

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Katedra: Katedra speciální produkce rostlinné

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Účinnost entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae* na
vybrané druhy hostitelů**

Vedoucí diplomové práce

Ing. Andrea Bohatá, Ph.D.

Autor

Bc. Jana Konopická

České Budějovice
Duben, 2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jana KONOPIČKÁ**
Osobní číslo: **Z14295**
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**
Název tématu: **Účinnost entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliaena* vybrané druhy hostitelů**
Zadávací katedra: **Katedra speciální produkce rostlinné**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Cíl diplomové práce je zaměřen na praktické využití entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae* proti vybraným druhům hostitelů. Účinnost kmenů entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae* bude sledována na různých vývojových stádiích hostitelů s cílem stanovit optimální podmínky pro vyvolání nákazy hostitelů v laboratorních podmínkách.

- 1) Hodnocení základních růstových parametrů vybraných kmenů entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae* včetně testování vlivu teploty na růst a vývoj kmenů na umělých živných půdách.
- 2) Zpracování standardních laboratorních postupů biologických "in vivo" testů pro testování virulence entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae* na vybrané druhy hostitelů.
- 3) Kontinuální pasážování vybraného kmene *Metarhizium anisopliae* na vybrané živné půdě, přirozeném substrátu a přes vybrané druhy přirozených hostitelů.
- 4) Průběžné reisolování kmene z kontinuálních pasáží a opakované testování kmene prostřednictvím "in vitro" a "in vivo" testů.
- 5) Testování virulence původního nepasážovaného kmene a všechny linie pastované přes živnou půdu, substrát a hostitele.

Rozsah grafických prací: 10 - 15 stran

Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Bailey A., et al., 2010: Biopesticides. CAB International Cambridge.

Butt T.M., Goettel M.S. 2000: Bioassays of Entomopathogenous Fungi. In: Navon A., Ascher K.R.S. (Eds.): Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. CAB International, Wallingford, UK, 95-140.

Esser K., Lemke P.A. 2002: The Mycota XI.-Agricultural Applications. Springer, Verlag Berlin Heidelberg, pp 388.

Goettel M.S., Inglis G.D., Wraight S.P. 2000: Fungi. In: Lacey L.A., Kaya H.K. (Eds.): Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Kluwer Academic Publishers, 255-282.

Inglis G.D., Goettel M.S., Butt T.M., Strasser H. 2001: Use of hyphomycetes fungi for managing insect pests. In: Butt T.M., Jackson C., Magan N. (Eds.): Fungi as biocontrol agents - progress, problems and potential. CAB International, Wallingford, UK, 23-69.

Weiser J., 1966: Nemoci hmyzu. Nakladatelství Akademia.

Články získané z bibliografické a citační databáze Web of Science a bibliografické databáze CAB, BA, ZR.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Andrea Bohatá, Ph.D.

Katedra speciální produkce rostlinné

Datum zadání diplomové práce: 9. března 2015

Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2016



prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studeniská 13
370 02 České Budějovice
L.S.



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

V Českých Budějovicích dne 9. března 2015

Prohlášení

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, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

.....

Datum

.....

Bc. Jana Konopická

Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí diplomové práce Ing. Andree Bohaté, Ph.D. za odborné vedení, věcné připomínky, vstřícnost a trpělivost při konzultacích. Dále děkuji Ing. Jakobovi Vondruškovi za pomoc a cenné rady při vypracovávání této práce. Poděkování dále patří Olze Divišové za technickou asistenci a pomoc při vyhodnocování pokusů.

ABSTRAKT

Entomopatogenní houba *Metarhizium anisopliae* patří mezi nejrozšířenější druhy využívané v biologické ochraně rostlin. Práce se zaměřuje na účinnost původních a kontinuálně pasážovaných kmenů *M. anisopliae* přes živné substráty a různá vývojová stádia potměníka moučného (*Tenebrio molitor*). U původních a kontinuálně pasážovaných kmenů byl také posuzován růst a výtěžnost spor při rozdílných teplotách kultivace. V této práci byla dále zkoumána účinnost původních kmenů *M. anisopliae* na vybrané hospodářsky významné škůdce. Kmeny byly v laboratorních podmínkách testovány na populacích dospělců blýskáčka řepkového (*Meligethes aeneus*) a krytonosce šesulového (*Ceutorhynchus obstrictus*) a na vajíčkách mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*). Na vajíčkách mandelinky bramborové byly testovány i další významné entomopatogenní houby.

Klíčová slova: biologická ochrana, entomopatogenní houby, *M. anisopliae*, kontinuální pasážování

ABSTRACT

Entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is one of the most common species used in biological control against pests. The thesis is analyzing effectiveness of original strains and continuously passaged strains of *M. anisopliae* through nutrient substrates and different developmental stages mealworm (*Tenebrio molitor*). For original and continuously passaged strains were also evaluated the growth and spore production at different temperatures cultivation. In this thesis was investigated the efficacy of the original strains of *M. anisopliae* on selected economically important pests. Strains were tested on populations of adults Pollen beetles (*Meligethes aeneus*) and Cabbage seedpod weevil (*Ceutorhynchus obstrictus*) and the eggs of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) in laboratory conditions. Other entomopathogenic fungi were tested on the eggs of Colorado potato beetle eggs.

Key words: biological control, entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae*, continuously passaged

OBSAH

1. ÚVOD.....	8
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
2.1 Integrovaná ochrana rostlin	9
2.2 Biologická ochrana.....	10
2.2.1 První skupina přirozených nepřátel - makroorganismy	11
2.2.2 Druhá skupina přirozených nepřátel - mikroorganismy	12
2.2.3 Prostředky používané v biologické ochraně rostlin - výhody a nevýhody	14
2.2.4 Přehled povolených makroorganismů a mikroorganismů v ČR.....	15
2.3 Entomopatogenní houby.....	16
2.3.1 Vývojový cyklus entomopatogenních hub	17
2.3.2 Charakteristika významných entomopatogenních hub.....	19
2.4 Rod <i>Metarhizium</i>	20
2.4.1 Rozšíření.....	20
2.4.2 Faktory ovlivňující účinnost hub rodu <i>Metarhizium</i>	20
2.5 Významný druh <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff) Sorokin	24
2.5.1 Taxonomie.....	24
2.5.2 Morfologie.....	25
2.5.3 Izolace <i>M. anisopliae</i>	25
2.5.4 Produkce <i>M. anisopliae</i>	26
2.6 Subkultivace hub <i>in vitro</i> a kontinuální pasážování hub <i>in vivo</i>	28
2.6.1 Subkultivace entomopatogenních hub.....	28
2.6.2 Kontinuální pasážování entomopatogenních hub.....	29
3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	31
4. MATERIÁL A METODIKA	32
4.1 Kmeny entomopatogenní houby <i>Metarhizium anisopliae</i>	32
4.2 Imobilizace hub do alginátových pelet.....	32
4.3 Používaná živná média	32
4.4 Půdní výluh.....	34
4.5 Příprava suspenzí.....	34
4.6 <i>In vitro</i> testy.....	34
4.7 <i>In vivo</i> testy	36
4.8 Statistická analýza	39
4.9 Využívaná technika při pokusech.....	39

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY	40
5.1 Vliv teploty na růstové a produkční parametry středových kultur původních kmenů entomopatogenní houby <i>M. anisopliae</i> v závislosti na době kultivace	40
5.2 Porovnání původních a desetkrát pasážovaných variant kmenů houby <i>M. anisopliae</i> přes umělé živné médium, substrát a vývojová stádia hostitele <i>T. molitor</i>	48
5.3 Vliv teploty na růst a výtěžnost spor středových kultur houby <i>M. anisopliae</i> po deseti kontinuálních pasážích původních kmenů přes dospělé <i>T. molitor</i>	56
5.4 Standardní test klíčivosti – GI (Germination index)	64
5.5 Vliv koncentrace spor kmenů BIO 1020 a Man 3B entomopatogenní houby <i>M. anisopliae</i> na účinnost proti larvám <i>T. molitor</i>	66
5.6 Vliv původních a desetkrát pasážovaných variant kmenů houby <i>M. anisopliae</i> na účinnost proti hostiteli potměníka moučného (<i>T. molitor</i>)	69
5.7 Hodnocení účinnosti kmenů entomopatogenní houby <i>M. anisopliae</i> na dospělcih blýskáčka řepkového (<i>Meligethes aeneus</i>)	76
5.8 Hodnocení účinnosti kmenů entomopatogenní houby <i>M. anisopliae</i> na dospělcih krytonosce šešulového (<i>Ceutorhynchus obstrictus</i>).....	81
5.9 Vliv ošetření na růst a vývoj entomopatogenních hub na vajíčkách mandelinky bramborové (<i>L. decemlineata</i>) pomocí biotestu FDGI	84
6. DISKUZE.....	86
7. ZÁVĚRY.....	90
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	91
9. PŘÍLOHY.....	96

1. ÚVOD

Ochrana rostlin před hmyzími škůdci a fytofágními roztoči se provádí převážně pomocí pesticidů. To je důvod, proč se rozvíjí integrovaná ochrana rostlin, která se snaží omezit používání chemických látek a tím chránit životní prostředí. V minulosti se používaly širokospektrální, pro savce toxické a velmi perzistentní pesticidy, které způsobovaly vysokou mortalitu necílových druhů. Navíc vysoká intenzita chemické ochrany a opakované pesticidní zásahy měly podstatný vliv na vznik rezistentních populací škodlivých organismů.

Jedním z východisek je biologická ochrana rostlin. Biologická ochrana rostlin využívá přirozené nepřátele s cílem regulovat populace nežádoucích činitelů. Mezi přirozené nepřátele patří parazité, parazitoidi, predátoři nebo patogenní mikroorganismy, které jsou schopni potlačit populace škůdců bez narušení přírodní rovnováhy. Oproti pesticidům jsou biologické přípravky na bázi makroorganismů nebo mikroorganismů pro člověka a necílové organismy neškodné a nepředstavují ekologickou zátěž pro životní prostředí.

Z patogenních mikroorganismů jsou nejvíce prozkoumány bakterie a houby. Houby nacházejí využití jak v regulaci houbových chorob rostlin (mykoparazitické houby), tak i v regulaci škůdců z říše hmyzu (entomopatogenní, akarifágní, nematofágní houby). Vysoký potenciál entomopatogenních hub spočívá především v jejich celosvětovém rozšíření a přirozené přímé asociaci s mnoha druhy škůdců rostlin. Nevýhodou použití je závislost účinnosti bioagens na podmínkách prostředí, zvláště na teplotě a relativní vzdušné vlhkosti. Tím se použitelnost omezuje pouze na určité klimaticky příznivé areály a prostory jako jsou skleníky.

Diplomová práce se věnuje problematice entomopatogenních hub, konkrétně entomopatogenní houbě *Metarhizium anisopliae*. Cílem práce je zaměřením se na navýšení virulence hub pomocí kontinuálního pasážování vybraných kmenů houby *M. anisopliae* s následným porovnáním jejich růstu a produkce spor s původními kmeny, včetně sledování vývoje kmenů v různých teplotních podmínkách. Významná část práce je věnována porovnání virulence původních kmenů *M. anisopliae* a jejich pasážovaných variant přes vybrané hostitele, zejména na larvách potěmníka moučného (*Tenebrio molitor*). Účinnost původních kmenů byla sledována i na vybraných druzích zemědělsky významných škůdců, dospělých blýskáčka řepkového (*Meligethes aeneus*) a krytonosce šesulového (*Ceutorhynchus obstrictus*). Na vajíčkách mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*) byl sledován vliv patogeneze různých druhů entomopatogenních druhů hub potencionálně použitelných v praxi.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Integrovaná ochrana rostlin

Integrovaná ochrana rostlin (IOR) jako způsob ochrany rostlin, se v zemědělské praxi úspěšně praktikuje již dlouhou dobu. Kombinuje biologickou, fyzikální, pěstební a usměrněnou chemickou regulaci i užití rezistentních odrůd. Využívá, je-li to vhodné a možné, veškeré dostupné informace o aplikaci a kombinaci všech šetrných metod regulace. IOR se zakládá na pečlivém sledování početnosti škůdců i jejich přirozených nepřátel s čímž souvisí průběžné přizpůsobování regulačních metod aktuálním potřebám. Regulační metody spolupůsobí v komplexu, nejsou antagonistické ani se vzájemně nevylučují (Navrátilová 2015a).

Klasická definice FAO (organizace pro výživu a zemědělství) z roku 1967 charakterizuje IOR jako „komplexní systém, opatření zaměřená na regulaci četnosti populací škůdců s ohledem na ekologické, ekonomické, toxikologické a hygienické požadavky, se záměrem udržet četnost populací škůdců na tolerovatelné úrovni, při záměrném preferování a vědomém využívání přirozených metod regulace populací škůdců“ (Landa 2002).

Mezi metody, které se využívají v IOR a vzájemně se doplňují, patří agrotechnické, genetické, mechanické, fyzikální, biotechnické a chemické metody, které dlouhodobě regulují populace škodlivých organismů s ohledem na ekonomickou situaci a bez nežádoucích vedlejších ekologických a toxikologických vlivů na životní prostředí. Jedná se o efektivní ochranu před patogeny, škůdci a pleveli (Bailey *et al.* 2010).

Regulace používání pesticidů v EU

IOR je podle unijní i národní legislativy systém osmi vzájemně provázaných zásad, jejichž uplatňování (a kontrola dodržování) se podřizuje obecné definici IOR, uvedené v rámcové směrnici Evropského parlamentu a Rady 2009/128/ES o udržitelném používání pesticidů. Hlavní cíl směrnice je chránit lidské zdraví a životní prostředí před možnými riziky spojenými s používáním pesticidů (Ministerstvo zemědělství 2014). Od 01. 01. 2014 dle vyhlášky č. 205/2012 Sb., o obecných zásadách IOR (vychází z rámcové směrnice) mají všichni pěstitelé postupovat podle doporučených zásad IOR, které zahrnují pro ochranu rostlin jak agrotechnická opatření, střídání osevních postupů, metody pro monitoring a správné načasování zásahu, tak snižování zátěže pesticidy a nahrazování razantní ochrany šetrnějšími přípravky nebo prostředky na ochranu rostlin (Navrátilová 2015a). Kontrolu dodržování obecných zásad IOR v České republice provádí Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ) na základě tzv. kontrolního bodového systému (Ministerstvo zemědělství 2014).

2.2 Biologická ochrana

Ačkoliv je biologická ochrana stará jako lidstvo samo (Navrátilová 2015a), a její podstata je vcelku jednoduchá a zřejmá, s její definicí už to tak jednoduché není. To podotýká např. Lazarovitz *et al.* (2007), když v nadsázce upozorňuje, že vědci jsou schopni se o této definici přít a hádat prakticky do nekonečna, přičemž poukazuje např. na rozpory mezi jednotlivými definicemi entomologů a fytopatologů. Jednou z možných variant je tak např. tvrzení, že biologická ochrana umožňuje používání živých organismů k potlačení populace organismu jiného - škodlivého. I za normálních okolností jsou totiž populace všech živých organismů v přírodě snižovány pomocí predátorů, parazitů, parazitoidů a různých mikroorganismů. Jsou-li škůdci tímto způsobem kontrolováni záměrně, jedná se o biologickou ochranu (Hajek 2004). Landa (2002) k tomuto dodává, že biologickou ochranou se rozumí nejen samo záměrné využívání a cílená podpora přirozených nepřátel, ale i úmyslné využívání a podpora systémů v interakcích „živý proti živému“. V podobném duchu se nese i další, tentokrát „fytopatologická“ definice Prokinové a Dukové (2015), které biologickou ochranu formulují jako redukci množství inokula nebo aktivity patogena či parazita v jejich aktivním nebo dormantním stádiu pomocí jednoho nebo více organismů, čehož je dosaženo přirozeně, manipulací s prostředím, hostitelem či antagonistou nebo masovým rozvojem jednoho nebo více antagonistů.

Přirození nepřátelé

Jak již bylo zmíněno výše, v rámci idey biologické ochrany využíváme tzv. „přirozené nepřátelé“. Přirození nepřátelé jsou organismy, které nepříznivě ovlivňují život jiných organismů. Aplikují se s cílem regulovat populace škůdců pod ekonomickým prahem škodlivosti, zpomalovat a oddalovat vznik jejich rezistence vůči pesticidům a snižovat kontaminace životního prostředí (Honěk *et al.* 2008). Obecně spadá využívání přirozených nepřátel do vyšší kategorie tzv. „alternativní ochrany“. V rámci ní jsou dále uvažovány i metody agrotechnické (např. zpracování půdy, osevní postupy), bioracionální (např. feromony, analogy hormonů ovlivňující vývoj škůdců, syntetické látky indukující a navozující rezistenci rostlin) a genetické (např. rezistentní odrůdy, introdukce sterilních samců) (Landa 2002), přičemž v širším slova smyslu lze do této skupiny bioracionálních pesticidů zahrnout také růstové regulátory rostlin, rostlinné extrakty, ale někdy i transgenní rostliny s vlastnostmi související s ochranou rostlin (Navrátilová 2015a).

Sami přirození nepřátelé se dělí do dvou skupin. Do první skupiny se řadí různé druhy makroorganismů, do kterých patří paraziti, parazitoidi a predátoři, druhou skupinu tvoří mikroorganismy především viry, bakterie, hlístice a houby (Hajek 2004).

Jednotlivé způsoby biologické ochrany se ve své práci pokusil zrevidovat a sjednotit Eilenberg *et al.* (2001), který rozlišuje několik metod biologické ochrany rostlin: klasickou biologickou metodu, augmentační metodu (která může být dále dělena na inundativní či inokulativní) a konzervační metodu.

2.2.1 První skupina přirozených nepřátel - makroorganismy

Do první skupiny přirozených nepřátel patří organismy větších rozměrů tzv. makroorganismy. Řadíme sem parazity, parazitoidy a predátory.

Parazitoidi a paraziti

Parazitoidi jsou významnou složkou biologické ochrany z kmene členovců. Na svého hostitele jsou vázáni nejen potravně, ale zároveň se v něm nebo na něm vyvíjejí (Navrátilová 2015a), přičemž svého hostitele nakonec zabíjejí (Kocourek 2013b). Někteří mohou napadat všechna vývojová stádia, jiní se naproti tomu specializují na konkrétní stádium. Larvy se živí tkáněmi a tělními tekutinami hostitele. Dospělí parazitoidi se živí rostlinnou potravou (Honěk *et al.* 2008). Naproti tomu paraziti, kteří se částečně nebo úplně vyživují na hostitelském organismu, jehož přítomnost také potřebují ke svému vývoji (Navrátilová 2015a), oslabují hostitele zvenčí (ektoparaziti) nebo zevnitř (endoparaziti) (Honěk *et al.* 2008), avšak svého hostitele zpravidla vůbec neusmrcují, a když ano, tak ne v krátké době. I z tohoto důvodu nejsou v biologické ochraně tak významní (Navrátilová 2015a).

Biologické prostředky na bázi parazitoidů obsahují převážně kukly. Významnými parazitoidy jsou vosičky *Encarsia formosa*, *Aphidius colemani*, *A. ervi*, *Aphelinus abdominalis*, *Dacnusa sibirica* a *Diglyphus isae*. Významný je také rod *Trichogramma*, který se využívá proti mnoha druhům motýlů (Tichá 2001; Hajek 2004), přičemž využití zástupců tohoto rodu se, jako jeden z mála příkladů, uplatňuje i v polních podmínkách při regulaci zavíječe kukuřičného (Hofmanová 2003).

Predátoři

Predátoři patří také k významným přirozeným nepřátelům členovců. Na rozdíl od parazitů a parazitoidů nejsou predátoři na hostitele vázáni vývojově, ale pouze potravně.

Sami se řadí mezi polyfágní organismy (Hoffmann, Frodsham 1993), i když zpravidla potravně určitý druh preferují (Navrátilová 2015a). Jsou to vlastně draví živočichové, kteří zabíjejí velký počet druhů kořisti, jejímž požíváním se živí (Kocourek 2013b). Nerozlišují mezi vývojovými stádii a někteří se také alternativně živí i rostlinnou potravou. Predátory lze najít po celé rostlině včetně její podzemní části. Spotřeba potravy je oproti parazitoidům vysoká (Hoffmann, Frodsham 1993).

Biologické prostředky na bázi predátorů jsou k dostání ve formě dospělců. Významní jsou draví roztoči např. *Typhlodromus pyri*, *Phytoseiulus persimilis*, *Amblyseius californicus*, *A. cucumeris* a *A. degenerans*. Do významných predátorů patří také dravé plošnice *Orius insidiosus*, *O. laevigatus*, *O. majusculus* a *Macrolophus caliginosus*. Dále zlatoočko *Chrysoperla carnea* a slunéčka *Hippodamia convergens* a *Cryptolaemus montrouzieri* (Hajek 2004).

2.2.2 Druhá skupina přirozených nepřátel - mikroorganismy

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

Entomopatogenní viry

Entomopatogenní viry patří mezi obligátní parazity, kteří se reprodukují pouze ve vhodném intracelulárním prostředí. Reprodukce virů je tedy závislá na hostitelském organismu. Částice viru je tvořena proteinovou složkou (kapsida) a jedním typem nukleové kyseliny (Kůdela 1989). Nejvýznamnější čeleď v biologické ochraně asociovaná s hmyzem je Baculoviridae (tzv. bakuloviry). Viry z této skupiny způsobují infekce jen u hmyzu a jsou biochemicky i geneticky velmi odlišné od virů, které napadají obratlovce, díky čemuž jsou považovány za bezpečné pro člověka. Do této čeledi patří dva významné rody *Nucleopolyhedrus* a *Granulovirus*. Bakuloviry infikují převážně larvy hostitele, které byly infikovány během příjmu potravy (Bailey *et al.* 2010), přičemž v některých případech stačí k započatí infekce končící smrtí hostitele již několik málo (3 - 17) částic viru (Navrátilová 2015b). Virus infikuje buňky střeva, a poté se šíří do celého těla. Při infekci se hostitel stává oslabeným, má snížený vývoj a pohyblivost. Finálním stádiem virového onemocnění je úplné

ztekucení tělního obsahu hostitele, praskání kutikuly a kapénková kontaminace. Smrt nastává do 5 - 8 dnů v závislosti na množství inokula viru. Nemocné a mrtvé larvy slouží jako další inokulum pro přenos viru. Částice viru se mohou šířit také deštěm a jinými zvířaty (Bailey *et al.* 2010).

Entomopatogenní bakterie

Entomopatogenní bakterie jsou jednobuněčné prokaryotní organismy, které nemají vnitřní membránové organely (mitochondrie, chloroplasty). Doposud bylo izolováno více než 90 druhů bakterií, které vykazují patogenitu k hmyzu. Nejvýznamnější čeledí v biologické ochraně je Bacillacea, zejména rody *Clostridium* a *Bacillus*. Jako biopesticid se používá druh *Bacillus thuringiensis*, který je díky svým vlastnostem zcela unikátní. *Bacillus thuringiensis* obsahuje velké plazmidy nesoucí geny kódující produkci tzv. δ -endotoxinů, které jsou součástí tzv. krystalu (proteinové inkluze). Krystal představuje klíčový prvek toxicity a selektivity biopreparátů na bázi tohoto mikroorganismu (Landa 2002). Infekce začíná pozřením potravy infikované bakterií či jejím bílkovinným krystalem (Hajek 2004), načež endotoxin, uvolněný z krystalu a aktivovaný v alkalickém prostředí střeva hmyzu (Hýsek, Vach 2015), napadá buňky epitelu středního střeva, které perforuje (Navrátilová 2015b). Následně dochází k prorůstání *B. thuringiensis* a dalších bakterií ze střev do tělní dutiny (Hýsek, Vach 2015). Ačkoliv u některých druhů trvá i měsíc, než dojde k usmrcení hostitele (Hajek 2004), obvykle dochází k uhynutí již za 4 - 7 dní (Navrátilová 2015b).

Entomopatogenní bakterie *B. thuringiensis* má více než čtyřicet sérotypů. K neznámějším patří *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, který je součástí mnoha biopreparátů, které jsou určeny např. proti škodlivým housenkám bělásků, píďalek, obalečů, bekyní a dalších motýlů (Lepidoptera) (Hýsek, Vach 2015). Mezi další účinné variety patří *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* a *B. thuringiensis* var. *san diego* účinný proti zástupcům řádu brouků (*Coleoptera*) a *B. thuringiensis* var. *israeliensis* proti řádu dvoukřídlí (Diptera) (Landa 2002).

