chladnomilnějších šumavských kmenů (NP 0004, NP 0008, I 101) a teplomilného floridského kmene USA 01.

## 8. SEZNAM LITERATURY

- AINSWORTH G. C., SPARROW F. K. & SUSSMAN A. S. (eds.) (1973): The Fungi. Vol 4A: A taxonomic review with keys-ascomycetes and Fungi imperfecti. – Academic Press, New York, 621 p.
- ALI-SHTAYEH M. S., MARA A.-B. B. M. & JAMOUS R.M. (2002): Distribution, occurrence and characterization of entomopathogenic fungi in agricultural soil in the Palestinian area. – Mycopathologia, 156: 235–244.
- ALVES S. B. (1998): Entomopathogenic Fungi. – In: ALVES S. B. (ed.): Microbial Insect Control. – FEALQ, Piracicaba, p. 289–38.
- AMBETHGAR V. (2002): Exploitation of entomogenous fungi in biological control of crop pests. – In: UPADHYAY R. K., MUKERJI K. G. & CHABLA B. P. (eds.): Biocontrol Potential and Its Exploitation in Sustainable Agriculture. – Springer, 2: 39–56.
- ANONYM (2009): SMĚRNICE EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY 2009 / 128/ ES ze dne 21. října 2009, kterou se stanoví rámec pro činnost Společenství za účelem dosažení udržitelného používání pesticidů. [online 5.4.2011]. – Dostupné z: <http://eur.lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:309:0071:0086:CS:pdf>
- BING L. A. & LEWIS L. C. (1991): Suppression of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae), by endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. – Environ. Entomol., 20: 1207–1211.
- BOUCIAS D. G., PENDLAND J. C. & LARGO J. P. (1988): Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. – Appl. Environ. Microbiology, 54: 1759–1805.
- BOUCIAS D. G. & PENDLAND J. C. (1998): Principles of insect pathology. – Kluwer Academic Publ., Boston, p. 321–359.
- BUTT T. M. (2002): Use of entomogenous fungi for the control of insect pests. – In: KEMPKEN F. (ed.): The Mycota XI. Agricultural applications. – Springer-Verlag, Berlin, p. 110–134.
- BUTT T. M. & GOETTEL M. S. (2000): Bioassays of Entomopathogenic Fungi. – In: NAVON A. & ASCHER K. R. S. (eds.): Bioassay of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. – CAB International, Wallingford, UK, p. 95–140.

- COOMBS J. & COOMBS R. F. (2003): A dictionary of biological control and integrated pest management. – 3rd edition, CPL Press, Newbury, UK, 310 p.
- DIRLBEKOVÁ O. (1991): Biologické zdroje pro mechanickou ochranu rostlin (I. Deuteromycetes, *Beauveria bassiana* [Bals.] Vuill.). – Studie VTR, ÚVITZ, Ř. Rostl. Výr., 11: 10–21.
- FARGUES J., GOETTEL M. S., SMITS N., OUEDRAOGO A., VIDAL C., LACEY L. A., LOMER L. C. & ROUGIER M. (1996): Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. – Mycopathologia, 135: 171–181.
- 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.
- FENG M. G., CARUTHERS R. I., ROBERTS D. W. & ROBSON D. S. (1985): Age-specific dose-mortality effects of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). – Journ. of Invert. Pathol., 46: 259–264.
- FENG M. G., POPRAWSKI T. J. & KHACHATOURIANS G. G. (1994): Production, Formulation and Application of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* for Insect control: Current Status. – Biocontrol Science and Technology, 4: 3–34.
- GLARE T. R. (2004): Biotechnological potential of entomopathogenic fungi. In: ARORA D. K. (ed.): Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications. – Mycology Series, Marcel Dekker, NY, 21: 79–90.
- GOETTEL M. S. (1992): Fungal agents for biocontrol. – In: LOMER C. J. & PRIOR C. (eds): Biological control of locusts and grasshoppers. – CAB International, Wallingford, UK, p. 122–132.
- GOETTEL M. S. & INGLIS G. D. (1997): Fungi: *Hyphomycetes*. – In: LACEY L. A. (ed.): Manual of Techniques in Insect Pathology. – San Diego, Academic Press, p. 211–249.
- GOETTEL M. S., INGLIS G. D., LACEY, L. A. & WRAIGHT S. (2000): Fungi. – In: LACEY L. A. & KAYA H. A. (eds): Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. – Kluwer Academic Publ., Boston, p. 252–282.
- GOTTWALD T.R. & TEDDERS W.L. (1982): Study on the conidia release by the Entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*