Entomopatogenní hlístice

Pro biologickou ochranu jsou nejdůležitější entomopatogenní hlístice z čeledi Steinernematidae a Heterorhabditidae. Patří mezi vysoce virulentní obligátní parazity hmyzu. Hlístice mají celkem čtyři vývojové stupně. Jediný vývojový stupeň, který je infekční, je ten v pořadí třetí. Larva třetího stupně je vzhledem ke svým specifickým vlastnostem a funkcím označována jako invazní larva (Landa 2002). Invazní larva je také jediným vývojovým stádiem, kdy hlístice nepřijímá potravu a intenzivně vyhledává hostitele, do kterého proniká přirozenými

otvory, jako je ústní, řitní nebo dýchací otvor. Tyto hlístice žijí v symbióze s bakteriemi rodu *Xenorhabdus* nebo *Photorhabdus*. V infekční fázi je u hlístic v přední části zažívacího traktu vyvinuta bakteriální komůrka, ve které se vyskytují tyto symbiotické bakterie. Po proniknutí hlístice do hostitele jsou bakterie vypuštěny do hemolymfy, kde se rychle namnoží a způsobí usmrcení napadeného hmyzu. Toto usmrcení je zaviněno septikémií a dezintegrací tělních tkání a orgánů hostitele. Po úspěšné invazi symbiotickými bakteriemi, jimiž se následně hlístice živí, jsou hlístice vázány na tělní dutinu hostitele, kde také ukončují svůj vývoj. Klíčovým mechanismem tohoto parazitizmu je symbiotická asociace entomopatogenních hlístic se specifickými bakteriemi, které by jinak nebyly schopné hostitele parazitovat (Lacey, Georgis 2012; Bailey *et al.* 2010). Napadené larvy jsou obvykle usmrcovány již během dvou dnů (Navrátilová 2015b).

Entomopatogenní houby

Entomopatogenní houby jsou již dlouhou dobu známy jako původci infekcí u hmyzu, který způsobuje významné škody na kulturních plodinách. Mají široké hostitelské spektrum, proto jsou často využívány v biologické ochraně rostlin. Podrobnější charakteristika entomopatogenních hub je popsána níže v samostatné kapitole.

2.2.3 Prostředky používané v biologické ochraně rostlin - výhody a nevýhody

Mezi výhody, zejména v porovnání s mnoha riziky, které přinášejí pesticidy, patří snižování kontaminace životního prostředí a surovin pro výrobu potravin, snižování reziduí přípravků na ochranu rostlin a zpomalení nebo oddálení vzniku rezistence škůdce vůči pesticidům (Kocourek 2013a; Hofmanová 2003). Navíc při použití biologické ochrany obvykle nedochází ke zhoršování stability ekosystému (Navrátilová 2015b) a je tak možné provádět přímou cílenou ochranu bez zasažení necílových organismů, protože biologické prostředky nejsou toxické pro živočichy a další necílové organismy a mohou mít dlouhodobý efekt (Prokinová, Duková 2015). Nikoliv nepodstatný není ani fakt, že na rozdíl od použití pesticidů se zpravidla nevystavujeme riziku celé řady nepřímých nákladů, které se běžně při kalkulacích nezohledňují (zvýšené výdaje na zdravotnictví, čištění vod, energie) (Navrátilová 2015b).

Nevýhodou naopak je, že i když má v přírodě každý živočišný druh své nepřátele, není jednoduché je uvést do biologické ochrany (Hofmanová 2003). Profesionální použití biologické ochrany vyžaduje detailní znalost o plodině, škodlivém organismu, časování aplikace, použitelnosti a je velmi pracné. Mezi další zápory patří pozvolnější doba účinnosti než

u chemické ochrany (Navrátilová 2015a), přičemž tato účinnost ve velké míře závisí na biotických a abiotických faktorech prostředí (Prokinová, Duková 2015). Omezené zavedení biologické ochrany do praxe je tak zatím i z důvodu této nevyrovnanosti v účinnosti přípravků a dosud není známa přesná specifikace využití mnoha biopreparátů (Hýsek, Vach 2014).

Příroda není laboratoř, a tak je často obtížné škůdce v podmínkách, které mu nejsou přirozené, namnožit a distribuovat je na místo určení. V celosvětovém měřítku je v současnosti využitelných pouze asi jen jedno sto přirozených nepřátel škůdců. Jde o dravý hmyz, dravé roztoče, parazitický hmyz, háďátka a mikrobiální patogeny hmyzu a roztočů. Biologická ochrana rostlin je práce s živým materiálem, a proto je ve většině případů složitější než ochrana chemická (Hofmanová 2003). V podmínkách České republiky je tak biologická ochrana zatím využitelná zejména v uzavřených či regulovaných prostorách (skleníky, fóliovníky, zimní zahrady), u pěstitelských substrátů, v trvalých kulturách, polních kulturách a skladech (Navrátilová 2015a) a při moření osiva (Prokinová, Duková 2015).

2.2.4 Přehled povolených makroorganismů a mikroorganismů v ČR

Ve sklenicích je možné využít řadu makroorganismů např. dravé roztoče (*Amblyseius californicus*, *A. cucumeris*, *A. degenerans*, *Hypoaspis aculeifer*, *Phytoseiulus persimilis*), dravé bejlomorky (*Aphidoletes aphidimyza*), sluněčka (*Cryptolaemus montrouzieri*), blanokřídli (*Aphidius colemani*, *A. ervi*, *Dacnusa sibirica*, *Diglyphus isaea*, *Encarsia formosa*, *Eretmocerus eremicus*, *Leptomastix dactylopii*), parazitické hlístice (*Heterorhabditis bacteriophora*, *Phasmarhabditis hermaphrodita*, *Steinernema feltiae*) a dravé ploštice (*Macrolophus caliginosus*, *Orius laevigatus*). V polních kulturách lze využít makroorganismy patřící do čeledi blanokřídli (*Trichogramma brassicae*, *T. evanescens*, *T. pintoi*) a v ovocných sadech a vinicích je povolen dravý roztoč (*Typhlodromus pyri*) (Navrátilová 2015a ; Honěk *et al.* 2008).

V ČR je povoleno pět mikroorganismů, na jejichž bázi se vyrábějí komerční biopreparáty. Mezi mikroorganismy, které jsou u nás registrované, patří *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (preparát Lepinox plus), který je povolen v polních kulturách, ovocných sadech, vinicích i lesních porostech, *Bacillus subtilis* (preparát Serenade ASO) používaný především k ochraně zeleniny, *Coniothyrium minitans* (preparáty Contans WG, Euro-ChemKoniotans) a *Pythium oligandrum* (preparáty Polyversum, Polyversum – Biogarden, Polyversum – Polygandrom), které jsou registrovány do polních kultur a *Cydia pomonella* Granulovirus (preparáty Carpovirusine, Madex, Madex Top) registrovaný do ovocných sadů a vinic (Navrátilová 2015a).

2.3 Entomopatogenní houby

Odborníky je odhadováno, že více jak 1 milion druhů hmyzu způsobuje škody v zemědělství a lesním hospodářství. Z tohoto důvodu je důležité nejen vyvinout dostatečně účinné metody ochrany, ale zejména porozumět biologii jejich přirozených nepřátel, mezi něž mj. patří i entomopatogenní houby (Augustyniuk-Kram, Kram 2012). Jako „entomopatogenní“ je označována skupina hub, která útočí, infikuje a zabíjí hmyz, díky čemuž jsou tyto houby považovány za významné biologické regulátory pro kontrolu hmyzích populací (Gul *et al.* 2014).

Skupina entomopatogenních hub je fylogeneticky velmi různorodá a zahrnuje jak jednobuněčné kvasinky, tak vláknité (hyfální) houby (Inglis *et al.* 2001), mezi něž se řadí obligátní i fakultativní patogeni (Gul *et al.* 2014; Landa 1994) s rozmnožováním pohlavním (sexuálním) i nepohlavním (asexuálním) (Inglis *et al.* 2001). V současné době je známo asi 90 rodů, v rámci nichž je více jak 700 druhů, které jsou považovány za entomopatogenní (Landa 1994).

Rozdíly mezi houbami a prvoky byly revidovány s pokroky v molekulární biologii, která je používána jako nástroj klasifikace. I v současné době je ale taxonomie hub stále nestabilní a dochází k revizím (Gul *et al.* 2014; Shah, Pell 2003; Liu *et al.* 2001).

I přesto, že zástupce entomopatogenních hub nacházíme takřka napříč celou říší hub (Clarkson, Charnley 1996), většina z nich patří do řádu Entomophthorales oddělení Glomeromycota a řádu Hypocreales oddělení Ascomycota. Mnoho entomopatogenních hub bylo v rámci fylogenetických studií revidováno. Například takové druhy jako *Paecilomyces farinosus* a *P. fumosoroseus* v současné době patří podle nové klasifikace do rodu *Isaria* a druh *Verticillium lecanii* do rodu *Lecanicillium* (Augustyniuk-Kram, Kram 2012).

Řád Hypocreales sdružuje fakultativní parazity, které je možné kultivovat na umělých živných půdách a substrátech, a proto se v současnosti hojně využívají ve formě standardních biopreparátů. Do tohoto řádu patří houby s širokým hostitelským spektrem a zařazují se sem významné rody *Beauveria*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Isaria* a *Lecanicillium*. Naproti tomu Entomophthorales zahrnuje houby patřící do rodů *Conidiobolus*, *Entomophaga*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Neozygites* a další. Jsou to obligátní parazité, kteří jsou striktně vázáni na jeden konkrétní druh živého hostitele, což představuje komplikace při výrobě biopreparátů (Bailey *et al.* 2010).

Obecně se zástupci entomopatogenních hub nachází téměř po celém světě. Např. *Beauveria bassiana* byla nalezena i v tropickém deštném pralese (Augustyniuk-Kram, Kram 2012) stejně jako v chladných půdách Finska (Vänninen 1995) a další zástupci

entomopatogenních hub byly nalezeny také v arktické oblasti Grónska a Antarktidy (Augustyniuk-Kram, Kram 2012).

Ačkoliv entomopatogenní houby napadají hmyz prakticky ze všech hlavních řádů (Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera, Diptera, Orthoptera, Hymenoptera) a mohou též napadat všechna vývojová stádia (Bailey *et al.* 2010), jednotlivé druhy jsou často vůči hostiteli velmi specifické a existuje zde tak jen velmi malé riziko vzhledem k necílovým organismům (Roberts, Humber 1981).

Entomopatogenní houby jsou tak neodmyslitelnou součástí integrované ochrany rostlin proti škůdcům. Jako biologická ochrana proti hmyzím škůdcům a dalším členovcům jsou nedílnou součástí mykoinsekticidů v zahradnictví, lesnictví a zemědělství. Masová výroba hub není příliš drahá a jejich skladování je velmi snadné, což má za následek, že přípravky na bázi entomopatogenních hub jsou vyvíjeny a vyráběny po celém světě ke kontrole populací půdního škodlivého hmyzu (Gul *et al.* 2014).

2.3.1 Vývojový cyklus entomopatogenních hub

Proti hmyzu působí celá řada entomopatogenních hub. Jejich životní cyklus se skládá z parazitické fáze (infekce hostitele a následná smrt) následované fází saprofytickou (po smrti hostitele). Na rozdíl od jiných entomopatogenních organismů (bakterie, viry), které obvykle vstupují do těla hostitele pasivně s potravou, entomopatogenní houby infikují svého hostitele nejčastěji přímou penetrací přes jeho exoskelet a kutikulu (Augustyniuk-Kram, Kram 2012; Clarkson, Charnley 1996). Sama kutikula je však pro patogena významnou překážkou pro uskutečnění infekce, protože je velice pevná a přitom představuje hlavní bariéru při průniku do hostitele. Z tohoto důvodu je potřeba, aby houba disponovala fyzikálními či enzymatickými prostředky pro penetraci pokožky (Gul *et al.* 2014).

Samotný proces infekce zahajuje přichycení a klíčení konidií na povrchu hostitele (kutikula) následované pronikáním mycelia do tělní dutiny a vytvářením myceliární sítě. Konec vývojového cyklu je charakterizován sporulací a tvorbou konidií (Hýsek, Vach 2015). Mechanismy účinku entomopatogenních hub se liší, hmyz usmrcují pomocí různých způsobů, jako je např. vyhladovění nebo produkce toxinů (Gul *et al.* 2014).

Jak bylo zmíněno výše, houbové choroby u hmyzu obvykle začínají přisednutím konidií na kutikulu hmyzu. Některé spory entomopatogenních hub jsou pro tyto účely pokryty vrstvou hlenu která je složená z proteinů a glukánů, což usnadňuje jejich přichycení na kutikule hmyzu (Augustyniuk-Kram, Kram 2012), jiné jsou hydrofobní, přičemž vlastní přichycení je založeno na principu interakce mezi dvěma hydrofobními povrchy (Landa *et al.* 2008). Po přichycení

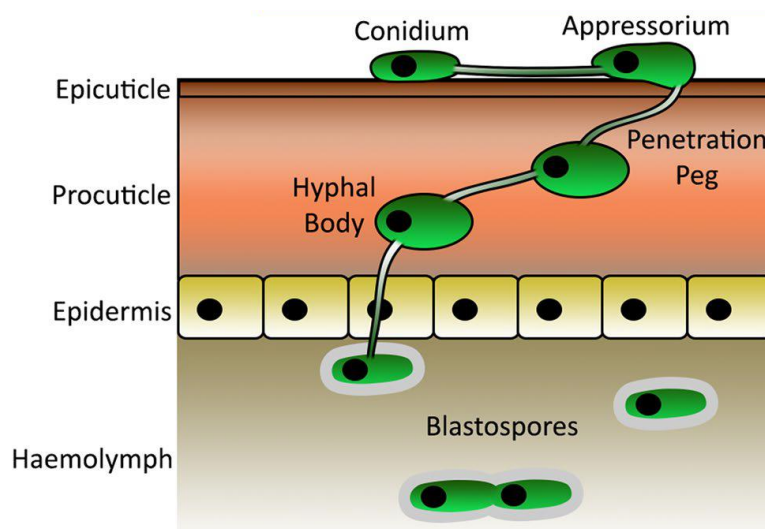
na vhodném hostiteli produkují konidie infekční strukturu nazývanou apresorium. Apresorium vytváří mechanický tlak a kutikulu degradující enzymy, přičemž hlavní roli mají enzymy lipázy, proteázy a chitinázy (Lovett, St. Leger 2015). Po proniknutí patogena do těla hostitele dochází k rychlé kolonizaci jednotlivých tělních tkání a orgánů. Pro tuto fázi vývojového cyklu je typický přechod vláknitých forem hub na rychle se dělicí a pomnožující tělíska tzv. blastospory. Blastospory se v hostitelském organismu rychle množí a zcela mumifikují hostitele (Landa *et al.* 2008). Po invazi je hmyz usmrcen v důsledku růstu blastospor, produkce toxinů, popř. kombinací obojího. Rody *Beauveria*, *Metarhizium* a *Tolypocladium* vylučují např. celou řadu toxinů. Některé z nich, jako destruxin, bavericin a efrapeptins jsou chemicky popsány a hrají významnou roli v procesu patogeneze (Augustyniuk-Kram, Kram 2012).

V počátečních stádiích infekce, nejsou pozorovány žádné výrazné příznaky. Několik dní před smrtí hostitele se však začínají projevovat symptomy, jako je snížení pohyblivosti a snížení příjmu potravy. Některé další behaviorální reakce zahrnují behaviorální horečku a oproti předchozímu naopak zvýšení příjmu potravy. Behaviorální horečka sama o sobě je reakcí na houbovou infekci, kdy hmyz mění svou tělesnou teplotu (Gul *et al.* 2014). Po smrti hostitele hyfy entomopatogenní houby kolonizují mrtvé tělo a během 2 až 3 dnů prorostou na povrch mrtvého těla hostitele, kde se vytvoří vzdušné hyfy, které začnou sporulovat, a cyklus je ukončen (Lovett, St. Leger 2015).

Spory se dále šíří do okolí větrem a vodou, a pokud hned nepřilnou na nového hostitele, mohou v prostředí přežívat na mrtvých mumifikovaných hostitelích nebo v půdě (Augustyniuk-Kram, Kram 2012).

Obrázek 1 - Parazitická fáze vývojového cyklu *M. anisopliae*

(upraveno podle Lovett, St. Leger 2015)



2.3.2 Charakteristika významných entomopatogenních hub

Mezi významné rody entomopatogenních hub patří *Aschersonia*, *Beauveria*, *Hirsutella*, *Isaria* a *Paecilomyces*, *Lecanicillium*, *Metarhizium* a *Nomuraea*.

Rod *Aschersonia* (*A. aleyrodis*, *A. placenta*, *A. goldiana*) se vyskytuje především v tropických a subtropických oblastech a parazituje na nymfách mnoha druhů molic a červců. Druhy rodu *Aschersonia* jsou hostitelsky úzce specializovaní (Fransen 1990; Osborne, Landa 1992). Z hlediska praktického využití se zástupci tohoto rodu používají převážně ve sklenicích. Rod *Aschersonia* mumifikuje hostitele a šíří se vřetenovitými pyknosporami, které se tvoří v pyknidách, z nichž jsou vylučovány v cirrech jako žlutá až oranžovočervená hmota (Hýsek, Vach 2015).

Rod *Beauveria* (*B. bassiana*, *B. bronguiartii*, *B. tenella*) se běžně vyskytuje v půdě a parazituje na půdním hmyzu. Některé druhy jsou virulentní pro stejnokřídlý hmyz (Homoptera) (Hýsek, Vach 2015). Nákazy vyvolané druhy rodu *Beauveria* jsou nazývány jako „bílá muskardina“, protože infikovaný jedinec porůstá hustým, bílým myceliem (Landa 2002).

Rod *Hirsutella* (*H. thompsonii*) reprezentuje akarifágní houby vyvolávající primární nákazy fytofágních roztočů včetně svilušky chmelové (*Tetranychus urticae*). Některé druhy v rámci tohoto rodu jsou též nematofágní, parazitující na háďátkách (Hýsek, Vach 2015).

Do rodů *Isaria* a *Paecilomyces* patří druhy *I. fumosorosea*, *I. farinosa*, *P. lilacinus*, *P. variotii*, které reprezentují entomofágní, akarifágní a nematofágní druhy hub parazitující na mnoha řádech hmyzu. *I. fumosorosea* se může vyvíjet i jako mykoparazit na některých druzích rzí (*Uromyces dianthi*) a padlí (*Sphaerotheca fuliginea*) (Landa et al. 2008).

Rod *Lecanicillium* (*L. lecani*) představuje široce polyfágní rod, který se využívá v biologické ochraně proti savým polyfágním škůdcům zeleniny a okrasných květin pěstovaných ve sklenicích (mšice, třásněnky, molice, roztoči, motýli a dvoukřídlý hmyz) (Hýsek, Vach 2015; Landa et al. 2008).

Druhy rodu *Metarhizium* jsou široce polyfágní houby, které jsou převážně vázány na půdní hmyz. Tento rod a jeho nejvýznamnější druh *M. anisopliae* budou popsány v následujících samostatných kapitolách.

Významný druh z rodu *Nomuraea* je *N. rileyi*. Je to úzce specializovaný druh patogenu, který napadá larvy motýlů, mezi které patří např. zavíječ kukuřičný, bělásek zelný, mūra zelná a osenice. Za vhodných podmínek *N. rileyi* až drasticky snižuje populace škůdců (Suwannakut et al. 2005).

2.4 Rod *Metarhizium*

Rod *Metarhizium* se skládá z pěti druhů, do kterých se zahrnují *M. anisopliae*, *M. flavoviridae*, *M. album*, *M. brunneum* a *M. guizhouense* (Driver *et al.* 2000). Některé druhy rodu *Metarhizium* jsou široce polyfágní, např. *M. anisopliae* a *M. flavoviridae*, které napadají široké spektrum škodlivého hmyzu, zatímco jiné druhy (poddruhy) jsou více specifické pro určitou skupinu hmyzu, jako jsou např. rovnokřídlí (*M. anisopliae* var. *acridum*) nebo brouci (*M. anisopliae* var. *majus*). Nákazy vyvolané těmito houbami jsou často označovány jako „zelené muskardiny“, protože jedinec porůstá hustým, tmavě zeleným myceliem (Hýsek, Vach 2015; Landa 2002). Zjistilo se také, že některé kmeny rodu *Metarhizium* mohou kolonizovat kořeny rostlin (Lovett, St. Leger 2015). Behie a Bidochka (2014) dále prokázali, že *Metarhizium* spp. může přenášet dusík z mrtvých hmyzích těl hostitelů do rostlinných kořenů a žít takto s rostlinou v symbióze. Tento jev může být mj. příčinou toho, že se druh *Metarhizium* vyskytuje nejvíce mezi izolovanými houbami z půdy, a to s titry dosahujícími až 10^6 konidií na gram.

Ve srovnání s obvyklými houbovými modelovými systémy je *Metarhizium* spp. mimořádně všestranný druh entomopatogenní houby. Tato houba je patogenem členovců, saprofytem i kolonizátorem rhizosféry a kořenů rostlin. Proto vykazuje extrémně flexibilní metabolismus. Ten jí umožňuje růst za různých environmentálních podmínek, s nedostatkem živin a v přítomnosti sloučenin, které jsou pro jiné houby letální. Na bázi určitých druhů rodu *Metarhizium* se vyrábějí komerční biopreparáty po celém světě (Lovett, St. Leger 2015).

2.4.1 Rozšíření

Rod *Metarhizium* se vyskytuje celosvětově od Arktidy až po tropy, může kolonizovat velmi širokou škálu prostředí včetně lesů, savan, močálů, pobřežních zón a pouští (Zimmerman 2007). Je kosmopolitně rozšířen a zcela běžně se vyskytuje v zemědělských i nezemědělských půdách (Landa *et al.* 2008). Houba se nachází v půdě, v rhizosféře rostlin, na usmrcených tělech členovců jako saprofyt nebo parazituje širokou škálu hmyzu včetně klíšťat a jiných parazitů (Schrank, Vainstein 2010).

2.4.2 Faktory ovlivňující účinnost hub rodu *Metarhizium*

Rod *Metarhizium* je vystaven mnoha situacím, které omezují jeho růst. Patří mezi ně fyzikální, chemické a biologické vlivy, mezi které patří UV záření, extrémní teploty, pH, dostupnost živin, toxické kovy, virulence a obrana hostitele. Nejcitlivější je rod *Metarhizium* na UV záření a teplotní extrémy, nicméně zvýšené hladiny stresu mohou být geneticky

přeprogramovatelné. Např. exprese RNA vazebných proteinů (binding proteins) má za následek zvýšenou toleranci k chladovému stresu, nadměrná exprese fotolyázy zvyšuje toleranci k UV záření a zvýšená exprese proteinu teplotního šoku 25 (heatshock protein) zlepšila toleranci k několika stresovým podmínkám, včetně tepla a osmotického tlaku. Naopak narušení těchto genů značně snižuje vytrvalost a vytvoření geneticky modifikovaných hypervirulentních kmenů (Lovett, St. Leger 2015).

2.4.2.1 Biotické faktory – interakce patogen a hostitel

Základní vlastností patogena musí být schopnost vyvolat onemocnění. Tato schopnost se nazývá patogenita. Patogenita je závislá na fyziologii hostitele, fyziologii a virulenci houby a životním prostředí (Inglis *et al.* 2001). Při napadení patogenem se v hostiteli uskuteční imunitní odpověď, která je doprovázena celou škálou metabolických změn. Entomopatogenní houba je vystavena několika různým prostředím. První z nich je hydrofobní prostředí, kdy konidie houby musí přilnout na epikutikulu hmyzu, která se skládá z vosku. Pod ní se nachází prokutikula složená z proteinů a chitinu a poslední je hypertonické prostředí hemolymfy. Aby byla houba schopná úspěšně ukončit na hostiteli svůj vývoj, musí mít funkční proteosyntetický aparát, který zabezpečí expresi takových genů, které jsou zodpovědné za transdukcii, degradaci pokožky a potlačení imunitní odpovědi hmyzu.

Mezi stesy se kterými se musí entomopatogenní houba vyrovnat, a které přímo souvisejí s interakcí s hostitelem, patří nutritivní, teplotní, oxidační a osmotický stres (Lovett, St. Leger 2015).

Nutritivní stres

Proto, aby mohlo dojít k infekci cílového hostitele, je zapotřebí dostatek živin, přičemž metabolické změny v hostiteli velmi ovlivňují virulenci entomopatogenních hub. Hostitel obsahuje komplexní směsi alternativních zdrojů uhlíku, jako jsou aminokyseliny, karboxylové kyseliny (laktát) a mastné kyseliny (Lovett, St. Leger 2015). K tomu, aby mohla úspěšně proběhnout invaze následovaná kolonizací hostitele, musí být entomopatogenní houba rodu *Metarhizium* schopná takovýto externí zdroj uhlíku vstřebat (Padilla-Guerrero *et al.* 2011), a to i přesto, že pro první fáze klíčení je její konidie energeticky soběstačná (Landa *et al.* 2008). Proto je nezbytně nutné, aby houba disponovala metabolickými drahami, které umožňují asimilaci těchto zdrojů uhlíku. Jednou z takovýchto metabolických drah je např. glyoxylátový cyklus (Padilla-Guerrero *et al.* 2011).