- (Deuteromycotina, Hyphomycetes) from adult pecan weevil (Coleoptera, Curculionidae) cadavers. – Environ. Entomol., 11: 1274–1279.
- HALL R.A. (1981): The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. – In: BURGESS H. D. (ed.): Microbial Control of Pests and Plant diseases, 1970 - 1980. – Academic Press, London, p. 483–498.
- HALL R.A. (1985): Whitefly control with fungi. – In: HUSSEY N. W. & SCOPES N. (eds.): Biological pest control - the glasshouse experience. – Cornell University Press, Ithaca, New York, p. 116–118.
- HORŇÁK P. (2004): Monitoring přirozeného výskytu entomopatogenních hub v půdních ekosystémech. – Disertační práce, ZF JČU České Budějovice.
- HUMBER R.A. (1997): Fungi: Identification. – In: LACEY L. A. (ed.): Manual of Techniques in Insect Pathology. – San Diego, Academic Press, p. 135–185.
- INGLIS G. D., GOETTEL M. S., BUTT T. M. & STRASSER H. (2001): Use of Hyphomycetes Fungi for managing insect pests. – In: BUTT T. M., JACKSON C., MAGAN N. (eds.): Fungi as biocontrol agents - progress, problems and potential. – CAB International, Wallingford, UK, p. 23–69.
- JOHNSON M. W. (2000): Biological Control of Pests. – ENTO 675. University of Hawaii, Manoa, p. 1–5.
- KAMP A. M. & BIDOCHKA M. J. (2002): Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. – Lett. Appl. Microbiol., 35: 74–77.
- KREUTZ J., VAUPEL O. & ZIMMERMANN G. (2004): Efficacy of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. against the spruce bark beetle, *Ips typographus* L., in the laboratory under various conditions. – Journal of Applied Entomology, 128: 384–389.
- LANDA Z. (1994): Entomopatogenní houby v biologické ochraně rostlin (habilitační práce). – ZF JČU České Budějovice. 96 p.
- LANDA Z. (1998): Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub. – AGRO-ochrana rostlin, 10: 7–12.
- LANDA Z., OSBORNE L., LOPEZ F. & EYAL J. (1994): A bioassay for determining pathogenicity of entomogenous fungi on whiteflies. – Biological Control, 4: 341–350.
- LANDA Z., KŘENOVÁ Z. & VOJTĚCH O. (2007): Využití houby *Beauveria bassiana* v ochraně proti lýkožroutu smrkovému. – Lesnická práce, 86(10): 14–15.

- LANE B. S., TRINCI P. J. & GILLESPIE A. T. (1991): Endogenous reserves and survival of blastospores of *Beauveria bassiana* harvested from carbon- and nitrogen-limited batch cultures. – Mycol. Res., 95: 821–828.
- McCOY C W., SAMSON R. A. & BOUCIAS D. H. (1988): Entomogenous fungi. – In: IGNOFFO C. M. (ed.): CRC Handbook of natural Pesticides. – CRS Press, Boca Raton, Vol. 5, Part A, p. 151–236.
- MUELLER-KOEGLER E. (1965): Pilzkrankheiten bei Insekten. Anwendung zur biologischen Schädlingsbekämpfung und Grundlagen der Insektenmykologie. – P. Parey Verlag., Berlin, 444 p.
- NAVRÁTILOVÁ M. (2000): Možnosti biologické ochrany a její využití v praxi. – Úroda, 2: 42–44.
- OSBORNE L. S., STOREY G. K. McCOY C.W. & WALTER J. F. (1990): Potential for controlling the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, with the fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. – In: Proceedings of the Vth international colloquium on invertebrate pathology and microbial control. – Adelaide, Australia, 20.–24.8.1990, p. 386–390.
- OSBORNE L. S. & LANDA Z. (1992): Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. – Florida Entomologist, Vol. 75, No. 4: 456–471.
- SAMSON R. A. (1974): Paecilomyces and some allied hyphomycetes. – Studies in Mycology, 6: 1–43.
- SAMSON R. A. & ROMBACH M. C. (1985): Biology of the fungi Verticillium and Aschersonia. – In: HUSSEY N. W. & SCOPES N. (eds.): Biological pest control – the glasshouse experience. – Cornell University Press, Ithaca, New York, p. 34–42.
- SAMSON R. A., EVANS H. C. & LATGÉ J.-P. (1988): Atlas of Entomopathogenic Fungi. – Springer-Verlag, Berlin, 187 p.
- SUNG G.-H., HYWEL-JONES N. L., SUNG, J.-M., LUANGSA-ARD J. J., SHRESTHA B. & SPATAFORA J. W. (2007): Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. – Stud. Mycol. 57: 5–59.
- TANADA Y. & KAYA H. K. (1993): Fungal infections. – In: TANADA Y. & KAYA H. K. (eds.): Insect Pathology. – Academic Press, San Diego, p. 319–387.
- VÁŇA J. (1998): Systém a vývoj hub a houbových organismů. – Praha, 164 p.
- VIDAL C, FARGUES J. & LACEY L. A. (1997): Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: effect of temperature on vegetative growth. – Journ. of Invert. Pathol., 70: 18–26.

- VONDRÁŠKOVÁ Š. (2008): Využití dravého hmyzu v biologické ochraně rostlin [online 5.2.2011]. – Dostupné z:  
<http://www.agronavigator.cz/UserFiles/File/Vyuit%20dravho%20hmyzu%20v%20biologick%20ochran%20rostlin.pdf>
- WALSTAD J. D., ANDERSON R. F. & STAMBAUGH W. J. (1970): Effects of Environmental Conditions on Two species of Muscardine Fungus (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). – Journ. of Invert. Pathol., 16: 221–226.
- WEISER J. (1966): Houbové onemocnění hmyzu. – In: WEISER J.: Nemoci hmyzu. – Academia, Praha, p. 232–234.
- WEISER J. (1991): Mikrobiální insekticidy. – In: HRDÝ I., BÍROVÁ H., HAVELKA J., MAREC F., MRÁČEK Z., LANDA V., SEHNAL F., SOLDÁN T., WEISER J., ZACHARDA M., VRKOČ J., PLÍVA J., PULTAR O., VESELÝ, D. (eds.). Biopesticidy v zemědělství. – Ministerstvo zemědělství ČSFR, p. 30–43.
- 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. W. & MAGAN N. (eds): Fungi as biocontrol agents, progress, problems and potential. p. 253–287.
- ZIMMERMANN G. (1993): The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. – Pestic Sci., 37: 375–379.
- ZIMMERMANN G. (2007): Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. – Biocontrol Science and Technology, 17: 553–596.



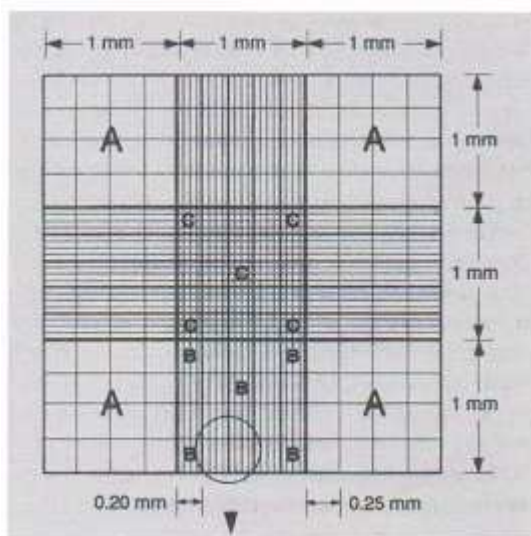
## 9. PŘÍLOHY

### Grafický list 1

#### Metoda stanovení počtu jednotek



Počítací komůrka










Neubauerova počítací komůrka

#### Stanovení počtu jednotek v poli hemocytometru:

- komůrka
- nanesení suspenze
- sedimentace
- výběr vhodného pole (A – B – C)
- max. cca 60 konidií v jednom počítacím poli
- rozdíl počtu mezi jednotlivými poli max. 20%