Teplotní stres a sluneční záření (ovlivněné chováním hmyzu)

Vývoj nákazy může také ovlivnit vysoká teplota, která urychluje vývoj hmyzu, chování a samočištění hmyzu (Inglis *et al.* 2001). Jedná se především o proteiny tepelného šoku, které se vytvoří v hostiteli po napadení houbou, v důsledku čehož infikovaný hmyz zvýší svoji tělesnou teplotu nad normální hranici. Rod *Metarhizium* je schopný se na tento stres adaptovat zvýšenou expresí proteinů regulující teplotní šok (Lovett, St. Leger 2015). Zajímavou studii ohledně tohoto tématu publikovali např. Ouedraogo *et al.* (2003), kteří testovali sarančata stěhovavá (*Locusta moratoria*) infikovaná *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* v různých podmínkách prostředí. Tam, kde byla změnou prostředí sarančatům umožněna i změna vlastní termoregulace, dokázali jedinci úspěšně infekci houbou vzdorovat, zatímco sarančata umístěná do stabilního prostředí bez možnosti zvýšit za pomoci externích vlivů svoji teplotu, infekci záhy podléhala.

Oxidační stres

Oxidační stres zahrnuje tvorbu kyslíkových radikálů. Hlavní součástí imunitní odpovědi hmyzu je aktivace profenoloxidázy v pokožce. Enzym profenoloxidáza katalyzuje tvorbu cytotoxických chinonů, které se mohou polymerizovat na melanin. Během melanizace hmyz produkuje antifungální metabolity, mezi které patří i kyslíkové radikály. Jako obranou proti těmto radikálům disponuje rod *Metarhizium* velkým počtem genů, které se podílejí na detoxikaci (Lovett, St. Leger 2015).

Osmotický stres

Zástupci rodu *Metarhizium* se musí také vyrovnat s rozdílným osmotickým tlakem v hemolymfě hostitele. Entomopatogenní houby obecně zabíjejí hmyz přímým pronikáním do kutikuly a následným množením v hemolymfě, přičemž ta se vyznačuje vysokým osmotickým tlakem. Turgor u houby *Metarhizium* je regulován proteinem MPL1 (*Metarhizium* perilipin-like protein). Nízký obsah tohoto proteinu je spojen se sníženou schopností porušit kutikulu hmyzu (Wang, St. Leger 2006).

2.4.2.2 Abiotické faktory – UV záření, teplota a relativní vzdušná vlhkost

UV záření

UV záření je limitující faktor pro účinnost všech mikrobiálních agens. Jeho vlivem může dojít k poškození DNA, biomembrán, RNA a ribozomů (Santoro *et al.* 2014). K částečné toleranci k UV záření a tepelným stresům pomáhá tmavě zelený pigment konidií *Metarhizium*

spp.. K pigmentaci konidií přispívají enzymy lakázy MLAC1 (*Metarhizium* lakázy třídy 1). Narušení MLAC1 způsobuje snížení virulence a také nedostatek pigmentace konidií čímž se stává houba náchylnější k UV záření. Rod *Metarhizium* obsahuje také mnoho opravných mechanismů, které mohou eliminovat vliv UV záření. Např. enzym fotolyáza degraduje škodlivé pyrimidinové dimery, které způsobují mutagenезi nebo buněčnou smrt (Lovett, St. Leger 2015). Při výrobě biopreparátů se také uplatňuje nutriční a inertní složka, která chrání entomopatogenní houby před tímto stresujícím faktorem (Butt *et al.* 1999; Wraight, Carruthers 1999).

Teplota

Teplota má významný vliv na klíčení a růst entomopatogenních hub. Ovlivňuje jak samotné klíčení, penetraci, kolonizaci hostitele, tak i vlastní rozmnožování (Santoro *et al.* 2014). Např. *M. anisopliae* je mezofilní houba s teplotním rozsahem mezi 15 a 35 °C, přičemž optimum pro klíčení a růst je mezi 25 a 30 °C (Zimmerman 2007). O něco málo širší rozmezí, od 20 do 30°C uvádí jako optimální pro sporulaci Arthurs a Thomas (2001). Obecně se však dá říci, že tento rod má v závislosti na konkrétním druhu a jeho kmenu široký teplotní rozsah. Existují totiž druhy, které se nacházejí v oblastech s velmi nízkou teplotou, např. v Sub-Antarktidě, kde se vyskytují kmeny, které jsou adaptovány na nízké teploty a jsou schopni infikovat hmyz i při 5 °C (Lovett, St. Leger 2015), jakož i v oblastech s vysokou teplotou, např. v tropických pásmech, ve kterých jehouba *M. anisopliae* schopna vyklíčit, růst a množit se i při teplotách nad 35°C (Zimmerman 2007). Mimo ideální rozsah může teplota omezit účinnost hub, protože se změní produkce enzymů a toxinů. Jedním z faktorů, který způsobuje termotoleranci u entomopatogenních hub je akumulace trehalózy v konidiích (Santoro *et al.* 2014).

Relativní vzdušná vlhkost

Vlhkost je dalším velmi důležitým faktorem, který ovlivňuje účinnost a přežití entomopatogenních hub v prostředí. Obecně platí, že vysoká relativní vlhkost je pro klíčení entomopatogenních hub nezbytná (Zimmerman 2007). Optimální vlhkost pro klíčení u *M. anisopliae* je nad 94 % RH, přičemž pod touto hranicí se klíčení zastavuje (Inglis *et al.* 2001). Podobně je tomu i u konečné fáze infekčního cyklu, tj. sporulaci na povrchu hostitele, což potvrzují i Arthurs a Thomas (2001), kteří ve svých studiích dospěli k závěru, že optimální vlhkost pro sporulaci *M. anisopliae* var. *acridum* je při relativní vzdušné vlhkosti 96%.

2.5 Významný druh *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin

M. anisopliae je významná entomopatogenní houba, která napadá převážně půdní hmyz (rovnokřídlí - *Orthoptera*, brouci - *Coleoptera* a dvoukřídlí - *Diptera*) (Landa 2002). Tato houba patří mezi nejlépe prostudované entomopatogenní houby na molekulární a biochemické úrovni a vyskytuje se téměř po celém světě. (Lovett, St. Leger 2015). Není škodlivá pro ptáky, ryby, obojživelníky a savce včetně lidí. Její případná toxicita byla intenzivně studována a představuje pouze minimální riziko pro obratlovce, životní prostředí a veřejné zdraví (Garza-Hernández *et al.* 2015).

M. anisopliae objevil a popsal Mečnikov roku 1879, tehdy jej však klasifikoval jako *Entomophthora anisopliae* (Vega 2007). Tento druh jím byl pojmenován podle brouka *Anisoplia austriaca* (listokaz pšeničný), ze kterého byl poprvé izolován (Zimmermann 2007). V roce 1883 jej Nikolay Vasilevich Sorokin přeřadil do nově ustanoveného rodu *Metarhizium* (Vega 2007). V současné době lze druh *M. anisopliae* rozdělit do 4 poddruhů a to *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *acridum*, *M. anisopliae* var. *lepidiotium* a *M. anisopliae* var. *majus* (Driver *et al.* 2000).

2.5.1 Taxonomie

Taxonomie *M. anisopliae* byla v nedávné době značně revidována. K tomu účelu se zkoumaly např. kmeny *M. anisopliae*, které byly izolovány z infikovaného hmyzu (Schrank, Vainstein 2010). Nejspolehlivější způsob jak odlišit druhy v rámci entomopatogenní houby *M. anisopliae* je molekulární analýza. Dlouhou dobu byla houba *M. anisopliae* považována za asexuální (anamorfní). Později byla popsána i pohlavní (telemorfní) forma *Cordyceps taii*, která vývojově souvisí s nedávno objevenou anamorfní fází *Metarhizium taii*, přičemž *M. taii* je synonymum pro *M. quizhouense*. Tento objev byl podpořen následnými molekulárními fylogenetickými studiemi (Bischoff *et al.* 2009). Telemorfní fáze *M. anisopliae* tak byla převedena z *Cordyceps* do *Metacordyceps* (Sung *et al.* 2007).

Anamorfní fáze *M. anisopliae* se zařazuje do říše hub, pomocného oddělení Deuteromycota, pomocné třídy Hyphomycetes a pomocný řád Moniliales. Dále se houba řadí do rodu *Metarhizium* a druhu *M. anisopliae* (Kalina, Váňa 2005; Váňa 1998).

Telemorfní fáze *M. anisopliae* se zařazuje do říše hub, oddělení Ascomycota, třídy Sordariomycetes, řádu Hypocreales, čeledi Clavicipitaceae, rodu *Metacordyceps* a druhu *Metacordyceps taii* (Bischoff *et al.* 2009; Sung *et al.* 2007).

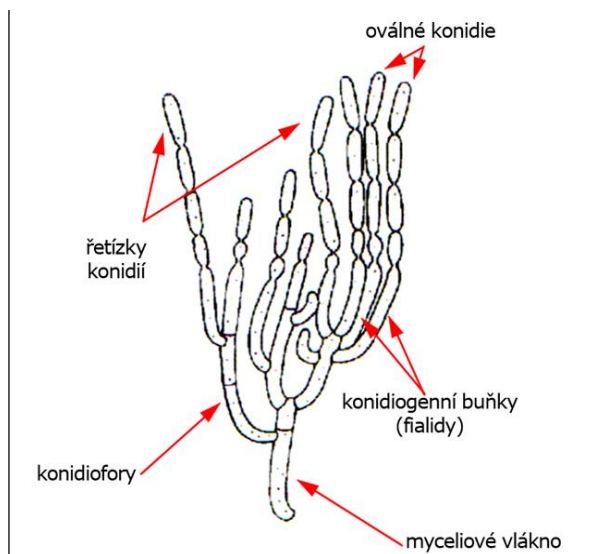
2.5.2 Morfologie

Konidiofory na kterých se tvoří konidie, jsou větvené a tvoří útvary podobné hustým mnohoramenným svícňům (Landa *et al.* 2008). Konidie jsou hydrofobní (Shahid *et al.* 2012), dlouhé, tyčinkovité až hranolovité, tvořící kompaktní řetízky a jsou přimknuty k sobě. Na obou koncích jsou konidie zaoblené a jsou zbarvené do zelenošedé až olivově zelené (Landa *et al.* 2008).

Infekce cílového hostitele vzniká přímým růstem konidií skrz jeho kutikulu. Nákaza je na hostiteli snadno rozpoznatelná již za několik dní od úspěšné infekce (Garza-Hernández *et al.* 2015). Hostitel je nejprve pokryt bílým myceliem, které později zezelená – od toho i název, který se používá pro nákazu - „zelená muskardina“ (Landa *et al.* 2008).

Obrázek 2 - Morfologická struktura entomopatogenní houby *M. anisopliae*

(upraveno podle Landa *et al.* 2008)



2.5.3 Izolace *M. anisopliae*

Izolace se obvykle provádí buď pomocí selektivního média s antibiotiky a fungicidy, které slouží k potlačení saprofytických a konkurujících organismů nebo využitím metody tzv. živých pastí, kdy se využívají larvy zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) nebo potěmnicka moučného (*Tenebrio molitor*). Tyto druhy jsou vybrány zejména z toho důvodu, že jejich larvy jsou velmi citlivé na plísňové infekce (Zimmermann 2007). Následný postup izolace je nutné volit s ohledem na použitou metodu a stav výchozího materiálu. Jedná se vždy

o přímý přenos pasáží buď z povrchu infikovaného hostitele, nebo z vybrané bodové kultury narostlé na povrchu selektivní živné půdy. Po izolaci je nutné kulturu purifikovat, tzn. získat čistou kulturu cílového izolátu, který je poté kultivován formou umožňující následnou identifikaci a charakterizaci kmenů (Landa *et al.* 2008).

2.5.4 Produkce *M. anisopliae*

Klíčovým úspěchem masové produkce hub je nákladově efektivní výroba a rozvoj produktu, který bude stabilní a schopen poskytovat účinnou kontrolu škůdců. Houby mohou být hromadně vyráběny v pevné fázi fermentačního procesu, kdy produkují konidiospory, kapalně fázi fermentačního procesu kdy produkují blastospory (tenkostěnné spory vznikajícím pučením) nebo přechodným systémem těchto dvou metod tzv. di-fázovou fermentací, kdy jsou zapojeny obě fáze. Mycelium vyrobené v kapalně kultuře se následně nechává vysporulovat v mělkých vaničkách (Ravensberg 2010; Landa *et al.* 2008).

Nejekonomičtější metodou je výroba spor hub v kapalně kultuře, protože tekuté živné půdy podporují rychlý růst mycelia (Landa 1998). Jako příklad produktů založených na produkci blastospor může sloužit Preferal (*Isaria fumosorosea*) nebo Vertalec (*Lecanicillium longisporum*). Tyto houby mají v pevném stavu fermentace nízkou produkci spor (Ravensberg 2010). U některých hub se však tato metoda nedá využít, protože se při ní netvoří konidie, které potřebují dostatečné množství vzduchu (Jackson *et al.* 2010). Většinou se tak v těchto případech využívá metoda di-fázová, při které jsou houby zpočátku kultivovány v kapalně kultuře, kde mají dostatek živin pro svůj růst. Ve druhé fázi na pevném substrátu se následně produkují vzdušné konidie houby. Metoda se musí zvolit podle schopnosti organismu produkovat vysoké výnosy spor (Ravensberg 2010).

Výroba v pevně fázi fermentace je poměrně jednoduchá metoda. Houby mohou růst na pevném substrátu např. na obilných zrnech, rýži, ječných kroupách či vločkách (Goettel, Inglis 1997). Určený substrát se poté umístí do vysterilizovaného plastového sáčku nebo do misky. Náklady na takovouto produkci jsou nízké, použité technologie jednoduché, ale metoda je poměrně pracovně náročná. Projekt Lubilosa, v rámci něhož byl vyvinut biopreparát Green Muscle® (*M. anisopliae* var. *acridum* pro kontrolu sarančat a kobylek) je však důkazem, že tato metoda může být úspěšná i v masovějším měřítku. Existují samozřejmě i metody, které jsou sofistikovanější a využívají např. bioreaktory. V těchto reaktorech mohou být podmínky prostředí regulovány mnohem lépe než v sáčcích nebo miskách např. prostřednictvím podmíněného proudění vzduchu, vytápěním nebo chlazením. Investice

do takovýchto reaktorů jsou ale poměrně vysoké, na druhou stranu potřeba manuální práce výrazně klesá. Některé příklady produktů s konidiosporami vyrobenými v pevném stavu fermentací na bázi *M. anisopliae* jsou BIO 1020 a Met52 produkované firmou Novozyme (Ravensberg 2010).

Obecně lze shrnout, že *M. anisopliae* má široké spektrum hostitelů a je relativně snadné jej vyrobit v dostatečném množství. Tato houba se obvykle produkuje povrchovou kultivací na umělé živné půdě, nebo na sterilním přirozeném substrátu. Také ji lze vyrobit submerzní kultivací v tekuté živné půdě, kde produkuje blastosporu nebo ji můžeme převést do formy alginátových pelet (Landa *et al.* 2008). Většina mykoinsekticidů je tak, nikoliv náhodou, založená na bázi právě této houby. Ze 171 mykoinsekticidů a mykoakaricidů je 61 výrobků na bázi *M. anisopliae* (Faria, Wraight, 2007).

Obrázek 3 - Komerční balení biopreparátu Met52 G a Met52 ES (Anonym I)



2.6 Subkultivace hub *in vitro* a kontinuální pasážování hub *in vivo*

2.6.1 Subkultivace entomopatogenních hub

Účinky opakovaných subkultivací *in vitro* se značně liší v rámci druhů entomopatogenních hub i v rámci jejich kmenů. Opakované *in vitro* subkultivace mají vliv na životnost spor, morfologické změny, biochemické a molekulární charakteristiky a nejvýznamněji na virulenci kmenů a hostitelskou specifitu (Nahar *et al.* 2008). U některých kmenů hub se virulence ztrácí např. u *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *N. rileyi*, *I. farinosa* a *L. muscarium*. U jiných kmenů se po opakované subkultivaci virulence nemění (Brownbridge *et al.* 2001). Virulence kmene entomopatogenní houby závisí do značné míry na množství spor, rychlosti klíčení a kutikulu degradující enzym Pr1 (Hussain *et al.* 2010). Dalším významným ukazatelem virulence je přilnavost konidií na kutikulu hostitele. To je významná vlastnost pro úspěch houbového patogena (Song, Feng 2010).

Některé kmeny entomopatogenních hub vykazují po opakovaných subkultivacích fyziologické změny. Například *M. anisopliae* vykazuje sníženou virulenci a sníženou produkci kutikulu degradujících enzymů, serin proteáz Pr1. Změny ve virulenci závisí také na nutričních podmínkách subkultury. Vliv na virulenci kmenů po subkultivacích má i vnitrodruhová a mezidruhová variabilita nebo použití čistých nebo směsných kultur (Santoro *et al.* 2014). Brownbridge *et al.* (2001) se domnívá, že snížení nebo nestabilita virulence může být i náhodná, způsobená mutacemi nebo způsobená v průběhu kultivace pasážované kultury. Kmeny entomopatogenních hub mají různou citlivost na ztrátu virulence. Některé ztrácí virulenci po jedné subkultivaci, některé až po desáté nebo dvanácté. Někdy může být virulence i dočasně obnovena pomocí jiných médií, ale po opětovné subkultivaci může kmen virulenci opět ztratit (Mohammadbeigi 2013). Ztráta virulence nebo její snížení byla pozorována po opakovaných subkultivacích u téměř všech hlavních taxonů entomopatogenních hub (Hussain *et al.* 2010). Touto problematikou se zabývá spousta významných pracovišť, kde pozorují účinky opakované *in vitro* subkultivace na virulenci různých entomopatogenních mikroorganismů (Nahar *et al.* 2008).

Vliv na virulenci určitých kmenů může mít řada faktorů. Mezi biotické faktory, které ovlivňují virulenci, patří morfologie spor, průběh klíčení, povrchové vlastnosti konidií a těkavé organické sloučeniny. Za další velmi důležitý faktor patogeneze jsou považovány kutikulu degradující enzymy, jako jsou esterázy, lipázy, N-acetylglucosaminidázy a chitinázy. Nejvýznamnější kutikulu degradující enzym je proteáza Pr1 (Hussain *et al.* 2010). Je to alkalická serinová proteáza se zbytkem histidinu v aktivním místě. Enzym hraje hlavní roli

v penetraci kutikuly u hmyzu a následné patogenitě. Enzym Pr1 uvolňuje peptidy, které indukují další výrobu Pr1 enzymů. Pr1 geny byly identifikovány a později klonovány v houbě *M. anisopliae*. Mezi další entomopatogenní houby, které obsahují enzymy typu Pr1 patří např. *Aspergillus flavus*, *B. bassiana*, *I. farinosa*, *Tolypocladium niveum* a *L. lecanii*. Na snížení virulence mají vliv také jednoduché a snadno dostupné živiny v umělé půdě. Virulence se sníží vypnutím genů, mezi které patří enzym degradující kutikulu Pr1 a také snížením klíčivosti konidií. Pasážování přes hmyz způsobí zvýšení virulence. Kutikula hmyzu obsahuje složitější zdroje živin. Obsahuje nižší poměr C: N. Kmen houby, který byl přes hmyz pasážován, je více virulentní, a také se mu zvýší činnost enzymu Pr1. Ztráta nebo malé množství Pr1 může být hlavní příčinou snížení nebo ztráty virulence (Safavi 2012). Subkultivace hub na umělém živném médiu vedou k poklesu aktivity Pr1 serin proteázy. Je prokázáno, že na mrtvém těle hostitele je vyšší úroveň tohoto enzymu. Vysoká úroveň Pr1 má za následek rychlejší infekci a smrt hostitelského organismu (Hussain *et al.* 2010).

2.6.2 Kontinuální pasážování entomopatogenních hub

Na bázi entomopatogenních hub jsou vyráběny komerční biopreparáty. Biopreparáty musí splňovat určité parametry, zejména je důležitá virulence infekčních propagulí, jako jsou např. konidie nebo blastospor (Nahar *et al.* 2008). Virulence má významný vliv na kvalitu výrobku vyplývající z konkrétní fermentační šarže. Stabilita virulence při výrobním procesu je zásadní pro zajištění konzistentní kvality materiálu (Brownbridge *et al.* 2001). Jestliže dojde ke snížení nebo ztrátě virulence, produkt je nekvalitní a stává se neprodejným. Nízká produkce spor a nízká virulence učiní produkt komerčně neživotaschopný (Safavi 2012). Entomopatogenní houby, jak je známo, jsou patogenní k hmyzu, nicméně virulence, která vyjadřuje stupeň patogenity, je u některých kmenů a izolátů hub variabilní. Může být posílána *in vivo* tzv. pasážemi. Metoda kontinuálního pasážování kmene přes cílového hmyzího škůdce se využívá k udržení virulence nebo případně ke zvýšení virulence entomopatogenních hub popřípadě k jejímu „oživení“ v případě, že je snížena (Safavi 2012; Song, Feng 2010). Kontinuální pasážování je také označováno termínem pasážování *in vivo* (Prenerová 2007). Stabilita virulence pasáží *in vivo* je významný aspekt pro výrobu biopreparátů na bázi hub (Hussain *et al.* 2010). Při pasážování kmenů entomopatogenních hub dochází k průniku hyfy specifickým hostitelem, což může nejen navýšit virulenci, ale také může rozšířit hostitelské spektrum (Vandenberg, Cantone 2004). Virulence u kontinuálně pasážovaných kmenů přes cílového hostitele se navyšuje z toho důvodu, že sám hostitel slouží houbám jako zdroj živin, a

tím kmen houby vytváří daleko virulentnější konidie než před procesem pasážování (Hussain *et al.* 2010). Existuje několik důvodů pro zvýšení virulence při průchodu hostitelem. Opakované pasáže přes vhodného hostitele umožňují lépe přilnout konidiím na povrch těla. A konidie také rychleji klíčí, což způsobuje rychlejší invazi hostitele. Virulence kmenů pasážovaných přes konkrétního živého hostitele je vyšší, než virulence konidií, které jsou vyprodukované v podmínkách *in vitro*, tj. na přirozených substrátech nebo na umělých živných půdách. Pasážemi mohou kmeny nebo izoláty hub měnit fenotypové vlastnosti jako je barva, růst, tvar kolonií a zároveň mohou mít vliv na virulenci (Safavi 2012; Song, Feng 2010). Infekce hostitele může změnit genotyp daného kmene, který může vést k méně virulentní nebo avirulentní formě (Santoro *et al.* 2014). Produkce konidií pomocí pasážování přes hmyzího hostitele ale není ekonomicky výhodnou metodou a to z toho důvodu, že by nejprve produkci spor musel předcházet velkokapacitní chov daného hostitele (Mohammadbeigi 2013). Z tohoto důvodu, by bylo možné pro pasážování použít jen malé množství druhů hmyzu a zejména jen takového, který je schopen se vyvíjet v laboratorních podmínkách. Proto se pro velkokapacitní produkce používá kultivační médium, které je nutričně vyvážené a je daleko levnější než produkce přes živého hostitele (Santoro *et al.* 2014).

V současné době se prakticky využívají biopreparáty na bázi entomopatogenních hub v mnoha zemích světa. Pro úspěšné použití v biologické ochraně rostlin je velice důležitá virulence kmene, který je de facto „účinnou látkou“ vyráběných biopreparátů. Aby bylo možné vyrábět komerční biopreparáty na bázi entomopatogenních hub, musí se používat umělá média. Výroba hub na umělých médiích vede ke ztrátě virulence. Zkoumání účinků subkultivací *in vitro* na virulenci hub je nutné před tím, než mají být použity pro komerční výrobu. Jedním z nejdůležitějších kroků v masové výrobě je najít nejlepší metodu a vhodné umělé médium, aby se minimalizoval útlum virulence hub (Mohammadbeigi 2013). Komerční biopreparáty se vyrábějí právě na umělém živném médiu, protože je levné, snadno dostupné a zaručuje stabilní produkci hub v čase. Nevýhodou je, že může být snížena virulence tím, že by byly používány pro inokulaci ve fermentorech kmeny, které jsou v několika cyklech subkultivovány přes jeden druh agarizované živné půdy (Hussain *et al.* 2010). Tomuto negativnímu vlivu firmy předchází tím, že si vyprodukují větší množství tzv. matečných kultur, které uchovávají v nízkých teplotách. Pro každý cyklus produkce používají vždy novou mateční kulturu. Dnes se ve světě na trhu objevují biopreparáty na bázi hub náležejících do rodu *Metarhizium*, *Beauveria*, *Isaria* a *Lecanicillium*.

3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cíle diplomové práce jsou shrnuty v následujících šesti bodech.