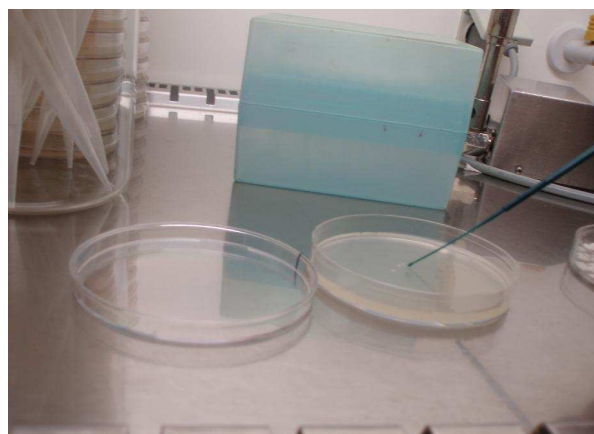
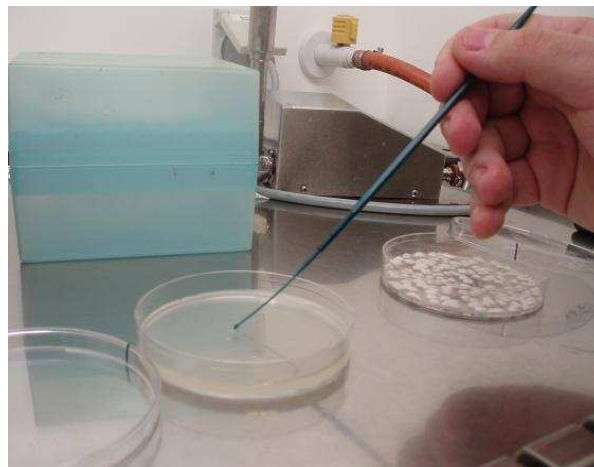
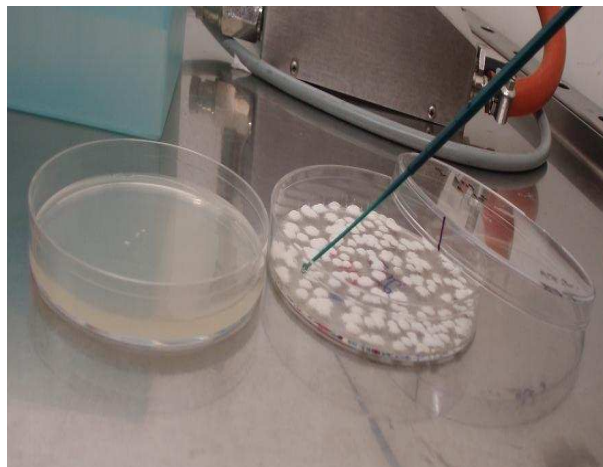
## Grafický list 2

Stupnice FDI (Fungus Development Index) využívaná pro hodnocení virulence jednotlivých kmenů *B. bassiana* na larvy *Tenebrio molitor* – upraveno podle práce HORŇÁK (2004)

0	Larva je živá a nejsou na ní vidět žádné známky infekce, larva je živá		
0,5	Na larvách se postupně po celém povrchu objevují malé melanizační skvrny, které dosud nejsou celistvé.		
1	Začínají se objevovat větší melanizační skvrny, které se nyní začínají spojovat		
1,5	Na hrudních končetinách larev se začíná objevovat vláknité mycelium		
2	Tvoří se vatovité struktury mycelia, dosud nejsou vyvinuty fruktifikační orgány.		
2,5	Začíná sporulace - na konci hyf mycelia se začínají objevovat sporulující konidiofory		
3	Larva je již celá pokryta plně sporulujícím myceliem, které vytváří nové konidie ve vysokém počtu		

## Grafický list 3

### Zakládání středových kultur

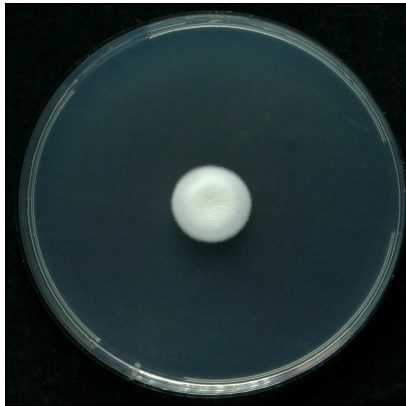


Inokulace *Beauveria bassiana* na živnou půdu (PDA)

## Grafický list 4

Porovnání růstu středových kultur entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene I 101 na různých umělých živných mediích v různých podmínkách teplot.

### Živné medium PDA



10°C

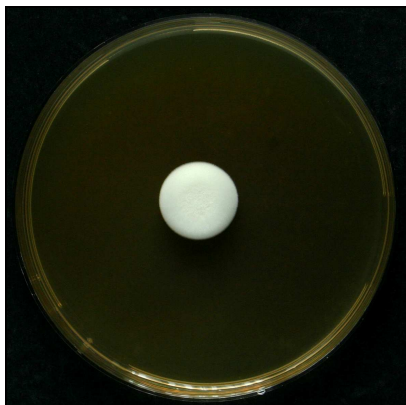


20°C



30°C

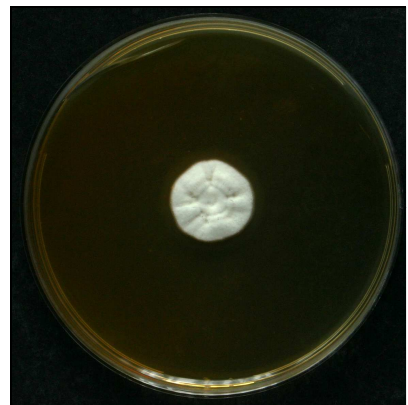
### Živné medium SDA



10°C



20°C

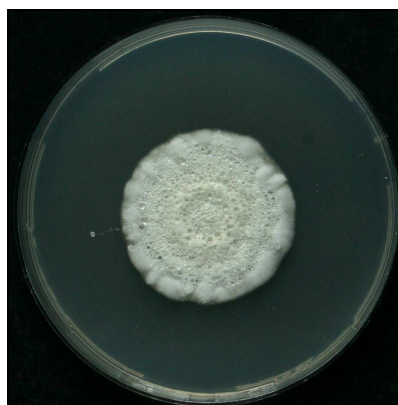


30°C

### Živné medium CMA



10°C



20°C



30°C

## Grafický list 5

Porovnání růstu středových kultur entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene USA 01 na různých umělých živných mediích v různých podmínkách teplot.