1. Hodnocení základních růstových parametrů vybraných kmenů entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae* včetně testování vlivu teploty na růst a vývoj kmenů na umělých živných půdách.
2. Kontinuální pasážování vybraných kmenů *Metarhizium anisopliae* na živné půdě, přirozeném substrátu a přes různá vývojová stádia potemníka moučného (*Tenebrio molitor*).
3. Průběžné reizolování kmene z kontinuálních pasáží a opakované testování kmene prostřednictvím "in vitro" testů.
4. Testování virulence původního nepasážovaného kmene a vybrané pasážované linie přes živnou půdu a vývojové stádium potemníka moučného (*Tenebrio molitor*).
5. Testování virulence původních kmenů entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae* na vybrané druhy hostitelů prostřednictvím "in vivo" testů.
6. Testování účinnosti vybraných druhů entomopatogenních hub na vajíčka mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*).

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1 Kmeny entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae*

V pokusech byly testovány tři kmeny entomopatogenní houby *M. anisopliae*. Dva kmeny F52 a MKC 110112 byly poskytnuty z mykologické sbírky Katedry speciální produkce rostlinné, oddělení Rostlinolékařství na Zemědělské fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Kmen F52 byl reizolován z biopreparátu BIO 1020, který se využívá v mnoha zemích světa pro kontrolu populací škůdců. Nativní kmen MKC 110112 byl odizolován z půdy na poli s konvenčním systémem hospodaření u obce Stráž nad Nežárkou. Třetí kmen byl v roce 2014 odizolován z lokality Mažice a byl pojmenován Man 3B. Všechny testované kmeny byly uchovávány ve formě suchých alginátových pelet. Cílem tvorby alginátových pelet je, že se do nich imobilizuje biomasa hub (konidie, blastospor, mycelium). Alginátové pelety jsou uchovávány v rozmezí teplot -20 až -22 °C. Tato forma umožňuje dlouhodobé uchovávání cenných kmenů entomopatogenních hub.

4.2 Imobilizace hub do alginátových pelet

Základní reagenční směs tvořila suspenze konidií hub ve 2% alginátu sodném (sodná sůl kyseliny alginové) a jemně mleté přesáté pšeničné otruby. Směs otrub a alginátu sodného byla smíchána a sterilována. Do vychladlé směsi byla přidána suspenze spor v poměru 1:1. Poslední složkou pro přípravu pelet byl sterilní roztok chloridu vápenatého (0,25M CaCl₂) do kterého byla pomocí nálevky nakapána připravená směs a chemická reakce zajistila vznik pravidelných kuliček. Kuličky se nechaly vytvrdit po dobu 1 až 2 hodin, poté se omyly vodou a vysušily na drobné alginátové pelety.

Aktivace pelet jednotlivých kmenů byla provedena v Petriho miskách na povrchu 2% vodního agaru. Pelety při vysoké vlhkosti poutají vodu a nabobtnají. Na povrchu pelet docházelo po 5 až 7 dnech ke sporulaci inkorporovaného kmenu houby. Konidie se pomocí inokulační kličky přeočkovaly na povrch živného média PDA (Potato Dextrose Agar). Mateční kultura z alginátových pelet byla kultivována po dobu 14 dní. Takto získané kultury testovaných kmenů byly použity k experimentům.

4.3 Používaná živná média

V experimentech, které byly zaměřené na radiální růst, výtěžnost spor a pasážování kmenů se používala živná půda PDA (Potato Dextrose Agar). V experimentech zaměřených

na pasážování kmenů byl použit 2% vodní agar. Při izolaci kmenů z půdy byla použita selektivní půda založená na fungicidní složce dodine, která byla spolu s antibiotiky dodána do živné půdy PDA. Vysterilovaná média byla rozlita podle charakteru experimentu do sterilních plastových Petriho misek buď o průměru 90 mm, nebo 60 mm.

4.3.1 PDA - Potato Dextrose Agar

Hlavní používané médium pro kultivaci kmenů bylo Potato Dextrose Agar (PDA), neboli bramboro-dextrózový agar. Médium bylo připraveno smícháním 24 g.l⁻¹ PDB (Potato Dextrose Broth, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Indie) s 16 g.l⁻¹ vodního agaru (Dr. Kulich Pharma s. r. o., Hradec Králové) a doplněno destilovanou vodou.

4.3.2 Vodní Agar (2%)

Vodní agar se připravil navážením 10 g agaru na 500 ml vody. Médium bylo použito při aktivaci pelet jednotlivých kmenů *M. anisopliae* a při pasážování kmenů přes živné substráty (ovesné vločky) a živá vývojová stádia hostitele potemníka moučného (*Tenebrio molitor*). Pro pasážování byl jako podklad použit vodní agar z toho důvodu, že houba *M. anisopliae* je nucena růst a vyvíjet se pouze na přirozeném substrátu resp. na vývojovém stádiu hostitele. Houba *M. anisopliae* není schopna klíčit a růst právě na 2% vodním agaru, protože neobsahuje žádnou nutritivní složku, kterou pro svůj vývoj tento druh houby potřebuje.

4.3.3 Selektivní živná půda na bázi dodine

Při izolaci kmene Man 3B bylo použito selektivní médium Potato Dextrose Agar s přídatkem dodine (PDA+D). Tato selektivní živná půda slouží pro izolaci entomopatogenních hub z půdy (Zimmermann 2007). Základ selektivního média tvoří živná půda PDA, do které je přidána účinná látka dodine (0,10 g.l⁻¹), získaná z komerčního fungicidního přípravku Syllit 65 WP. Dále byly do směsi přidávány dvě širokospektrální antibiotika chloramfenikol v dávce 0,50 g.l⁻¹ (Sigma-Aldrich) a cycloheximid v dávce 0,25 g.l⁻¹ (Sigma-Aldrich). Antifugální složka dodine zajišťuje supresi vývoje převážné většiny saprotrofních a fytopatogenních druhů mikroskopických hub formou přeměny jejich buněčné stěny a inhibičního působení na tvorbu a klíčení jejich konidií. Přídavek kombinace širokospektrálních antibiotik zajišťuje inhibici vývoje převážné většiny bakterií vyskytujících se v půdě.

4.4 Půdní výluh

Půdním výluhem byl získán kmen MKC 110112 a Man 3B. V laboratoři byl ze vzorku půdy připraven půdní výluh (20 g půdy + 100 ml 0,05% roztoku Tween 80). Vzorek byl po dobu 10 minut homogenizován na třepačce. Po homogenizaci se půdní výluh naředil v poměru 1:10 (9 ml 0,05% roztoku Tween 80 + 1 ml půdního výluhu). Následně byl pipetou odebrán 0,5 ml výluhu, který byl nainokulován na selektivní médium PDA+D a pomocí inokulační hokejky byl rozetřen po celém povrchu selektivní živné půdy. Pro každý vzorek byly připraveny 3 opakování. Po vsáknutí výluhu byly misky vloženy do plastových sáčků a inkubace probíhala ve 25 °C. Po identifikaci jednotlivých druhů hub získaných ze selektivní živné půdy, byly odizolovány kmeny houby *M. anisopliae* a v případě potřeby byly opakovaně přečišťovány přes PDA až do získání čistého kmene. Kmeny byly kontinuálně kultivovány v podobě separačních čar nebo plošné kultury. Kultivace kmenů probíhala 7 až 14 dnů, bez přístupu světla při teplotě 25 °C.

4.5 Příprava suspenzí

Povrch plně vysporulovaných kmenů byl přelit sterilním roztokem 0,05% Tween 80. Získaná suspenze byla přefiltrována přes sterilní gázu a nanášena do Neubauerovy počítací komůrky. Počítací komůrka se suspenzí byla vložena pod optický mikroskop. V předem stanoveném počítacím poli se po sedimentaci spor stanovil titr. Hodnota titru byla vypočítána na základě vzorce při použití průměru dvou opakování (horní a dolní počítací pole komůrky). Pro většinu pokusů byla základní suspenze spor následně adjustována ředěním na titr $1,00 \times 10^7$ v 1 ml popřípadě i na nižší koncentrace spor jednotlivých kmenů. Použité koncentrace spor v 1ml budou uvedeny u jednotlivých experimentů.

4.6 *In vitro* testy

4.6.1 Radiální růst a výtěžnost na umělém živném médiu (PDA)

U vybraných kmenů *M. anisopliae* byl otestován radiální růst a výtěžnost spor. Byla připravena suspenze o standardním titru $1,00 \times 10^7$ konidií v 1 ml. Suspenze byla nanášena pomocí 1 μ l sterilní inokulační kličky ve formě kapky do středu Petriho misky s umělým živným médiem PDA v počtu opakování, které bude uvedeno u každého individuálního pokusu. Po zaschnutí kapky se Petriho misky vložily v plastových sáčcích do termostatu, který byl vytemperován na určitou teplotu. Radiální růst a výtěžnost spor byly testovány při různých teplotách (10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C a 30 °C).

Hodnocení radiálního růstu jednotlivých kmenů probíhalo na základě měření dvou na sebe kolmých průměrů středové kultury. Ze zjištěných rozměrů byla vypočítána plocha kultury. Průměr kultur byl měřen po 7, 14 a 21 dnech od založení kultury.

Výtěžnost kultur byla hodnocena po 21 dnech inkubace. Ze živného média byla vyříznuta celá kultura, která byla vložena do mixéru, kde po dobu 20 vteřin probíhala homogenizace s určitým množstvím vody s přidavkem detergentu. Výtěžnost konidií byla spočítána pomocí počítačící komůrky. Výtěžnost byla stanovena ze dvou opakování u každého testovaného kmene. Poté byla ze získaných číselných údajů vypočítána výtěžnost z jedné středové kultury a následně byla stanovena produkce spor na 1 mm² kultury. Pomocí tohoto parametru, lze objektivně porovnávat produkci spor u jednotlivých variant.

4.6.2 Standardní test klíčivosti

Klíčivost spor byla stanovena standardním testem klíčivosti, který vyjadřuje procento klíčících spor za určitou dobu a za specifických podmínek. Na mikroskopické podložní sklíčko byla nanášena slabá vrstva PDA (pro ostatní rody entomopatogenních hub se nanáší 2% agar). Po zaschnutí bylo na povrch PDA nanášeno pomocí 1 µl inokulační kličky několik kapek finální suspenze o koncentraci $1,00 \times 10^6$ spor v 1 ml. Poté bylo sklíčko přeneseno do Petriho misky (90 mm), která obsahovala filtrační papír navlhčený 0,5 ml sterilní destilované vody. Petriho misky byly uloženy do vytemperovaného termostatu na požadovanou teplotu 25 °C. Vyhodnocení bylo provedeno po 24 hodinách pomocí světelného mikroskopu. Hodnoceno bylo minimálně 100 spor z náhodně vybraných zorných polí. Ke každé konidii byl přiřazen příslušný index (Growth index – GI), který specifikuje vývoj patogena a stupeň naklíčení (viz tabulka 1). Z vyhodnocených vzorků bylo vypočteno procento klíčivosti.

Tabulka 1 - Hodnotící indexová stupnice (GI) pro kmeny entomopatogenních hub

0,0	na konidii nejsou viditelné žádné morfologické změny, konidie ve vzorku mají uniformní tvar
0,5	konidie jsou protáhlejší a nabobtnalé, na konidii je zřetelný jednostranný klíček velikosti v poměru přibližně 1:0,5 k matečné konidii
1,0	velikost klíčku na konidii je v poměru 1:1 k velikosti matečné konidie
1,5	klíček je 2 až 3× delší než matečná konidie
2,0	klíček je více než 3× dlouhý jako matečná konidie, dochází k sekundárnímu větvení na jednom z klíčků, na matečné konidii jsou dva dlouhé klíčky
2,5	počátek sporulace, sporadický výskyt struktur spojených se sporulací
3,0	plná sporulace, pravidelný výskyt struktur spojených se sporulací

4.7 *In vivo* testy

4.7.1 Standardní laboratorní biotest

Standardní laboratorní biotest byl hodnocen pomocí FDGI stupnice (Fungus Development and Growth Index). V průběhu pokusu byl vyhodnocen vývoj nákazy a mortalita testovaného jedince. Tato stupnice odlišuje jednotlivé fáze vývoje houby. Stupnice FDGI rozčleňuje průběh nákazy do 7 fází vývoje onemocnění, ke každé fázi je přiřazen konkrétní index (viz tabulka 2). V pokusech byla hodnocena mortalita larev. Zároveň byla hodnocena i kumulovaná mortalita, do které se zařazují mrtví jedinci bez příznaků infekce a jedinci nesoucí zjevné příznaky nákazy. Dále byla hodnocena infekce hostitelů. Do tohoto parametru byly zahrnuty pouze případy, kdy byly na povrchu těla hostitele přítomné zjevné morfologické struktury entomopatogenní houby.

V pokusech byly používány larvy potměníka moučného (*T. molitor*), které byly získány z chovu na Katedře speciální produkce rostlinné.

Na začátku testu byly larvy povrchově sterilovány pomocí 1% roztoku SAVA (0,05% NaClO) a hned po vyjmutí ze Sava byly larvy 3× opláchnuty ve sterilní destilované vodě. Pro rychlé oschnutí se larvy umístily na filtrační papír.

Povrchově sterilované larvy byly následně ponořeny na 2 vteřiny do suspenzí jednotlivých kmenů o standardním titru $1,00 \times 10^7$ konidií v 1 ml. V kontrolní variantě byly larvy ponořeny na 2 vteřiny do roztoku 0,05% Tweenu 80. Ošetřené larvy byly umístěny do vlhkých komůrek. Vlhké komůrky představovaly destičky určené pro kultivaci tkáňových kultur o objemu jedné komůrky 6,5 ml. Každá destička obsahovala 12 buněk. Na dno každé komůrky byly umístěny dva sterilní filtrační papírky (2×2 cm), které byly navlhčeny 0,15 ml sterilní destilované vody. Pro každý testovaný kmen a kontrolu byly připraveny 3 opakování, tj. 3 destičky. Celkem bylo použito pro jednu variantu 36 larev. Vlhké komůrky byly uloženy do igelitových sáčků. Takto připravené jednotky byly vloženy ještě do plastových sáčků pro zajištění optimálních vlhkostních podmínek a zabránění vysušení komůrek. Následně bylo vše umístěno do vytemperovaného termostatu s požadovanou teplotou 25 °C. Hodnocení pokusů bylo prováděno 4., 6., 7. a 11. den pomocí světelného stereomikroskopu. Každé larvě byl přiřazen příslušný index FDGI.

Tabulka 2 - Hodnotící indexová stupnice (FDGI) pro larvy *T. molitor*

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

4.7.2 Kontinuální pasážování kmenů *M. anisopliae* přes různé živné substráty a vývojová stádia *T. molitor*

Kmeny *M. anisopliae* byly pasážovány přes přirozené substráty (ovesné vločky a PDA) a hostitelský organismus *T. molitor* (larvy, kukly a dospělce).

Pasážování započalo naočkováním sterilních ovesných vloček a záměrnou infekcí různých vývojových stádií hostitele *T. molitor* pomocí původních kmenů. První pasáž spočívala v tom, že jednotlivé vločky byly pomocí pinzety přeneseny na plně vysporulovanou kulturu kmenů *M. anisopliae*. Po uchycení spor byly vločky vloženy na povrch 2% vodního agar. V případě pasážování přes PDA byly spory z kultury původního kmene nanášeny pomocí inokulační kličky na novou plotnu PDA formou separačních čar. Jednotlivá stádia *T. molitor* byla opět pinzetou nanášena na plně vysporulovanou kulturu jednotlivých kmenů a každé stádium bylo umístěno do samostatné Petriho misky s 2% vodním agarem. Pro každou pasáž bylo použito 5 vloček a 10 jedinců hostitele. Připravené pasáže byly vloženy do igelitových sáčků a vloženy do vytemperovaného termostatu na 25 °C a ponechány do úplné sporulace kmenů na jednotlivých pasážovaných objektech. Následné pasáže byly prováděny z předchozích. Konidie z plně vysporulovaných objektů předešlé pasáže byly přenášeny dotykem se zdravými vývojovými stádii hostitele, novými vločkami a novou plotnou PDA. Pasážování bylo kontinuálně prováděno do 10. cyklu opakování. Z 10. pasáží byly získány čisté kultury na PDA, které byly použity pro jednotlivé pokusy. Pasážované kmeny byly zároveň zaboulovány do alginátových pelet, které jsou uchovávány při teplotě -20 °C.

4.7.3 Hodnocení účinnosti kmenů *M. anisopliae* na cílové hostitele

V experimentech pro sledování vlivu účinnosti kmenů *M. anisopliae* byli použiti dospělci blýskáčka řepkového (*Meligethes aeneus*) a krytonosce šesulového (*Ceutorhynchus obstrictus*). Testovací škůdci byli získáni ze školního pozemku Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Na povrch 2% vodního agaru v Petriho miskách, byla nanесena suspenze o koncentraci $1,00 \times 10^7$ v množství 1 ml. Suspenze se po povrchu agaru pravidelně rozptýlila pomocí inokulační hokejky pohybem na otočném stolku a nechala se zaschnout do druhého dne. Druhý den se na povrch agaru nanесли cíloví škůdci. Petriho misky byly uloženy do termostatu o 25 °C. Vyhodnocení a podrobnější popis jednotlivých experimentů je uvedeno přímo u konkrétních pokusů v experimentální části.

4.7.4 Hodnocení účinnosti kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* na vajíčkách mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*)

V pokusu byly použity vajíčka mandelinky bramborové (*L. decemlineata*), které byly získány ze školního pozemku Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

K experimentu byly použity entomopatogenní houby *M. anisopliae* kmen F52, *B. bassiana* kmen I101, *I. fumosorosea* kmen PFR 97 a *L. muscarium* kmen I9. Z těchto kmenů byla vytvořena suspenze o koncentraci $1,00 \times 10^7$ v množství 1 ml. Na podložní sklička pro každý kmen byla nanесena připravená suspenze kmenů ve formě 18 kapek (2 řady po 8 kapkách). Do 16 kapek byly následně nanесeny pomocí speciálně upravené jehly vajíčka *L. decemlineata* z povrchu spodní strany listů rostlin (lilek brambor). Zbylé 2 kapky byly ponechány jako kontrolní varianty. Po zaschnutí suspenze s vajíčky bylo podložní sklíčko vloženo do vlhké komůrky (Petriho misky s filtračním papírem navlhčeným 0,3 ml destilované vody). Hodnocení bylo provedeno po 24, 48, 72 a 96 hodinách pomocí optického mikroskopu. Pro každý kmen byly připraveny 2 opakování. Pro hodnocení byla využita speciálně navržená indexová stupnice (Landa *et al.* 1994). Každému vajíčku byl přiřazen příslušný index a průběh vývoje patogena (FDGI), indexová stupnice je popsána v tabulce 3.

Tabulka 3 - Hodnotící indexová stupnice (FDGI) pro vajíčka *L. decemlineata*

0,0	není přítomna žádná morfologická změna konidií v interakční zóně s vajíčkem
0,5	konidie začínají klíčit, velikost klíčku nepřesahuje velikost matečné konidie
1,0	klíček konidie se začíná přibližovat do interakční zóny k vajíčku
1,5	na povrchu vajíčka se začínají objevovat hyfová vlákna
2,0	vajíčko je porostlé hustým myceliem
2,5	na konci hyf mycelia se začínají objevovat sporulující konidiofory, počínající sporulace
3,0	plně vysporulované mycelium na povrchu vajíčka

4.8 Statistická analýza

Data vyjádřená v hodnotách procent byla normalizována pomocí arcsinové transformace, zatímco hodnoty sporulace středových kultur byly normalizovány za využití logaritmické transformace $\log_{10}(x + 1)$. Údaje týkající se radiálního růstu normalizovány nebyly. Výše uvedené údaje byly následně podrobeny analýze rozptylu (ANOVA) pomocí softwaru pro statistickou analýzu (StatSoft Inc. 2007). Rozdíly mezi středními hodnotami byly porovnány pomocí Tukeyho testu ($P < 0,05$).

4.9 Využívaná technika při pokusech

Pro potřebu sterilních podmínek byl využíván flow-box BIOHAZARD (KRD firma). Při tvorbě originální fotodokumentace byl použit digitální fotoaparát Canon EOS 300D Digital. A při vyhodnocování pokusů byl použit světelný mikroskop značky Olympus a binokulární mikroskop značky Olympus.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

5.1 Vliv teploty na růstové a produkční parametry středových kultur původních kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* v závislosti na době kultivace

Cílem experimentu bylo zjistit, která teplota je pro růst a produkci spor kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* neoptimálnější.

Základní údaje k pokusu

- suspenze původních kmenů o standardním titru $1,00 \times 10^7$ v 1 ml byla nanášena pomocí inokulační kličky ve formě kapky do středu Petriho misky s umělým živným médiem PDA v 6 opakováních pro každou variantu
- po zaschnutí kapky byly Petriho misky vloženy v plastických sáčcích do termostátů, které byly vytemperovány na různé teploty: 10 ± 1 °C, 15 ± 1 °C, 20 ± 1 °C, 25 ± 1 °C a 30 ± 1 °C
- u středových kultur byl hodnocen radiální růst po 7, 14 a 21 dnech
- výtěžnost spor kmenů byla hodnocena po 21 dnech

5.1.1 Vliv teploty na růst středových kultur původního kmene BIO 1020

Tabulka 4 - Radiální růst původního kmene BIO 1020 houby *M. anisopliae* v různých teplotách kultivace

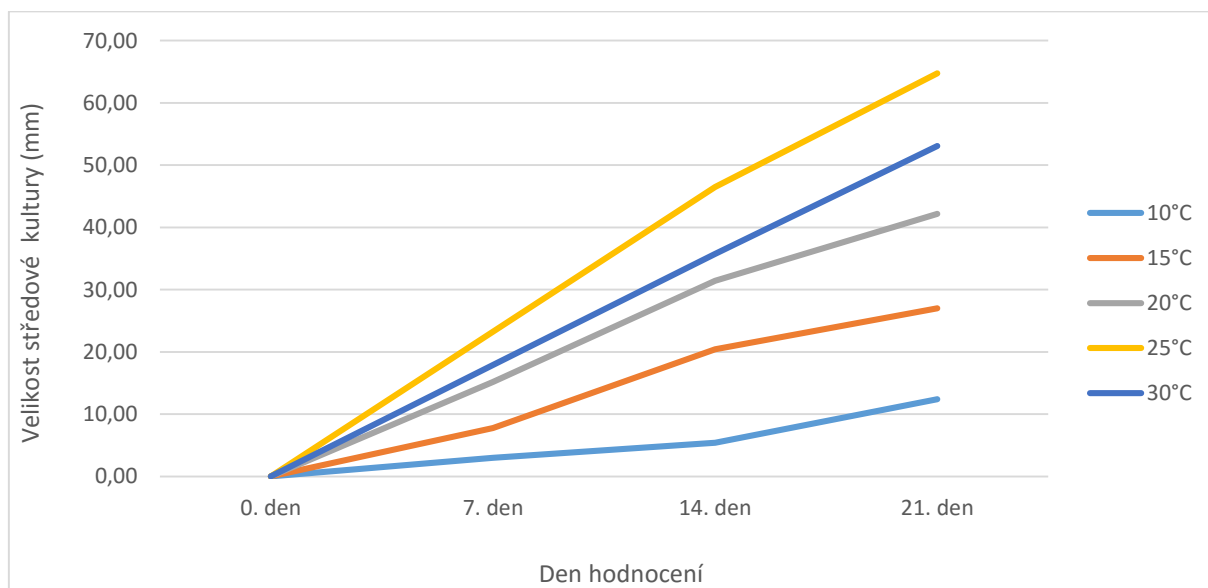
Teplota	7. den		14. den		21. den	
	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)
10 °C	3,00±0,00	7,07 e	5,42±0,51	23,04 e	12,42±0,51	121,09 e
15 °C	7,75±0,45	47,17 d	20,42±0,67	327,39 d	27,00±0,74	572,55 d
20 °C	15,17±0,39	180,66 c	31,42±0,90	775,19 c	42,17±0,83	1396,46 c
25 °C	23,25±0,50	424,56 a	46,50±0,58	1698,23 a	64,75±0,50	3292,83 a
30 °C	17,92±0,29	252,12 b	35,75±0,75	1003,79 b	53,08±0,90	2213,12 b
F=3671,62; df=4,55; p=0,0000		F=4394,95; df=4,55; p=0,0000		F=8222,98; df=4,55; p=0,0000		

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

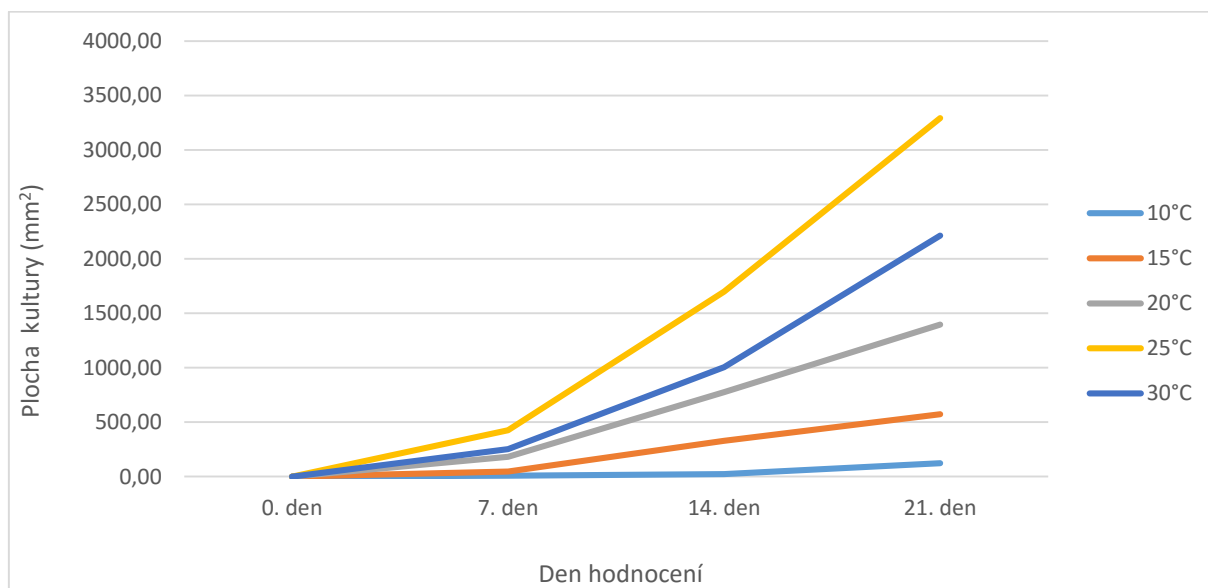
Původní kmen BIO 1020 vykazuje nejvyšší nárůst středových kultur při teplotě 25 °C ve všech hodnocených dnech. Po 7 a 14 dnech hodnocení vykazuje kmen podobný nárůst kultur

ve 20 °C a 30 °C kultivace, kde rozdíly mezi velikostí kultury jsou pouze kolem 3 mm (7. den) a více než 4 mm (14. den). Po 21 dnech kultivace je rozdíl v růstu středových kultur mezi těmito teplotami již velmi patrný. Rozdíl mezi středovými kulturami je téměř 11 mm ve prospěch teploty kultivace ve 30 °C. Nejmenší nárůst kmene ve všech dnech hodnocení je při 10 °C kultivace. Byl zaznamenán statisticky průkazný rozdíl v rychlosti růstu kolonií během různých teplot kultivace ve všech hodnocených dnech (7. den: $F = 3671,62$; $df = 4,55$; $p = 0,0000$, 14. den: $F = 4394,95$; $df = 4,55$; $p = 0,0000$, 21. den: $F = 8222,98$; $df = 4,55$; $p = 0,0000$).