### Živné medium PDA



10°C



20°C



30°C

### Živné medium SDA



10°C

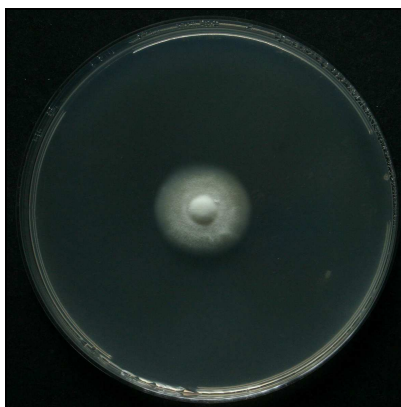


20°C

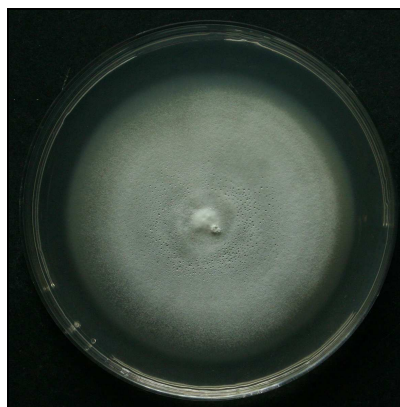


30°C

### Živné medium CMA



10°C



20°C

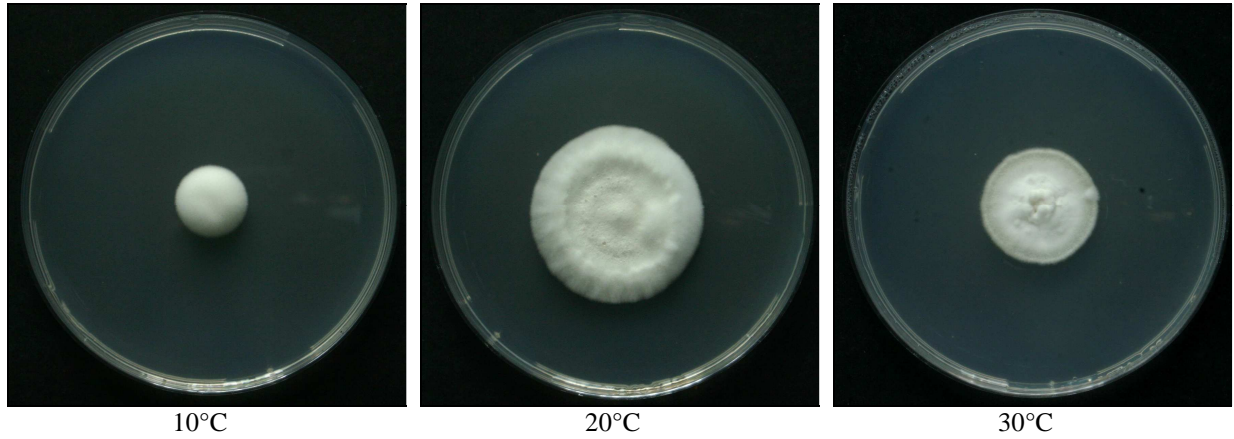


30°C

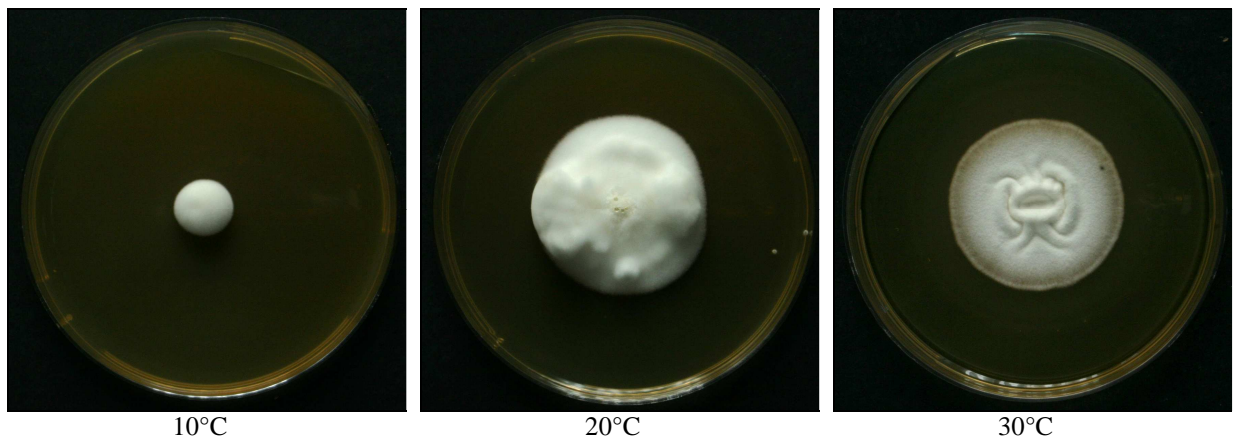
## Grafický list 6

Porovnání růstu středových kultur entomopatogenní houby *B. bassiana* kmene A 32 na různých umělých živných mediích v různých podmínkách teplot.