Graf 1 - Porovnání velikosti středové kultury původního kmene BIO 1020 houby *M. anisopliae* za určitý časový úsek v závislosti na různých teplotách kultivace



Graf 2 - Porovnání plochy kultury původního kmene BIO 1020 houby *M. anisopliae* za určitý časový úsek v závislosti na různých teplotách kultivace



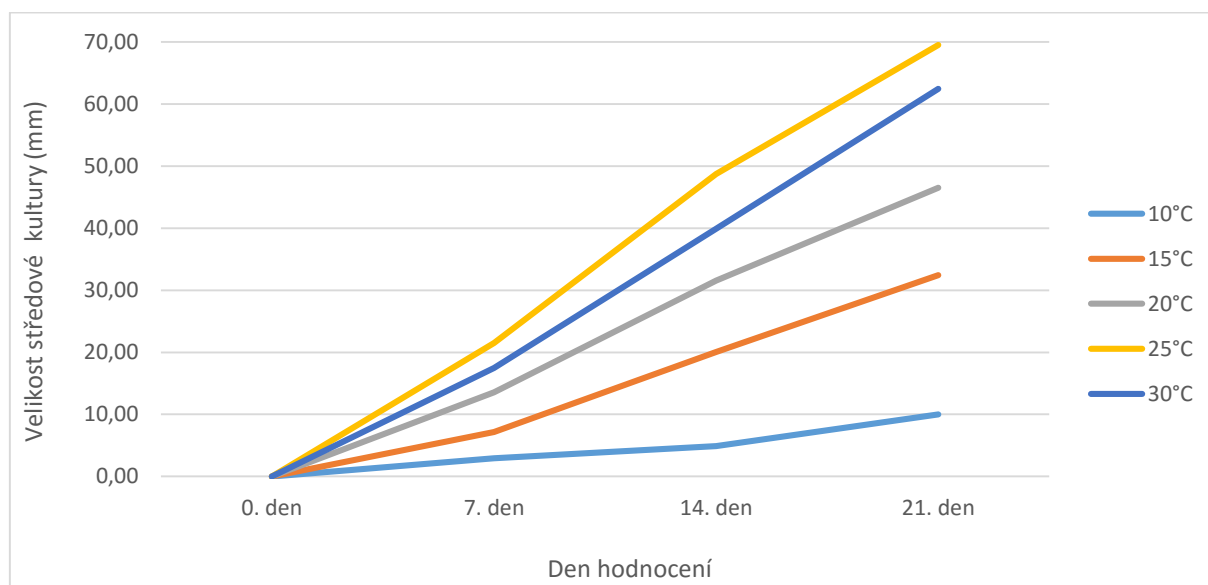
5.1.2 Vliv teploty na růst středových kultur původního kmene MKC 110112

Tabulka 5 - Radiální růst původního kmene MKC 110112 houby *M. anisopliae* v různých teplotách kultivace

Teplota	7. den		14. den		21. den	
	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)
10 °C	2,92±0,29	6,68 e	4,92±0,29	18,99 e	10,00±0,00	78,54 e
15 °C	7,17±0,39	40,34 d	20,08±0,29	316,78 d	32,42±0,51	825,33 d
20 °C	13,58±0,51	144,91 c	31,58±0,51	783,44 c	46,50±0,52	1698,23 c
25 °C	21,50±0,58	363,05 a	48,75±0,96	1866,55 a	69,50±1,29	3793,67 a
30 °C	17,50±0,52	240,53 b	39,92±0,29	1251,41 b	62,42±0,67	3059,78 b
F=1954,45; df=4,55; p=0,0000		F=5935,91; df=4,55; p=0,0000		F=6252,21; df=4,55; p=0,0000		

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

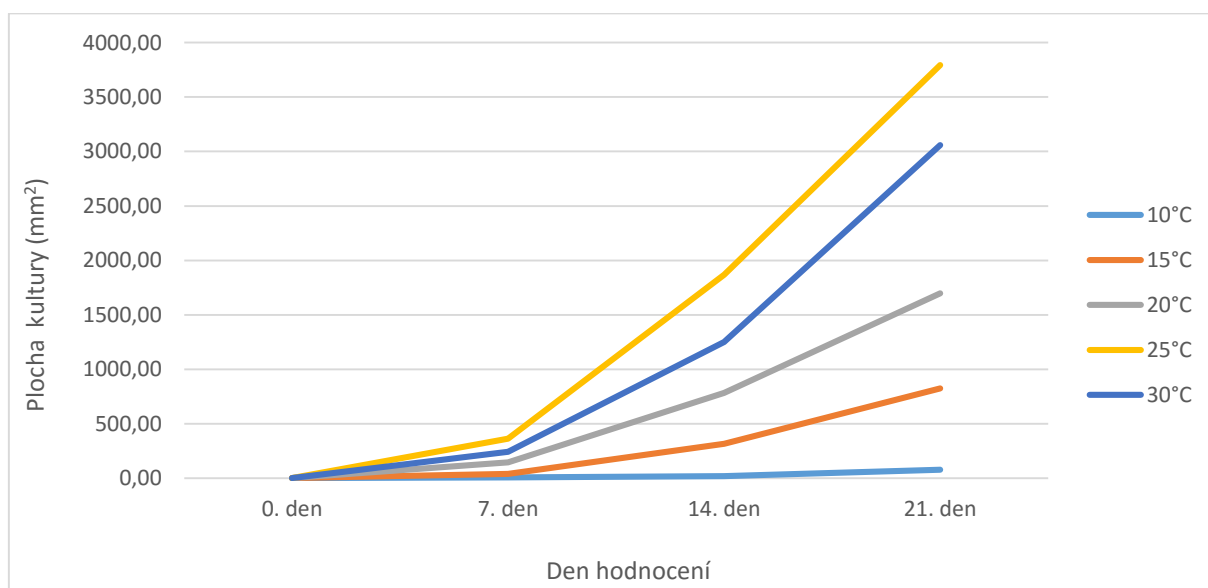
Graf 3 - Porovnání velikosti středové kultury původního kmene MKC 110112 houby *M. anisopliae* za určitý časový úsek v závislosti na různých teplotách kultivace



Původní kmen MKC 110112 také vykazuje nejvyšší nárůst středových kultur při teplotě 25 °C ve všech hodnocených dnech. Druhá teplota, při které kmen výrazně narůstal ve všech hodnocených dnech, je 30 °C. Po 7 dnech nedošlo téměř k žádnému růstu středové kultury v 10 °C, při 15 °C byl růst středové kultury též velmi pomalý ve srovnání s ostatními teplotami. Po 7 dnech byl u kmene MKC 110112 zaznamenán statisticky průkazný rozdíl ve velikosti středových kultur v závislosti na teplotě kultivace $F = 1954,45$; $df = 4,55$; $p = 0,0000$. Po 14

a 21 dnech se opakoval stejný průběh růstu středových kultur ve všech sledovaných teplotách. Opět v 10 °C nebyl schopen původní kmen kolonizovat substrát do větší vzdálenosti. Naopak, při 15 °C se po 14 dnech kmen rozrostl daleko více než po 7 dnech, plocha kultury byla 10× větší. Ve 20 °C vytvořil původní kmen po 21 dnech téměř o polovinu menší plochu kultury než při 25 °C a 30 °C. Po 14 dnech ($F = 5935,91$; $df = 4,55$; $p = 0,0000$) a 21 dnech ($F = 6252,21$; $df = 4,55$; $p = 0,0000$) byl opět zaznamenán statisticky průkazný rozdíl ve velikosti středových kultur v závislosti na teplotě kultivace.

Graf 4 - Porovnání plochy kultury původního kmene MKC 110112 houby *M. anisopliae* za určitý časový úsek v závislosti na různých teplotách kultivace



5.1.3 Vliv teploty na růst středových kultur původního kmene Man 3B

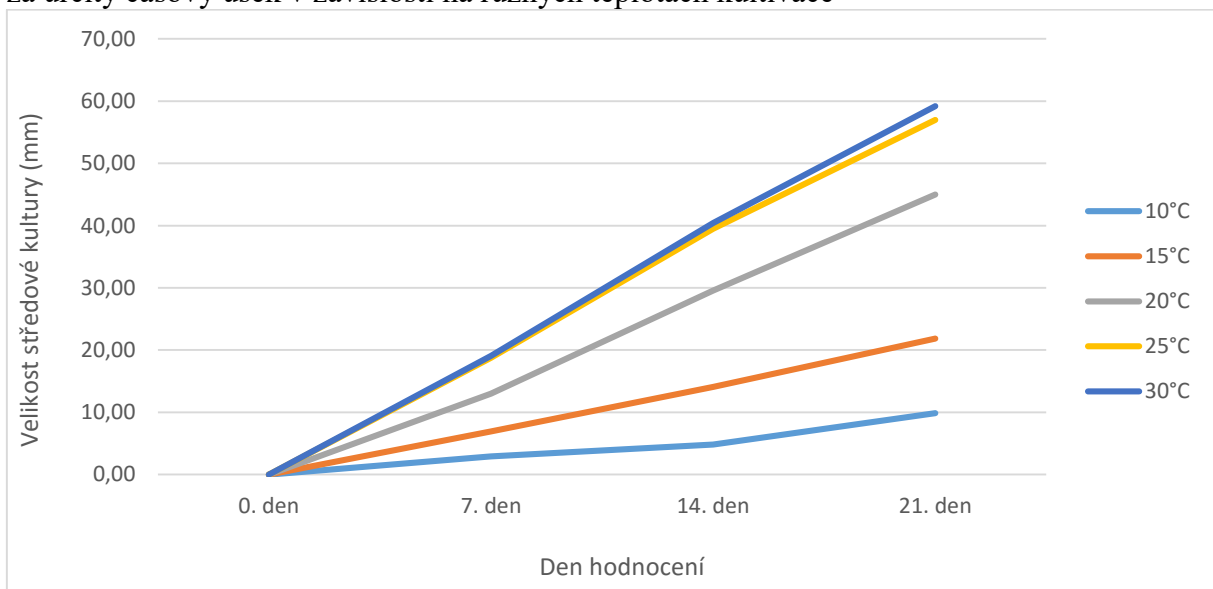
Tabulka 6 - Radiální růst původního kmene Man 3B houby *M. anisopliae* v různých teplotách kultivace

Teplota	7. den		14. den		21. den	
	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)
10 °C	2,92±0,29	6,68 d	4,83±0,39	18,35 e	9,85±0,51	72,13 e
15 °C	6,92±0,29	37,57 c	14,08±0,51	155,78 d	21,83±0,39	374,39 d
20 °C	13,00±0,43	132,73 b	29,58±0,51	687,36 c	45,00±0,00	1590,43 c
25 °C	18,75±0,50	276,12 a	39,50±0,58	1225,42 b	57,00±0,00	2551,76 b
30 °C	19,08±0,51	286,02 a	40,42±0,51	1282,95 a	59,17±0,83	2749,44 a
		F=2045,25; df=4,55; p=0,0000	F=7278,90; df=4,55; p=0,0000		F=14396,4; df=4,55; p=0,0000	

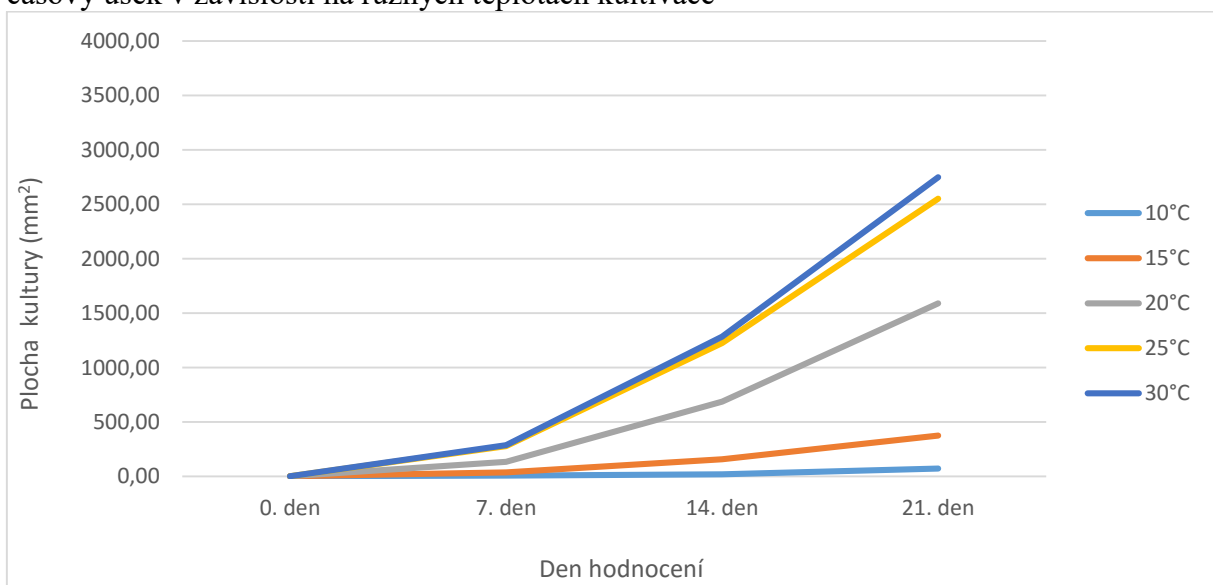
** a,b,c,d,e: průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Původní kmen Man 3B vykazuje tendenci nárůstu středových kultur v závislosti na dni kultivace a také na teplotě. V každých hodnocených dnech je pozorován statisticky průkazný nárůst středové kultury (7. den: $F = 2045,25$; $df = 4,55$; $p = 0,0000$, 14. den: $F = 7278,90$; $df = 4,55$; $p = 0,0000$, 21. den: $F = 14396,4$; $df = 4,55$; $p = 0,0000$) vzestupně od nejnižší teploty k nejvyšší. Původnímu kmenu Man 3B nejvíce k růstu prospívá teplota 30 °C. Po 7 dnech a 14 dnech vytvořil kmen téměř stejnou velikost kultury ve 25 °C a 30 °C kultivace. Po 21 dnech vytvořil kmen ve 30 °C větší kulturu o 2 mm v porovnání s nárůstem ve 25 °C kultivace, což činí nárůst téměř o 200 mm².

Graf 5 - Porovnání velikosti středové kultury původního kmene Man 3B houby *M. anisopliae* za určitý časový úsek v závislosti na různých teplotách kultivace

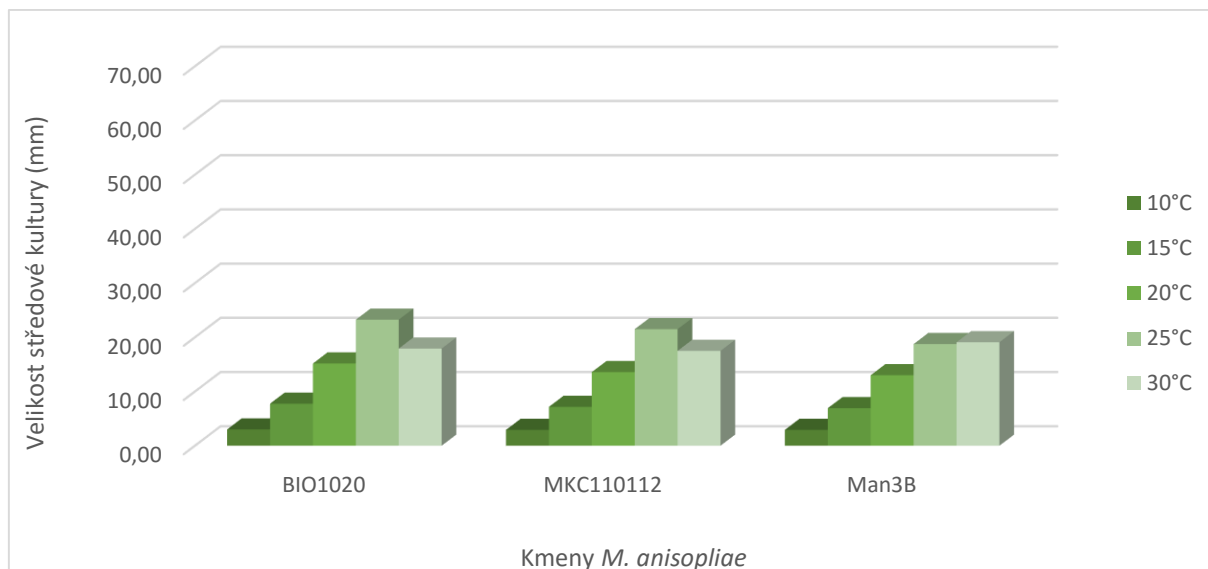


Graf 6 - Porovnání plochy kultury původního kmene Man 3B houby *M. anisopliae* za určitý časový úsek v závislosti na různých teplotách kultivace

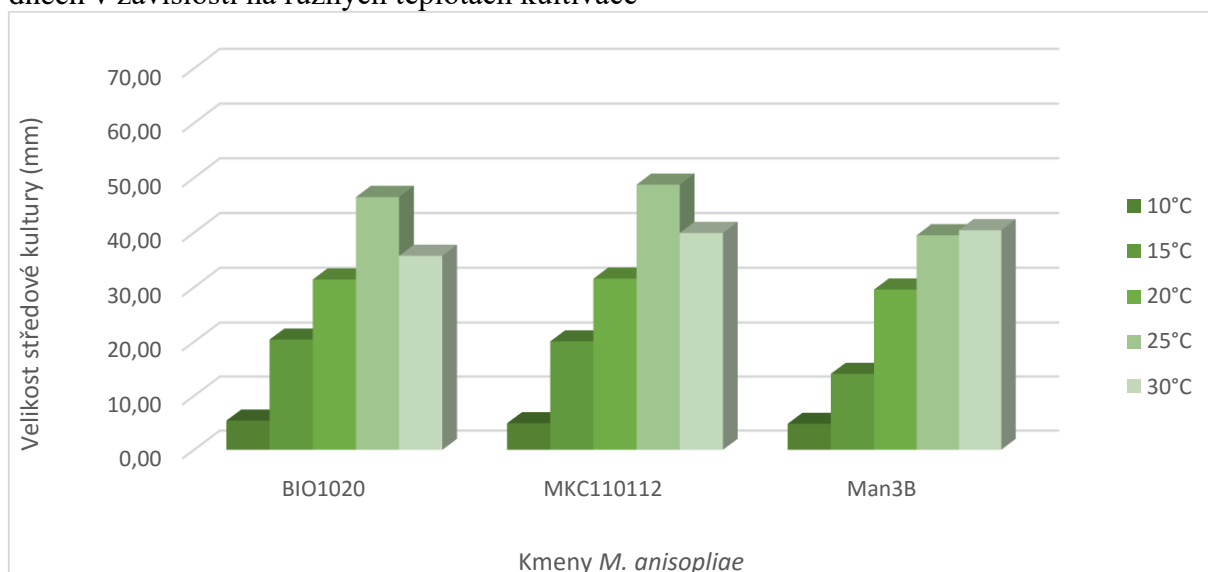


5.1.4 Porovnání vlivu teploty na růst a vývoj původních kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* v závislosti na době kultivace

Graf 7 - Porovnání velikosti středových kultur původních kmenů houby *M. anisopliae* po 7 dnech v závislosti na různých teplotách kultivace



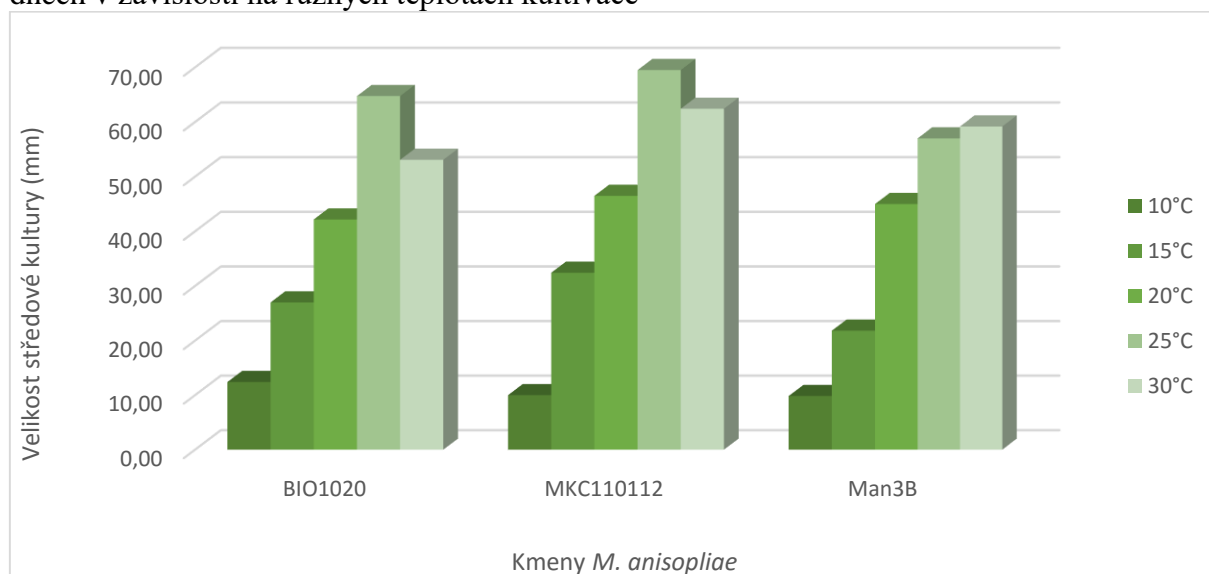
Graf 8 - Porovnání velikosti středových kultur původních kmenů houby *M. anisopliae* po 14 dnech v závislosti na různých teplotách kultivace



Původní kmeny BIO 1020 a MKC 110112 vykazují největší nárůst středové kultury ve 25 °C kultivace. Původní kmen Man 3B naopak narostl nejvíce při 30 °C. Po 7 dnech hodnocení má ve srovnání s ostatními původními kmeny nejvyšší nárůst původní kmen BIO 1020 ve všech teplotách kultivace kromě teploty 30 °C. Po 14 dnech kultivace vykazuje kmen BIO 1020 a MKC 110112 obdobný růst ve všech sledovaných teplotách. Kmen Man 3B má obdobný růst pouze v nižších teplotách. Ve 25 °C v růstu zaostává ve srovnání s ostatními

kmeny. Ve 30 °C je trend stejný. Nicméně všechny tři kmeny vykazují nejlepší růst a vývoj ve 25 °C a 30 °C. Po 21 dnech hodnocení vykazoval původní kmen MKC 110112 nejvyšší nárůst středové kultury téměř ve všech teplotách kultivace kromě 10 °C. Původní kmen Man 3B za ostatními původními kmeny v růstu zaostával téměř ve všech teplotách kultivace s výjimkou 30 °C, kde byla kultura větší ve srovnání s kmenem BIO 1020. Původní kmeny BIO 1020 a MKC 110112 jsou odolnější k nízkým teplotám v porovnání s kmenem Man 3B.

Graf 9 - Porovnání velikosti středových kultur původních kmenů houby *M. anisopliae* po 21 dnech v závislosti na různých teplotách kultivace



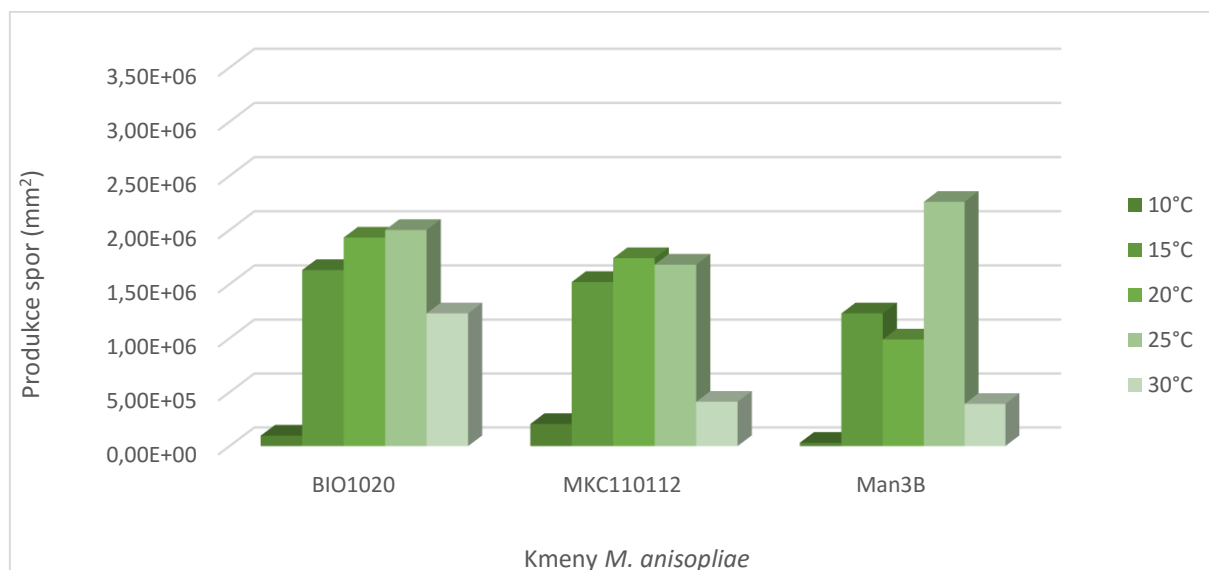
5.1.5 Vliv teploty na produkci spor původních kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* v závislosti na době kultivace

Tabulka 7 - Výtěžnost spor ze středových kultur původních kmenů houby *M. anisopliae* po 21 dnech v různých teplotách kultivace

Teplota	BIO1020			MKC110112			Man3B		
	Výtěžnost spor 1. kultury	Výtěžnost spor (mm ²)	Tukey HSD	Výtěžnost spor 1. kultury	Výtěžnost spor (mm ²)	Tukey HSD	Výtěžnost spor 1. kultury	Výtěžnost spor (mm ²)	Tukey HSD
10 °C	1,17±0,09E+07	9,67E+04	c	1,61±0,00E+07	2,05E+05	d	2,20±0,40E+06	3,05E+04	e
15 °C	9,34±0,04E+08	1,63E+06	ab	1,26±0,01E+09	1,52E+06	b	4,61±0,14E+08	1,23E+06	b
20 °C	2,70±0,60E+09	1,93E+06	a	2,95±0,25E+09	1,74E+06	a	1,57±0,10E+09	9,89E+05	c
25 °C	6,58±0,08E+09	2,00E+06	a	6,38±0,78E+09	1,68E+06	ab	5,78±0,08E+09	2,26E+06	a
30 °C	2,72±0,30E+09	1,23E+06	b	1,26±0,10E+09	4,11E+05	c	1,08±0,00E+09	3,91E+05	d
F = 81,747; df = 4,5; p = 0,0001			F = 604,417; df = 4,5; p = 0,0000			F = 933,871; df = 4,5; p = 0,0000			

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

Graf 10 - Produkce spor na mm² kultury původních kmenů *M. anisopliae* po 21 dnech v různých teplotách kultivace



Největší výtěžnost spor vykazují původní kmen Man 3B ve 25 °C kultivace. U původních kmenů BIO 1020 a MKC 110112 není výrazný rozdíl v produkci spor ve vybraných teplotách kultivace. Patrný rozdíl je pouze u teploty kultivace ve 30 °C, kdy byla produkce spor vyšší u původního kmene BIO 1020. Největší rozdíly v produkci spor jsou patrné u původního kmene Man 3B. Je zajímavé, že kmen Man 3B produkuje více spor při teplotě 15 °C než při kultivaci ve 20 °C. Nejmenší produkce spor byla zaznamenána při 10 °C kultivace u všech původních kmenů. Při této teplotě má největší výtěžnost původní kmen MKC 110112. Z tabulky 7 a grafu 10 je opět zřejmé, že původní kmeny BIO 1020 a MKC 110112 vykazují vysokou produkci spor i u nižších teplot kultivace na rozdíl od původního kmene Man 3B. Kmen BIO 1020 v rozmezí teplot od 15 do 30 °C a kmen MKC 110112 v rozmezí teplot od 15 do 25 °C nevykazoval v produkci spor statisticky významné rozdíly (BIO 1020: $F = 81,747$; $df = 4,5$; $p = 0,0001$, MKC 110112: $F = 604,417$; $df = 4,5$; $p = 0,0000$). Poslední kmen Man 3B vykazoval statisticky průkazný rozdíl v produkci spor ve všech teplotách kultivace $F = 933,871$; $df = 4,5$; $p = 0,0000$.

5.2 Porovnání původních a desetkrát pasážovaných variant kmenů houby *M. anisopliae* přes umělé živné médium, substrát a vývojová stádia hostitele *T. molitor*

Cílem experimentu bylo porovnání radiálního růstu a produkce spor u původních a kontinuálně pasážovaných kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae*.

Základní údaje k pokusu

- suspenze kmenů pasážovaných přes PDA, ovesné vločky a vývojová stádia *T. molitor* o standardním titru $1,00 \times 10^7$ v 1 ml byla nanášena pomocí inokulační kličky ve formě kapky do středu Petriho misky s umělým živným médiem PDA v 8 opakováních pro každou variantu
- po zaschnutí kapky byly Petriho misky vloženy v plastických sáčcích do termostatu, který byl vytemperován na teplotu 25 ± 1 °C
- u středových kultur byl hodnocen radiální růst po 7, 14 a 21 dnech
- výtěžnost spor kmenů byla hodnocena po 21 dnech

5.2.1 Vliv kontinuálního pasážování kmene BIO 1020 entomopatogenní houby *M. anisopliae* na růst středových kultur po kultivaci ve 25 ± 1 °C

Tabulka 8 - Radiální růst původního a pasážovaného kmene BIO 1020 houby *M. anisopliae* přes substráty a vývojová stádia hostitele *T. molitor*

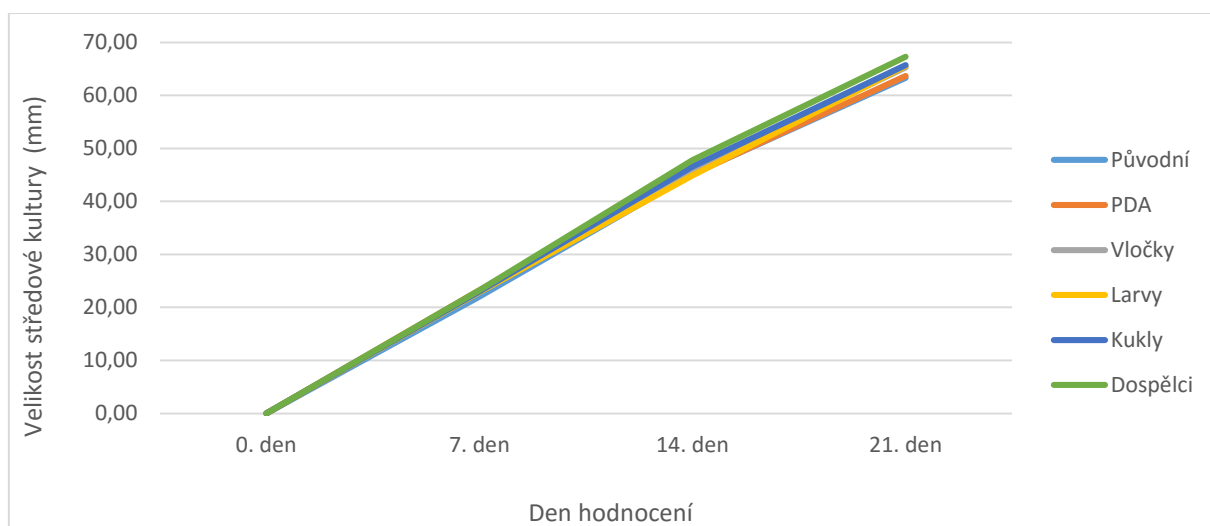
10. Pasáže	7. den		14. den		21. den	
	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)
Původní	22,06±0,57	382,30 b	45,19±0,75	1603,71 b	63,31±0,79	3148,24 c
PDA	23,25±0,58	424,56 a	45,13±1,20	1599,28 b	63,69±0,70	3185,65 c
Vločky	22,94±0,93	413,22 a	45,94±1,44	1657,39 ab	65,31±0,60	3350,29 b
Larvy	22,88±0,50	410,97 a	44,88±1,26	1581,61 b	65,56±0,63	3375,99 b
Kukly	23,00±0,73	415,48 a	46,56±0,63	1702,79 b	65,75±0,86	3395,32 b
Dospělci	23,25±0,58	424,56 a	47,81±0,75	1795,45 a	67,31±0,60	3558,61 a
F=6,76; df=5,90; p=0,0000		F=18,55; df=5,90; p=0,0000		F=70,00; df=5,90; p=0,0000		

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

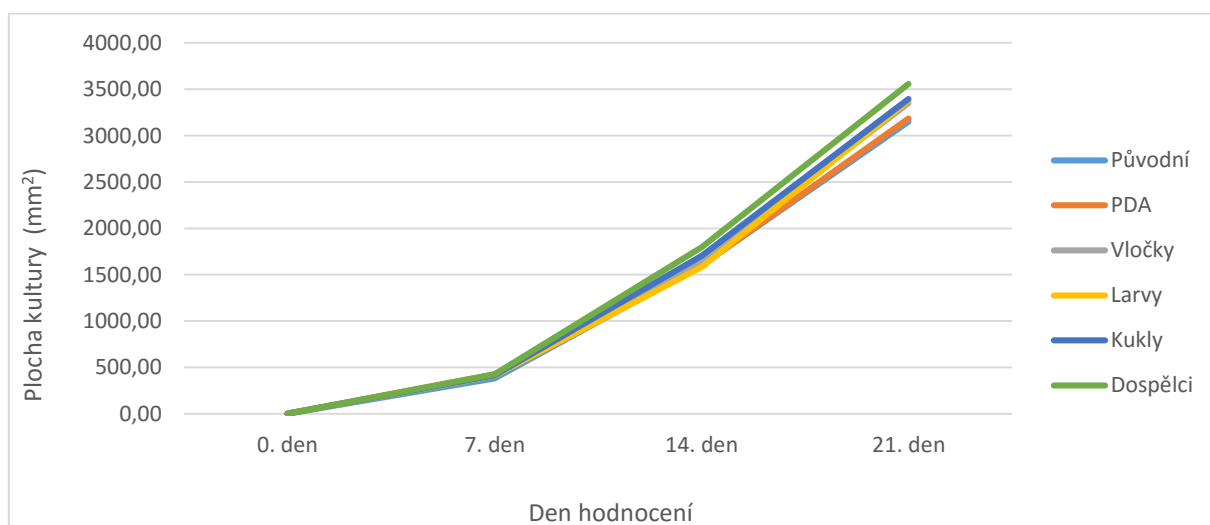
Původní i pasážované varianty kmene BIO 1020 vykazují tendenci nárůstu středových kultur v závislosti na dni kultivace. Po 7 dnech kultivace nevykazuje kmen tak významné

rozdíly ve velikosti středových kultur. Nejmenší kulturu tvoří původní kmen. Z pasážovaných variant vytváří nejmenší kulturu kmen pasážovaný přes larvy *T. molitor*. Nicméně, vliv pasážování na velikost kultur po 7 dnech bylo statisticky průkazné $F = 6,76$; $df = 5,90$; $p = 0,0000$. Po 14 dnech opět nejmenší kulturu ze všech testovaných variant včetně původního kmene vytvořil kmen pasážovaný přes larvy. Největší kulturu vytvořil kmen pasážovaný přes dospělé *T. molitor* ($F = 18,55$; $df = 5,90$; $p = 0,0000$). Po 21 dnech ($F = 70,00$; $df = 5,90$; $p = 0,0000$) kmen pasážovaný přes larvy vytvořil naopak větší kulturu než v předešlých dnech ve srovnání s některými variantami pasážování. Naopak, kmen subkultivovaný přes živnou půdu vykázal spolu s původním kmenem nejpomalejší nárůst středové kultury.

Graf 11 - Porovnání velikosti středové kultury původního a pasážovaného kmene BIO 1020 houby *M. anisopliae* přes substráty a vývojová stádia hostitele *T. molitor* za určitý časový úsek



Graf 12 - Porovnání plochy kultury původního a pasážovaného kmene BIO 1020 houby *M. anisopliae* přes substráty a vývojová stádia hostitele *T. molitor* za určitý časový úsek



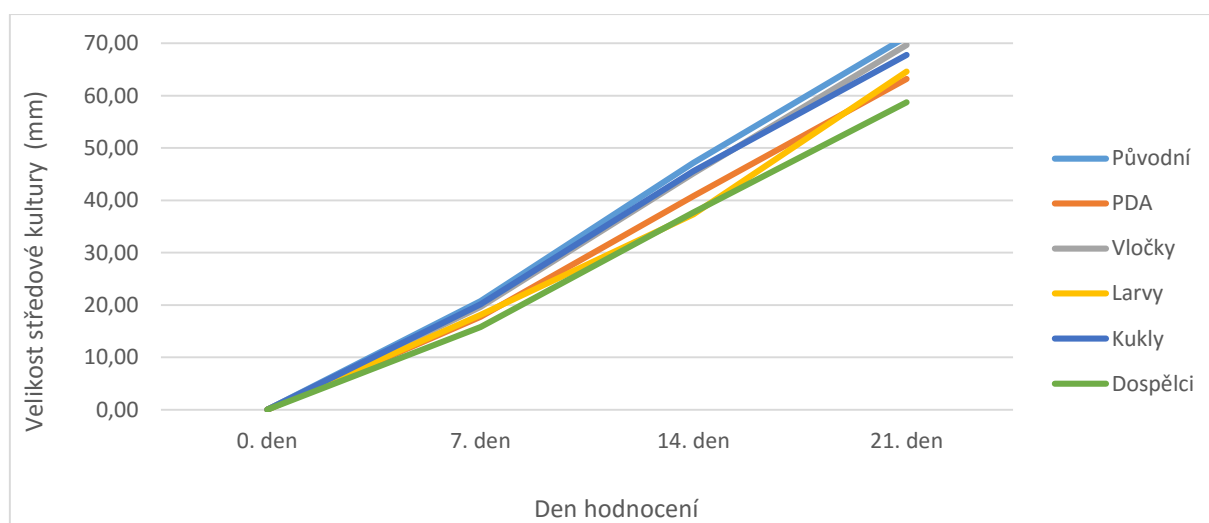
5.2.2 Vliv kontinuálního pasážování kmene MKC 110112 entomopatogenní houby *M. anisopliae* na růst středových kultur po kultivaci ve 25±1 °C

Tabulka 9 - Radiální růst původního a pasážovaného kmene MKC 110112 houby *M. anisopliae* přes substráty a vývojová stádia hostitele *T. molitor*

10. Pasáže	7. den		14. den		21. den		
	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)	
Původní	20,75±0,58	338,16 a	47,19±0,66	1748,81 a	71,25±0,58	3987,12 a	
PDA	17,75±0,45	247,45 d	40,81±0,40	1308,21 c	63,19±1,17	3135,83 e	
Vločky	19,63±0,50	302,49 c	45,13±1,26	1599,28 b	69,69±0,79	3814,16 b	
Larvy	18,13±0,50	258,02 d	37,31±0,60	1093,45 d	64,63±0,81	3280,13 d	
Kukly	20,13±0,34	318,10 b	45,56±0,73	1630,44 b	67,81±0,66	3611,68 c	
Dospělci	15,81±0,54	196,38 e	37,69±0,87	1115,54 d	58,75±1,06	2710,85 f	
		F=212,64; df=5,90; p= 0,0000		F=432,39; df=5,90; p=0,0000		F=460,20; df=5,90; p=0,0000	

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

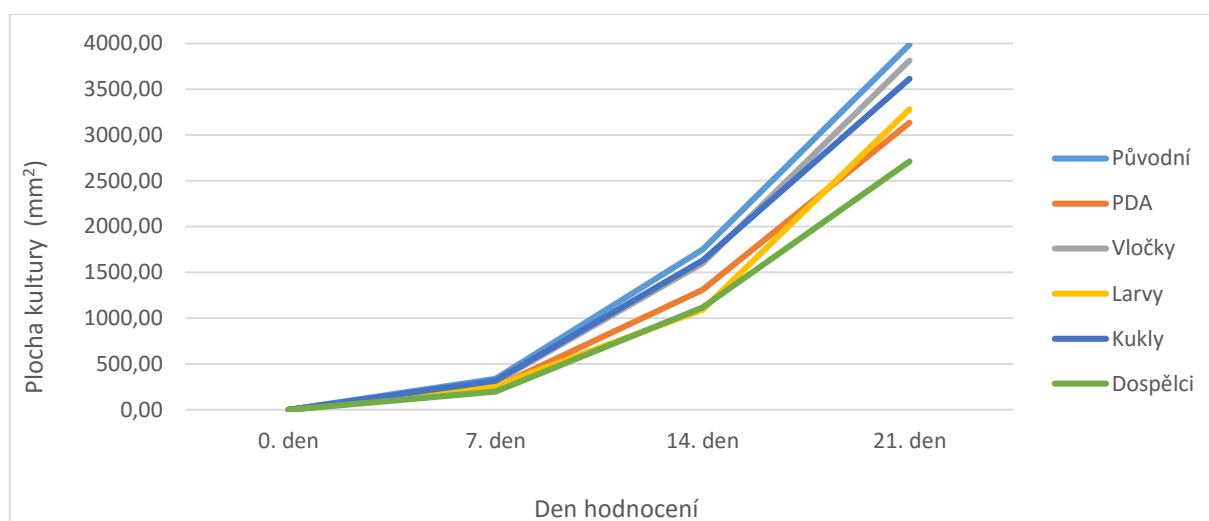
Graf 13 - Porovnání velikosti středové kultury původního a pasážovaného kmene MKC 110112 houby *M. anisopliae* přes substráty a vývojová stádia hostitele *T. molitor* za určitý časový úsek



Po 7 dnech kultivace jsou zaznamenány statistické rozdíly v růstu kultur pasážovaných variant $F = 212,64$; $df = 5,90$; $p = 0,0000$. U tohoto kmene největší kulturu vytvořil původní kmen. Ostatní varianty zaostávaly v růstu i o několik mm. Pouze kmen pasážovaný přes kukly vykázal obdobně velkou kulturu jako původní kmen. Po 14 dnech kultivace měl opět největší plochu původní kmen. Kmen pasážovaný přes kukly a kmen pasážovaný přes vločky vytvořil přibližně stejně velkou kulturu jako původní kmen. Nejmenší růstové schopnosti vykazovaly

varianty pasážované přes larvy a dospělé *T. molitor*. Původní kmen si zachoval největší růstovou tendenci i po 21 dnech kultivace ve srovnání s pasážovanými variantami. Nejmenší kultura byla zaznamenána u kmene pasážovaného přes dospělé *T. molitor*. Tato kultura byla menší o 12,50 mm ve srovnání s původním kmenem. Po 14 dnech ($F = 432,39$; $df = 5,90$; $p = 0,0000$) i po 21 dnech ($F = 460,20$; $df = 5,90$; $p = 0,0000$) byly opět zaznamenány statistické rozdíly ve velikosti kultur.

Graf 14 - Porovnání plochy kultury původního a pasážovaného kmene MKC 110112 houby *M. anisopliae* přes substráty a vývojová stádia hostitele *T. molitor* za určitý časový úsek



5.2.3 Vliv kontinuálního pasážování kmene Man 3B entomopatogenní houby *M. anisopliae* na růst středových kultur po kultivaci ve 25 ± 1 °C

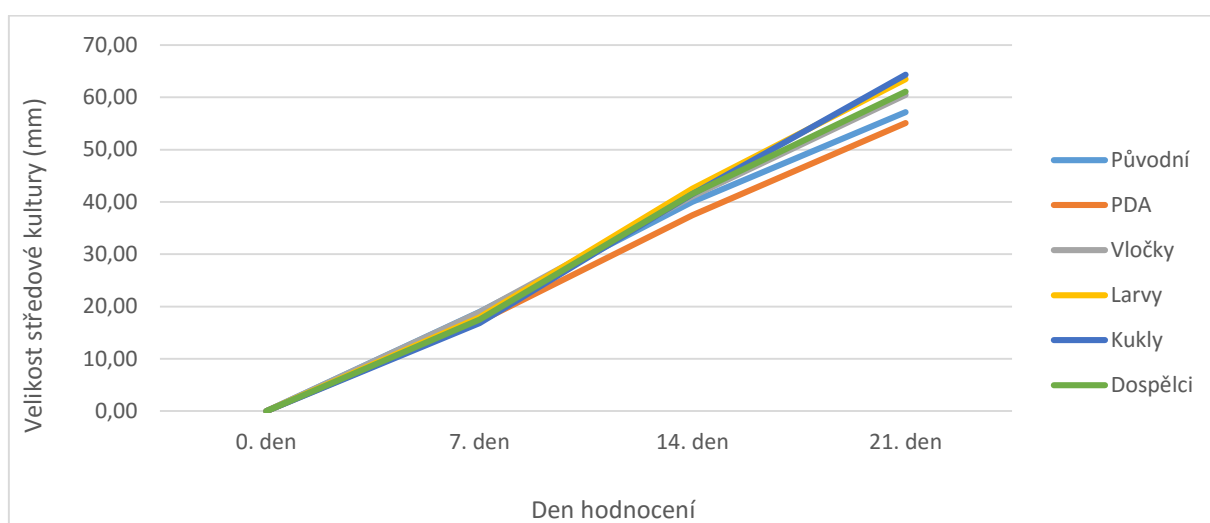
Tabulka 10 - Radiální růst původního a pasážovaného kmene Man 3B houby *M. anisopliae* přes substráty a vývojová stádia hostitele *T. molitor*

10. Pasáže	7. den		14. den		21. den	
	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)
Původní	18,94±0,44	281,67 a	40,00±0,37	1256,64 c	57,19±0,40	2568,57 d
PDA	17,13±0,89	230,33 cd	37,44±0,51	1100,79 d	55,06±0,77	2381,23 e
Vločky	18,88±0,50	279,81 b	41,06±0,57	1324,28 b	60,50±0,52	2874,75 c
Larvy	17,94±0,25	252,70 c	42,56±0,51	1422,80 a	63,50±0,52	3166,92 b
Kukly	16,81±0,75	222,00 d	41,50±0,82	1352,65 b	64,31±0,60	3248,48 a
Dospělci	17,50±0,63	240,53 bc	41,56±0,63	1356,73 b	61,06±0,57	2928,46 c
		F=35,41; df=5,90; p=0,0000	F=142,30; df=5,90; p=0,0000		F=618,60; df=5,90; p=0,0000	

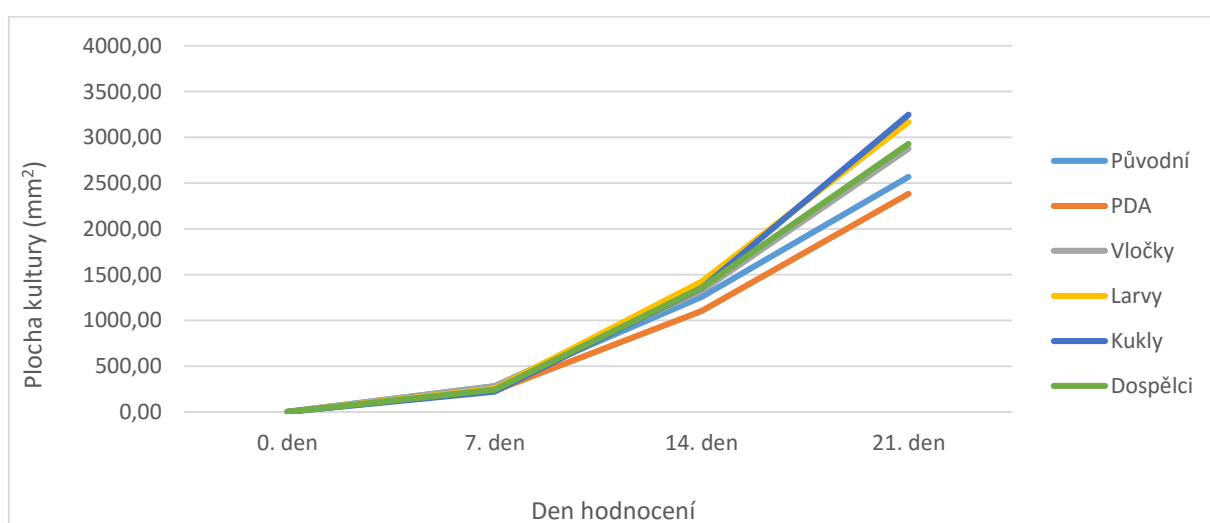
**a,b,c,d,e: průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Kmen Man 3B vytvořil po 7 dnech kultivace přibližně stejné velikosti středových kultur ve všech variantách pasážování. Nicméně, původní kmen vytvořil největší kulturu. Tento trend si původní kmen nezachoval. Po 14 a 21 dnech kultivace byly kultury původního kmene nejmenší spolu s kmenem subkultivovaného přes PDA. Po 14 dnech vytvořil největší kulturu kmen pasážovaný přes larvy potemníka moučného a po 21 dnech byla největší kultura u kmene pasážovaného přes kukly tohoto druhu. Rozdíly ve velikosti kultur byly ve všech sledovaných dnech statisticky průkazné (viz tabulka 10).