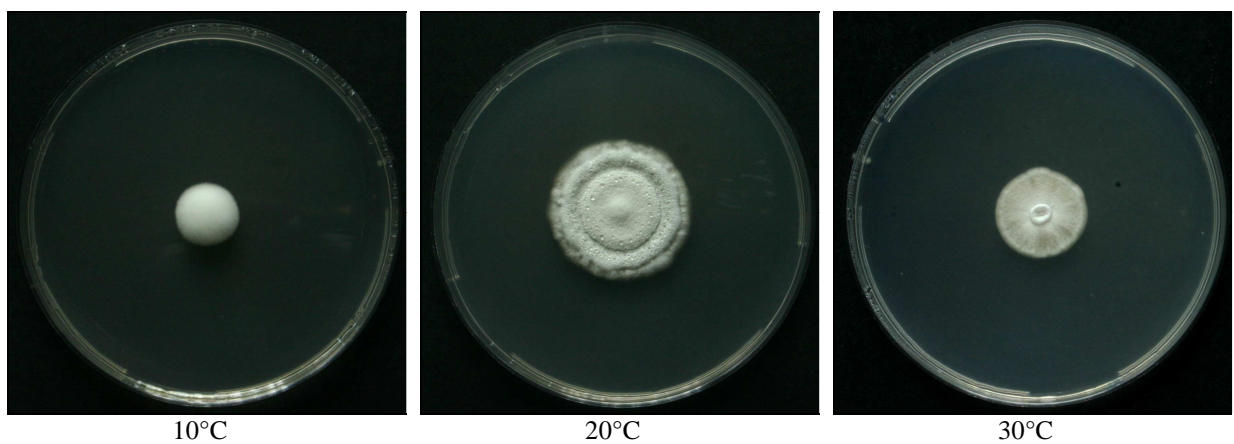
### Živné medium PDA



### Živné medium SDA



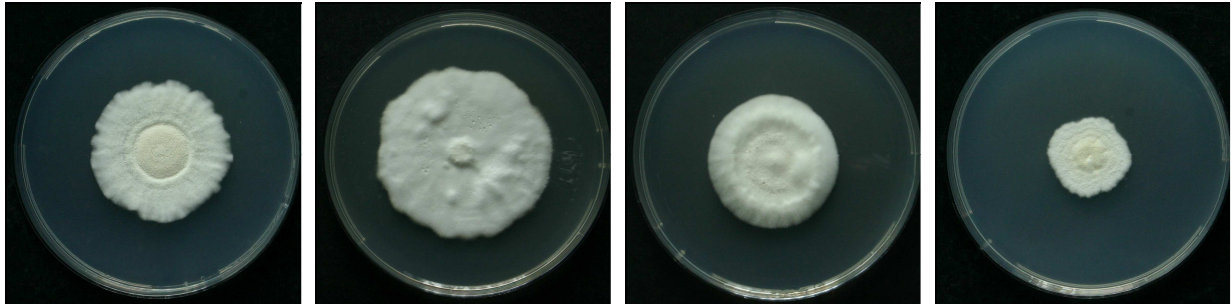
### Živné medium CMA



## Grafický list 7

Srovnání růstu středových kultur jednotlivých kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na různých umělých živných mediích při teplotě 20°C.