Graf 15 - Porovnání velikosti středové kultury původního a pasážovaného kmene Man 3B houby *M. anisopliae* přes substráty a vývojová stádia hostitele *T. molitor* za určitý časový úsek

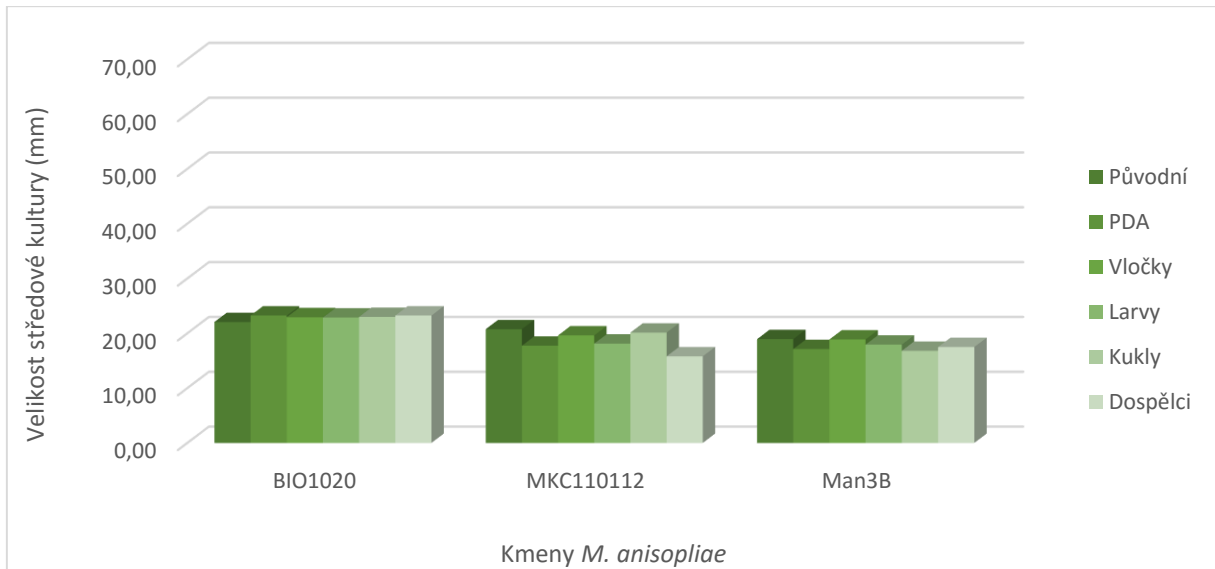


Graf 16 - Porovnání plochy kultury původního a pasážovaného kmene Man 3B houby *M. anisopliae* přes substráty a vývojová stádia hostitele *T. molitor* za určitý časový úsek

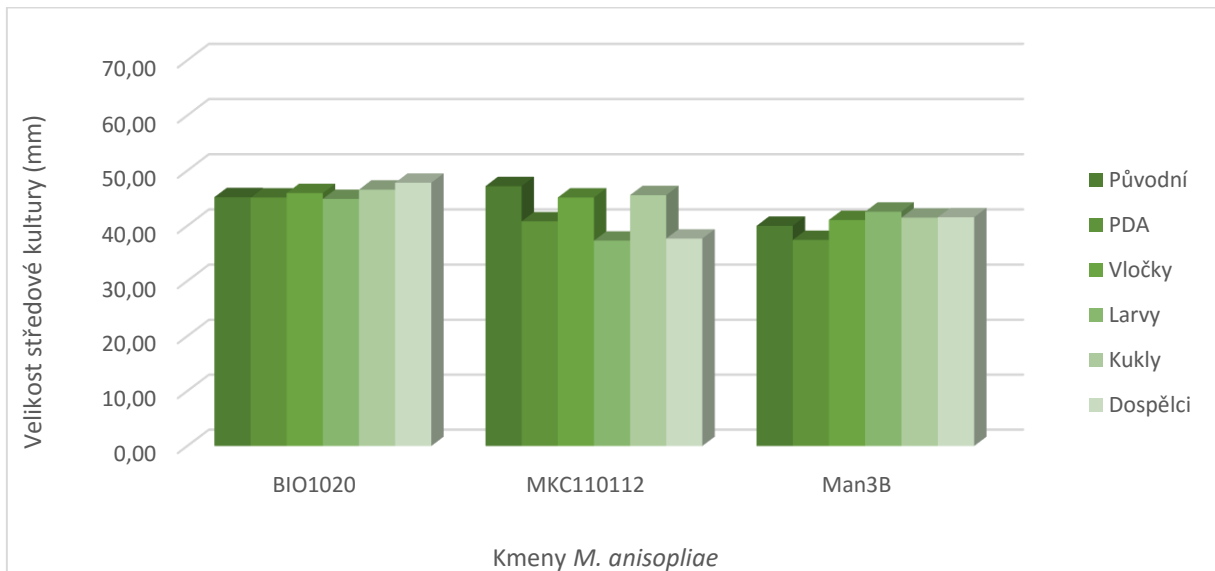


5.2.4 Porovnání vlivu kontinuálního pasážování kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* na růst středových kultur v daném čase

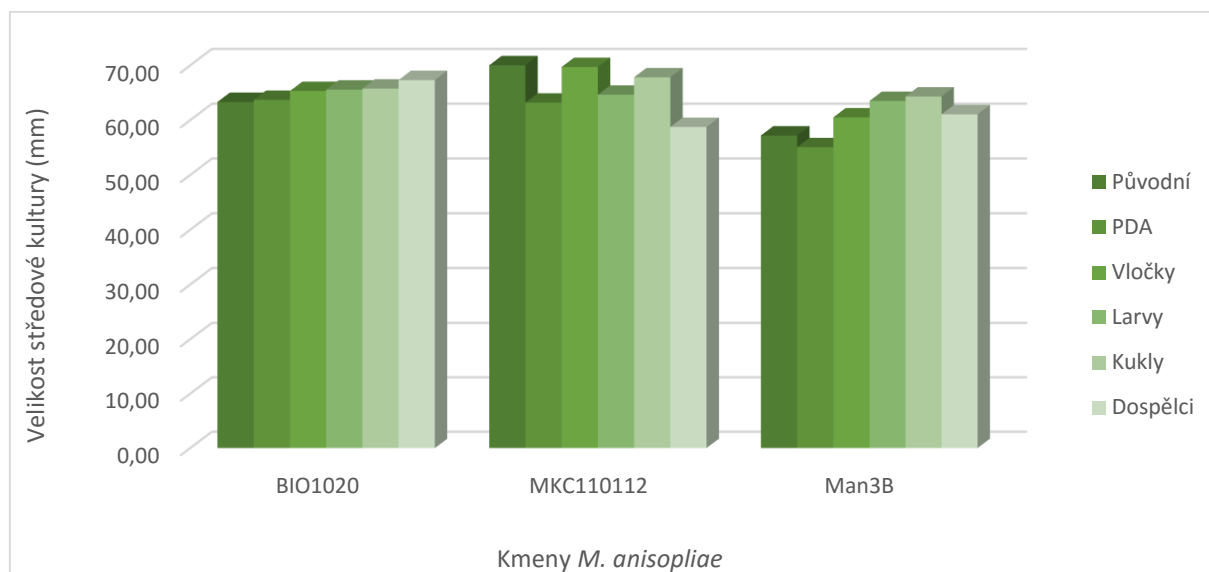
Graf 17 - Porovnání velikosti středových kultur původních a pasážovaných variant kmenů *M. anisopliae* po 7 dnech kultivace



Graf 18 - Porovnání velikosti středových kultur původních a pasážovaných variant kmenů *M. anisopliae* po 14 dnech kultivace



Graf 19 - Porovnání velikosti středových kultur původních a pasážovaných variant kmenů *M. anisopliae* po 21 dnech kultivace



Po 7 dnech kultivace nevykazovaly původní ani pasážované kmeny zásadní rozdíly v růstu kultur. Největší plochu středových kultur zaujímal kmen BIO 1020 ve všech variantách. U tohoto kmene nedocházelo u jednotlivých variant k rozdílné variabilitě v rychlosti kolonizace živné půdy. Kmen si zachovával téměř stejnou rychlost růstu ve srovnání s kmenem MKC 110112 a kmenem Man 3B. U těchto dvou kmenů docházelo u některých variant ke zpomalení růstu středových kultur.

Porovnání kmenů po 14 dnech kultivace představovalo patrnější rozdíly v růstu. Největší středové kultury vytvořil pasážovaný kmen BIO 1020 přes dospělé *T. molitor* a původní kmen MKC 110112. U kmene Man 3B převládala v růstu oproti kmenu MKC 110112 subkultivace přes larvy a dospělé *T. molitor*. Největší variabilita v růstu středových kultur byla zaznamenána u pasážovaných variant kmene MKC 110112.

Po 21 dnech kultivace byl největší nárůst kultury pozorován u původního kmene MKC 110112 a pasážovaných variant přes substrát a kuklu *T. molitor*. U kmene BIO 1020 a kmene Man 3B došlo ke zrychlení kolonizace substrátu ve všech pasážovaných variantách ve srovnání s původním kmenem. Pouze u subkultivace kmene Man 3B přes živnou půdu PDA bylo mírné zpomalení ve srovnání s původním kmenem.

5.2.5 Vliv kontinuálního pasážování kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* na produkci spor po 21 dnech kultivace ve 25±1 °C

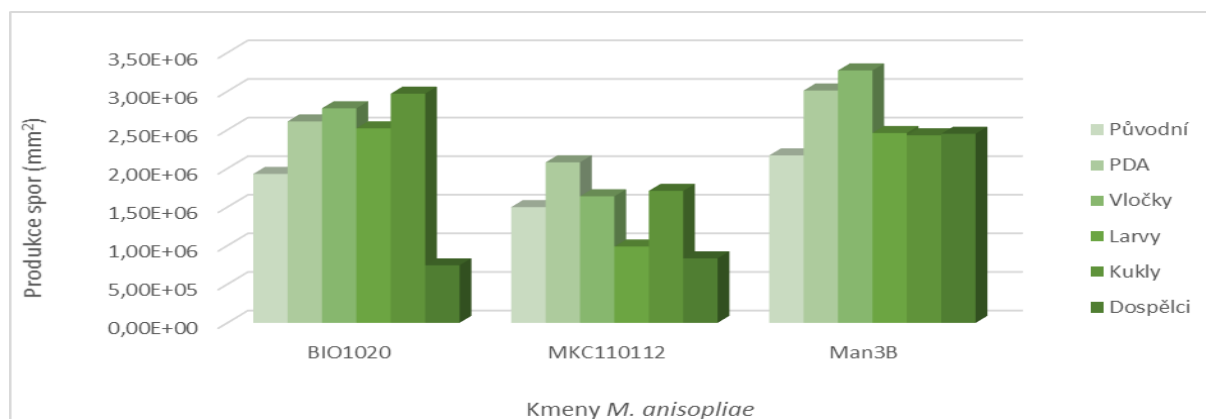
Tabulka 11 - Výtěžnost spor ze středových kultur původních a pasážovaných kmenů houby *M. anisopliae* přes substráty a vývojová stádia hostitele *T. molitor*

10. Pasáže	BIO1020			MKC110112			Man3B		
	Výtěžnost spor 1. kultury	Výtěžnost spor (mm ²)	Tukey HSD	Výtěžnost spor 1. kultury	Výtěžnost spor (mm ²)	Tukey HSD	Výtěžnost spor 1. kultury	Výtěžnost spor (mm ²)	Tukey HSD
Původní	6,08±0,03E+09	1,93E+06	b	6,00±0,65E+09	1,50E+06	b	5,58±0,53E+09	2,17E+06	b
PDA	8,30±1,00E+09	2,61E+06	ab	6,53±0,28E+09	2,08E+06	a	7,18±0,33E+09	3,01E+06	a
Vločky	9,30±0,30E+09	2,78E+06	ab	6,25±0,65E+09	1,64E+06	b	9,40±0,30E+09	3,27E+06	a
Larvy	8,50±2,05E+09	2,52E+06	ab	3,24±0,32E+09	9,89E+05	c	7,80±0,20E+09	2,46E+06	b
Kukly	1,01±0,10E+10	2,97E+06	a	6,18±0,38E+09	1,71E+06	b	7,90±0,05E+09	2,43E+06	b
Dospělci	2,65±0,21E+09	7,45E+05	c	2,27±0,14E+09	8,36E+05	c	7,18±0,28E+09	2,45E+06	b
F=51,701; df=5,6; p=0,0001				F=26,170; df=5,6; p=0,0005			F=41,290; df=5,6; p=0,0001		

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

Nejmenší výtěžnost spor vykazuje kmen MKC 110112 a to ve všech variantách pasážování. Ostatní dva kmene vykazují daleko větší produkci spor. Při porovnávání všech variant pasážování kmene BIO 1020 lze zaznamenat daleko vyšší produkci spor ve srovnání s původním kmenem. Toto navýšení se však neprokázalo u kmene BIO 1020 pasážovaného přes dospělé *T. molitor*. Naopak, u této varianty došlo k výraznému snížení produkce spor. Rozdíly v produkci spor byly u kmene BIO 1020 statisticky průkazné $F=51,701$; $df=5,6$; $p=0,0001$. U kmene MKC 110112 došlo k nárůstu produkce spor pouze u subkultivace přes živnou půdu PDA. K výraznému snížení produkce naopak došlo při pasážování tohoto kmene přes larvy a dospělé *T. molitor* ($F=26,170$; $df=5,6$; $p=0,0005$). U kmene Man 3B došlo k nárůstu v porovnání s původní kulturou u všech pasážovaných variant. U vývojových stádií *T. molitor* nebyl nárůst až tak patrný. Naopak, výrazný nárůst produkce spor byl zaznamenán u živné půdy PDA a vloček jakožto přirozeného substrátu ($F=41,290$; $df=5,6$; $p=0,0001$).

Graf 20 - Produkce spor na mm² kultury původních a pasážovaných kmenů *M. anisopliae*



5.3 Vliv teploty na růst a výtěžnost spor středových kultur houby *M. anisopliae* po deseti kontinuálních pasážích původních kmenů přes dospělce *T. molitor*

Cílem experimentu bylo zjistit, jaká teplota je pro kontinuálně pasážované varianty kmenů přes dospělce *T. molitor* neoptimálnější. Hodnotil se růst a produkce spor v určitých teplotách.

Základní údaje k pokusu

- suspenze kmenů pasážovaných přes dospělce *T. molitor* o standardním titru $1,00 \times 10^7$ v 1 ml byla nanášena pomocí inokulační kličky ve formě kapky do středu Petriho misky s umělým živným médiem PDA v 6 opakováních pro každou variantu
- po zaschnutí kapky byly Petriho misky vloženy v plastických sáčcích do termostátů, které byly vytemperovány na různé teploty: 10 ± 1 °C, 15 ± 1 °C, 20 ± 1 °C, 23 ± 1 °C, 25 ± 1 °C a 30 ± 1 °C
- u středových kultur byl hodnocen radiální růst po 7, 14 a 21 dnech
- výtěžnost spor kmenů byla hodnocena po 21 dnech

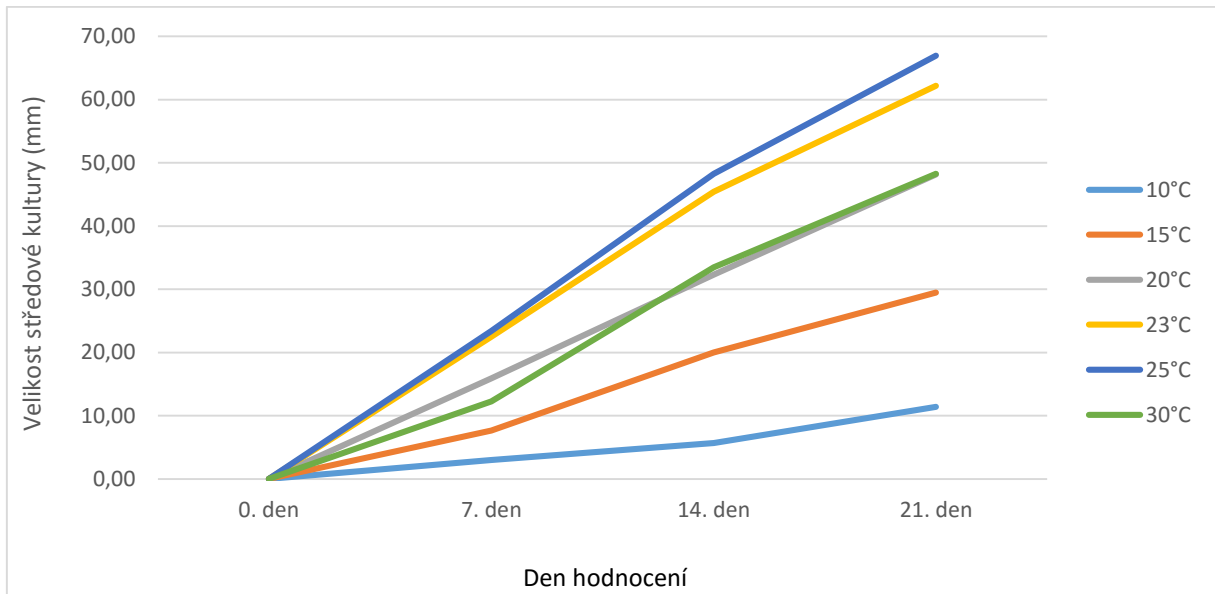
5.3.1 Vliv teploty na růst středových kultur pasážovaného kmene BIO 1020 přes dospělého jedince *T. molitor* v různých teplotách kultivace

Tabulka 12 - Radiální růst kmene BIO 1020 houby *M. anisopliae* pasážovaného přes dospělce *T. molitor*

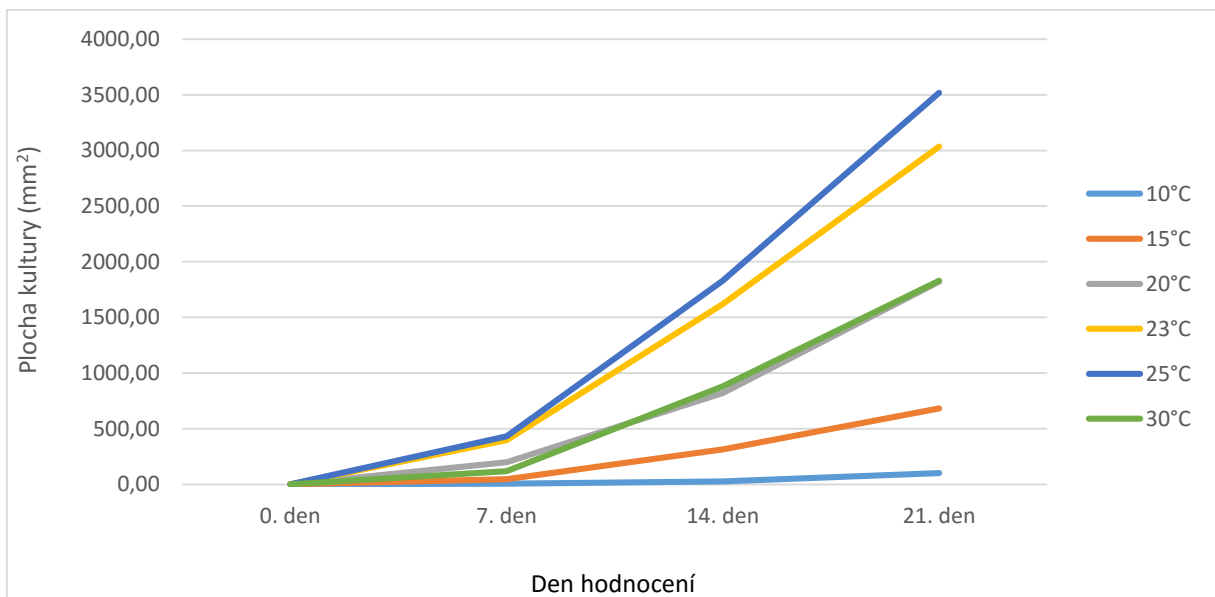
Teplota	7. den		14. den		21. den	
	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)
10 °C	3,00±0,00	7,07 f	5,67±0,49	25,22 f	11,42±0,51	102,37 e
15 °C	7,67±0,49	46,16 e	20,00±0,00	314,16 e	29,50±0,52	683,49 d
20 °C	15,92±0,29	198,97 a	32,33±0,49	821,09 d	48,17±0,39	1822,14 c
23 °C	22,50±0,52	397,61 c	45,42±0,67	1620,02 b	62,17±0,72	3035,32 b
25 °C	23,42±0,51	430,67 b	48,25±0,97	1828,45 a	66,92±0,79	3516,88 a
30 °C	12,25±0,45	117,86 d	33,50±0,52	881,41 c	48,25±0,75	1828,45 c
	F=4795,13; df=5,66; p=0,0000		F=3981,71; df=5,66; p=0,0000		F=7435,23; df=5,66; p=0,0000	

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

Graf 21 - Porovnání velikosti kultury kmene BIO 1020 houby *M. anisopliae* pasážovaného přes dospělce *T. molitor* za určitý časový úsek v závislosti na různých teplotách kultivace



Graf 22 - Porovnání plochy kultury kmene BIO 1020 houby *M. anisopliae* pasážovaného přes dospělce *T. molitor* za určitý časový úsek v závislosti na různých teplotách kultivace



Pasážovaný kmen BIO 1020 přes dospělce *T. molitor* vykazuje největší nárůst středových kultur při 25 °C kultivace a to u všech hodnocených dnů. Po 7 dnech kultivace kmen BIO 1020 rostl lépe ve 20 °C než ve 30 °C. Tento jev se v následujících hodnocených dnech změnil. Po 7 dnech byl zaznamenán statisticky průkazný rozdíl ve velikosti středových kultur v závislosti na teplotě kultivace $F = 4795,13$; $df = 5,66$; $p = 0,0000$. Po 14 a 21 dnech kultivace vytvořil kmen větší středovou kulturu v průběhu kultivace při teplotě 30 °C než ve 20 °C.

Nejmenší nárůst kmene BIO 1020 pasážovaného přes dospělce *T. molitor* byl zaznamenán v 10 °C kultivace. Po 14 dnech ($F = 3981,71$; $df = 5,66$; $p = 0,0000$) i po 21 ($F = 7435,23$; $df = 5,66$; $p = 0,0000$) dnech byl opět zaznamenán statistický rozdíl v rychlosti růstu kolonií během různých podmínek kultivace. Optimální teplota pro růst a vývoj tohoto pasážovaného kmene je 25 °C.