### Živné medium PDA



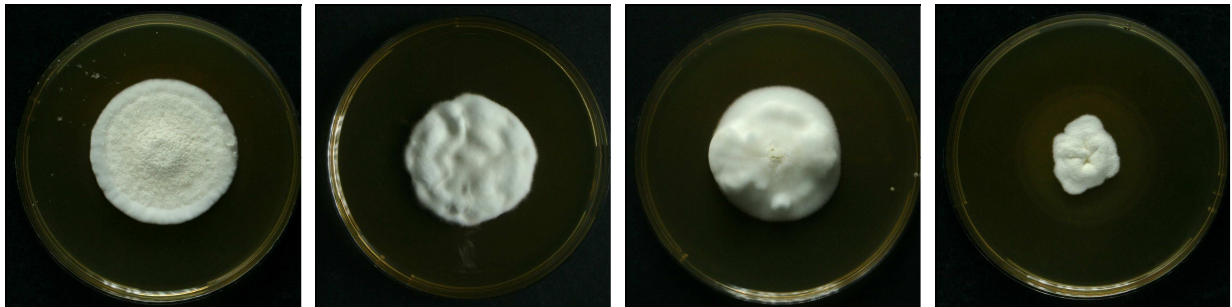
Kmen I 101

Kmen USA 01

Kmen A 32

Kmen T 08

### Živné medium SDA



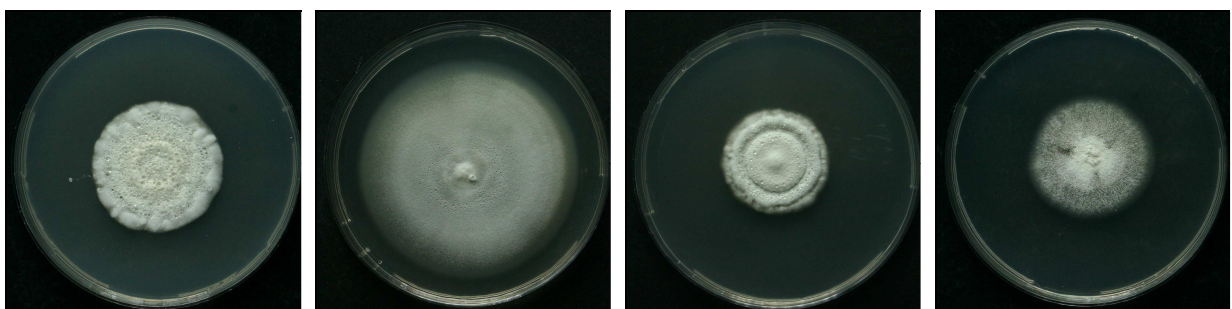
Kmen I 101

Kmen USA 01

Kmen A 32

Kmen T 08

### Živné medium CMA



Kmen I 101

Kmen USA 01

Kmen A 32

Kmen T 08

## Grafický list 8

Srovnání růstu středových kultur jednotlivých kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* na různých umělých živných mediích při teplotě 30°C.

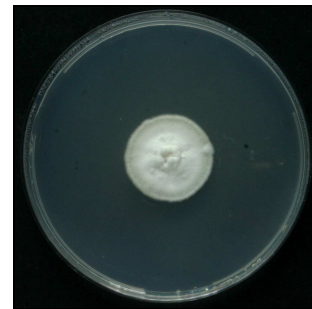
### Živné medium PDA



Kmen I 101

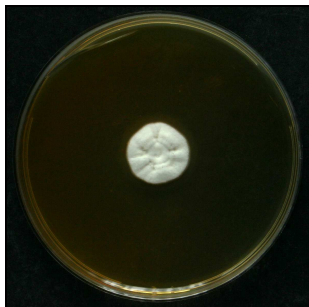


Kmen USA 01



Kmen A 32

### Živné medium SDA



Kmen I 101



Kmen USA 01

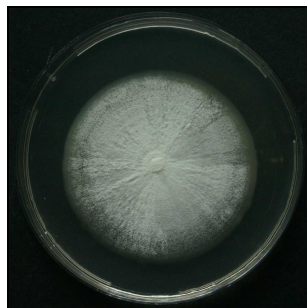


Kmen A 32

### Živné medium CMA



Kmen I 101



Kmen USA 01



Kmen A 32



## Grafický list 9

### Standardní laboratorní biotest



Larvy *Tenebrio molitor* inokulované houbou *Beauveria bassiana* po 7 dnech (teplota 10°C)

### Růst houby *B. bassiana* na přirozených substrátech



Růst *Beauveria bassiana* na kroupách při teplotě 30°C