5.3.2 Vliv teploty na růst středových kultur pasážovaného kmene MKC 110112 přes dospělého jedince *T. molitor* v různých teplotách kultivace

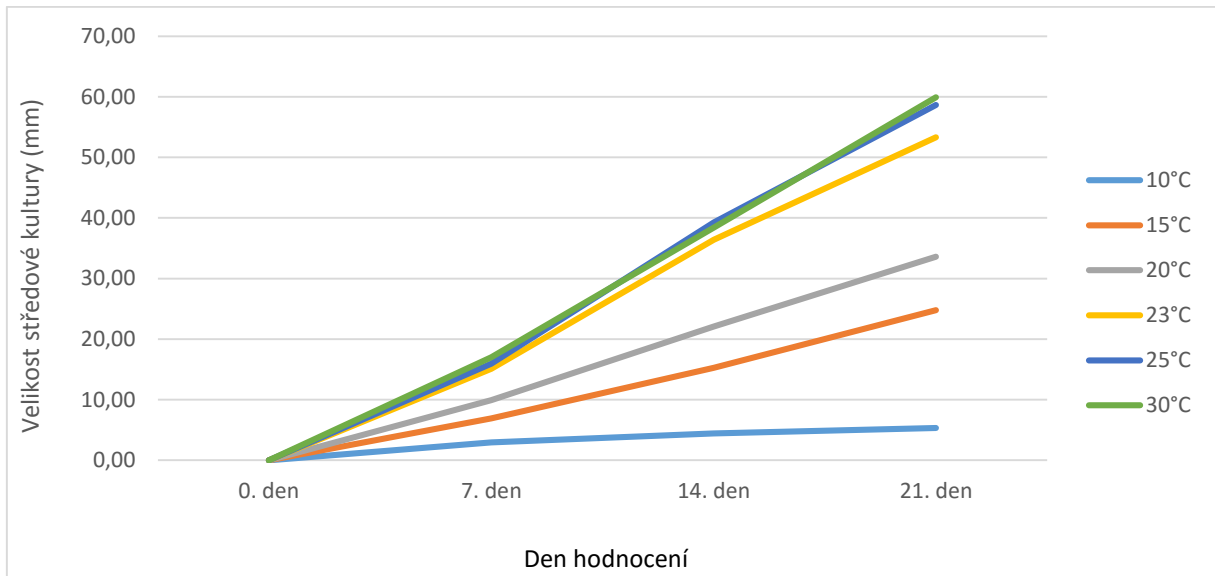
Tabulka 13 - Radiální růst kmene MKC 110112 houby *M. anisopliae* pasážovaného přes dospělce *T. molitor*

Teplota	7. den		14. den		21. den	
	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)
10 °C	2,92±0,29	6,68 f	4,42±0,51	15,32 f	5,33±0,49	22,34 f
15 °C	6,92±0,29	37,57 e	15,25±0,45	182,65 e	24,75±0,45	481,11 e
20 °C	9,92±0,29	77,24 d	22,08±1,00	383,02 d	33,58±0,51	885,80 d
23 °C	15,08±0,29	178,68 c	36,42±0,79	1041,57 c	53,33±0,65	2234,02 c
25 °C	15,92±0,29	198,97 b	39,25±1,06	1209,95 a	58,67±0,65	2703,16 b
30 °C	17,00±0,00	226,98 a	38,42±0,51	1159,12 b	59,92±0,51	2819,58 a
F=4814,42; df=5,66; p=0,0000		F=2370,01; df=5,66; p=0,0000		F=10564,6; df=5,66; p=0,0000		

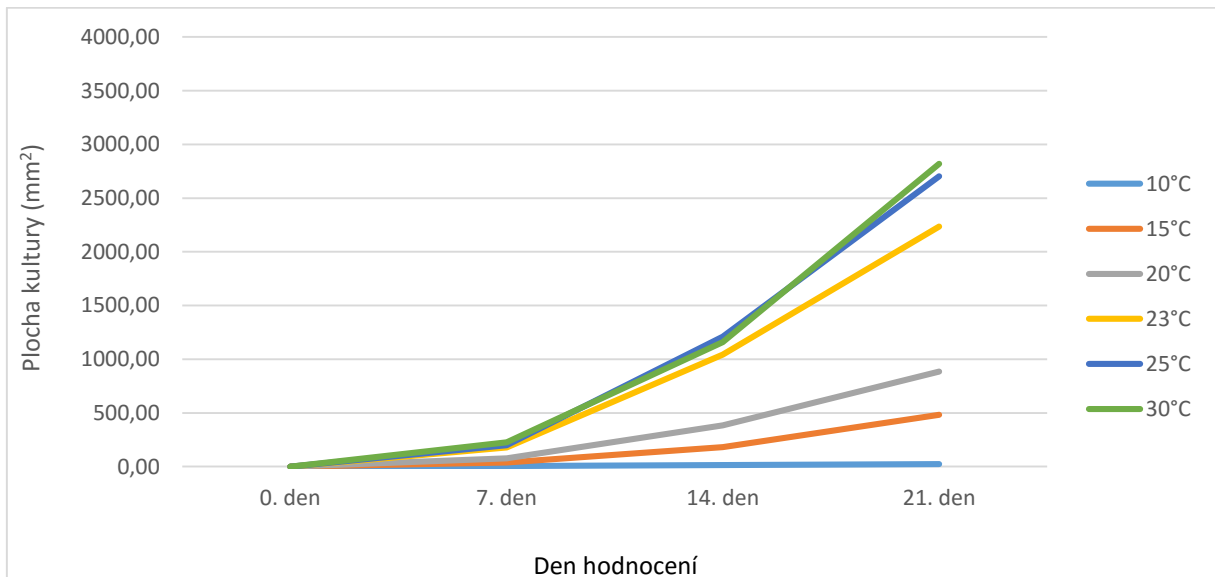
** a,b,c,d,e,f: průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test)

Po 7 dnech kultivace kmene MKC 110112 pasážovaného přes dospělce *T. molitor* se vytvořila největší středová kultura ve 30 °C. Při kultivaci ve 23 °C a 25 °C vykazoval kmen téměř shodný nárůst středové kultury. Po 7 dnech byl u kmene MKC 110 112 zaznamenán statisticky průkazný rozdíl ve velikosti středových kultur v závislosti na teplotě kultivace $F = 4814,42$; $df = 5,66$; $p = 0,0000$. Po 14 dnech se situace změnila. Největší nárůst kultury byl zaznamenán u tohoto kmene při teplotě 25 °C, nicméně plocha kultury byla téměř srovnatelná s plochou kultury kultivované ve 30°C. Vliv teploty na růst kultur byl i po 14 dnech statisticky průkazný $F = 2370,01$; $df = 5,66$; $p = 0,0000$. Po 21 dnech byla situace srovnatelná. Středová kultura vyprodukovaná ve 30 °C byla pouze o 1 mm větší než kultura z 25 °C, nicméně v dalších testovaných teplotách byly kultury výrazně menší ($F = 10564,6$; $df = 5,66$; $p = 0,0000$). Nejoptimálnější teploty pro růst jsou u tohoto kmene teploty 25 °C a 30 °C. Nižší teploty prostředí pro růst a vývoj kmene MKC 110112 ideální nejsou.

Graf 23 - Porovnání velikosti kultury kmene MKC 110112 houby *M. anisopliae* pasážovaného přes dospělce *T. molitor* za určitý časový úsek v závislosti na různých teplotách kultivace



Graf 24 - Porovnání plochy kultury kmene MKC 110112 houby *M. anisopliae* pasážovaného přes dospělce *T. molitor* za určitý časový úsek v závislosti na různých teplotách kultivace



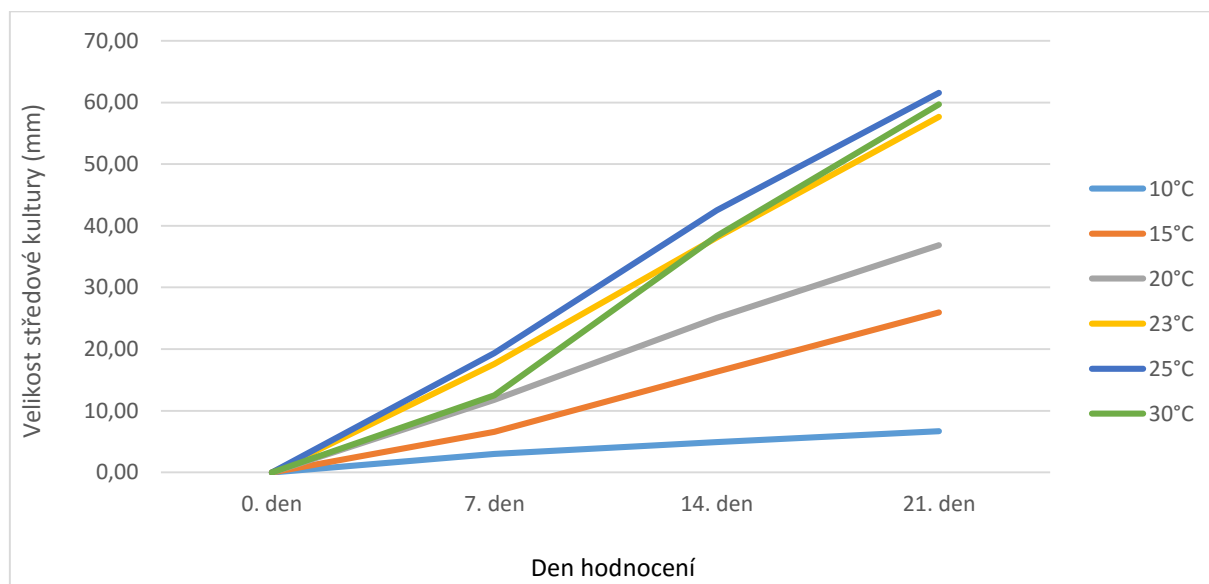
5.3.3 Vliv teploty na růst středových kultur pasážovaného kmene Man 3B přes dospělého jedince *T. molitor* v různých teplotách kultivace

Tabulka 14 - Radiální růst kmene Man 3B houby *M. anisopliae* pasážovaného přes dospělé *T. molitor*

Teplota	7. den		14. den		21. den		
	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)	
10 °C	3,00±0,00	7,07 f	4,92±0,29	18,99 e	6,67±0,49	34,91 f	
15 °C	6,58±0,51	34,04 e	16,33±0,49	209,53 d	25,92±0,67	527,53 e	
20 °C	11,75±0,45	108,43 d	25,08±0,29	494,15 c	36,83±0,58	1065,54 d	
23 °C	17,58±0,51	242,82 b	38,08±0,67	1139,09 b	57,67±0,65	2611,80 c	
25 °C	19,33±0,49	293,56 a	42,50±0,67	1418,62 a	61,58±0,79	2978,63 a	
30 °C	12,50±0,52	122,72 c	38,33±0,65	1154,10 b	59,67±0,49	2796,10 b	
		F=1474,34; df=5,66; p=0,0000		F=4348,24; df=5,66; p=0,0000		F=8851,86; df=5,66; p=0,0000	

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

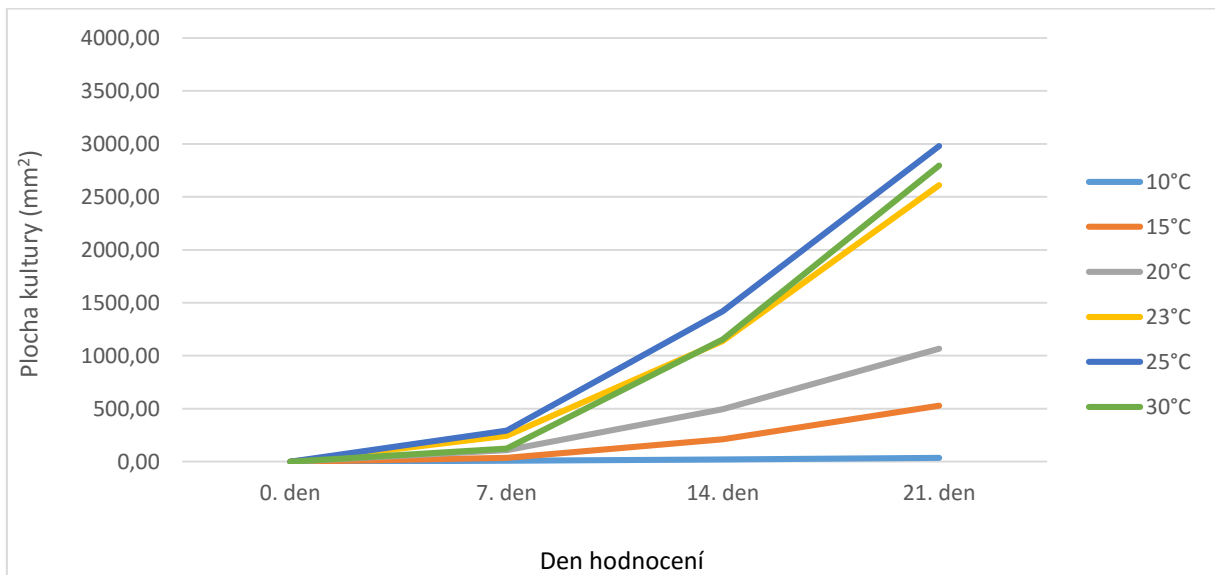
Graf 25 - Porovnání velikosti kultury kmene Man 3B houby *M. anisopliae* pasážovaného přes dospělé *T. molitor* za určitý časový úsek v závislosti na různých teplotách kultivace



Pro kmen Man 3B pasážovaného přes dospělé *T. molitor* byla pro růst ve všech dnech hodnocení nejideálnější teplota 25 °C. Po 7 dnech hodnocení byl podobný nárůst kmene při teplotách 20 °C a 30 °C, což se v následujících dnech zásadně změnilo ve prospěch vyšší teploty. Po 14 a 21 dnech hodnocení došlo ve 30 °C k výraznému nárůstu kultur a to téměř o 13 mm po 14 dnech kultivace a o 23 mm po 21 dnech kultivace. Nejmenší nárůst byl

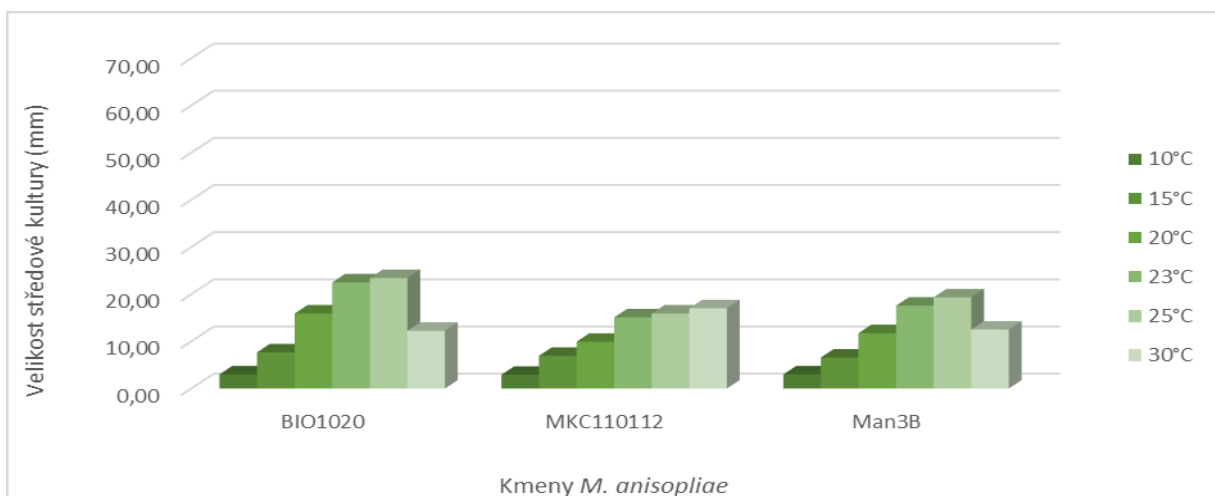
zaznamenán obdobně jako i u ostatních kmenů při 10 °C. Ve všech hodnocených dnech byl zaznamenán statisticky průkazný rozdíl v růstu středových kultur v závislosti na teplotě kultivace (7. den: $F = 1474,34$; $df = 5,66$; $p = 0,0000$; 14. den: $F = 4348,24$; $df = 5,66$; $p = 0,0000$; 21. den: $F = 8851,86$; $df = 5,66$; $p = 0,0000$).

Graf 26 - Porovnání plochy kultury kmene BIO 1020 houby *M. anisopliae* pasážovaného přes dospělé *T. molitor* za určitý časový úsek v závislosti na různých teplotách kultivace

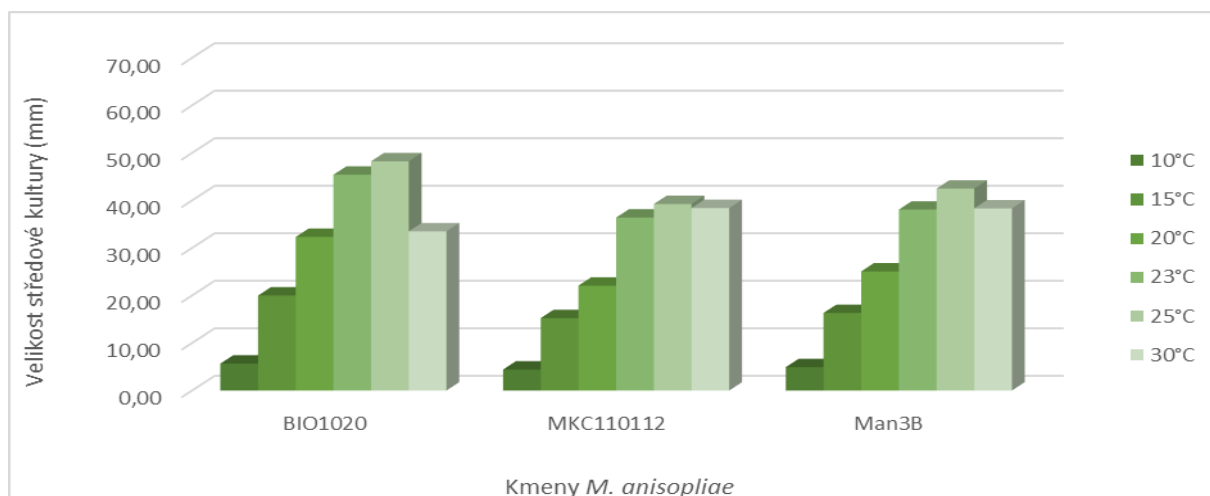


5.3.4 Porovnání vlivu teploty na růst a vývoj pasážovaných kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* přes dospělé *T. molitor* v čase

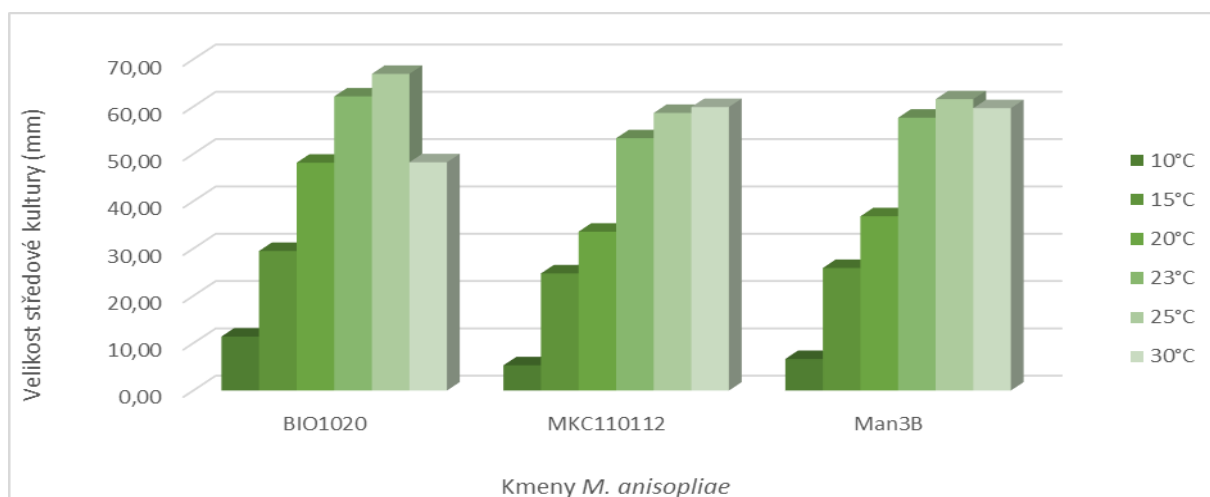
Graf 27 - Porovnání velikosti středových kultur kmenů houby *M. anisopliae* pasážovaných přes dospělé *T. molitor* po 7 dnech v závislosti na různých teplotách kultivace



Graf 28 - Porovnání velikosti středových kultur kmenů houby *M. anisopliae* pasážovaných přes dospělce *T. molitor* po 14 dnech v závislosti na různých teplotách kultivace



Graf 29 - Porovnání velikosti středových kultur kmenů houby *M. anisopliae* pasážovaných přes dospělce *T. molitor* po 21 dnech v závislosti na různých teplotách kultivace



V porovnání s ostatními kmeny subkultivovanými přes dospělého hostitele *T. molitor* kmen BIO 1020 zaujímá největší plochu středové kultury ve všech dnech hodnocení při teplotách 23 °C a 25 °C. Tento kmen vykazuje ve srovnání s ostatními kmeny také nejlepší růstovou schopnost i v nižších teplotách kultivace. Tento jev je nejprůkaznější po 21 dnech kultivace. Oproti tomu ve 30 °C kultivace kmen BIO 1020 za ostatními v růstu zaostává. Kmen MKC 110112 subkultivovaný přes potměníka moučného vykazoval po 21 dnech hodnocení v porovnání s ostatními kmeny největší nárůst při teplotě 30 °C. Podobně jako pasážovaný kmen MKC 110112 je i kmen Man 3B teplomilnější a vykazuje dobré růstové schopnosti ve 30 °C. Nejmenší nárůst středových kultur všech kmenů byl zaznamenán při teplotě 10 °C. Nicméně, kmen BIO 1020 vykazuje ve srovnání s kmeny MKC 110112 a Man 3B lepší schopnost adaptability v nižších teplotách.

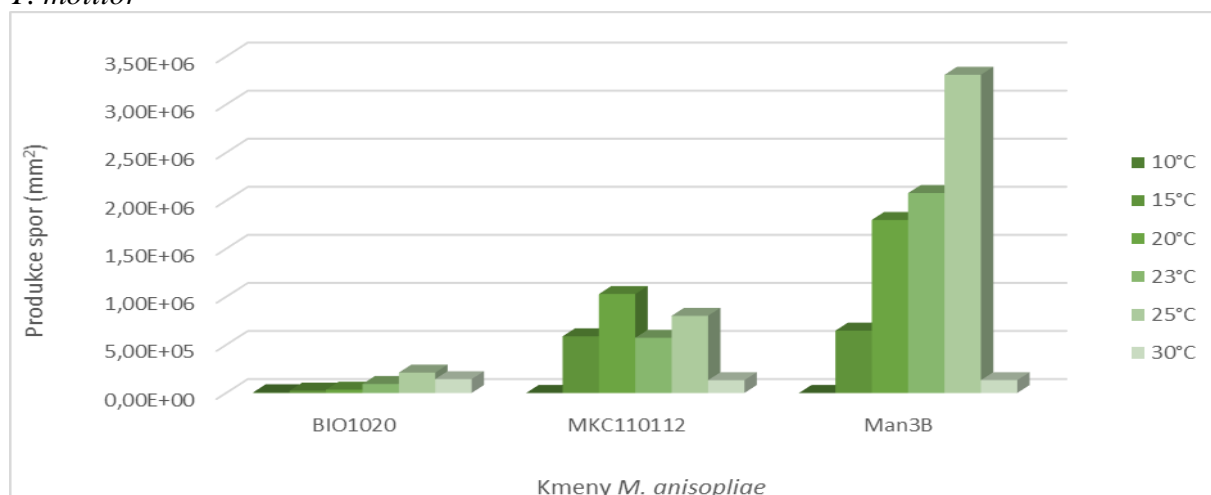
5.3.5 Vliv teploty na produkci spor pasážovaných kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* přes dospělé *T. molitor* po 21 dnech v různých teplotách kultivace

Tabulka 15 - Výtěžnost spor ze středových kultur pasážovaných kmenů houby *M. anisopliae* přes dospělé *T. molitor*

Teplota	BIO1020			MKC110112			Man3B		
	Výtěžnost spor 1. kultury	Výtěžnost spor (mm ²)	Tukey HSD	Výtěžnost spor 1. kultury	Výtěžnost spor (mm ²)	Tukey HSD	Výtěžnost spor 1. kultury	Výtěžnost spor (mm ²)	Tukey HSD
10 °C	7,88±1,13E+05	7,69E+03	e	2,06±0,19E+04	9,23E+02	e	2,63±0,75E+04	7,52E+02	f
15 °C	1,71±0,06E+07	2,51E+04	d	2,84±0,16E+08	5,90E+05	c	3,43±0,03E+08	6,49E+05	d
20 °C	6,23±0,04E+07	3,42E+04	d	9,10±0,40E+08	1,03E+06	a	1,92±0,02E+09	1,80E+06	c
23 °C	2,86±0,06E+08	9,43E+04	c	1,28±0,01E+09	5,74E+05	c	5,43±0,48E+09	2,08E+06	b
25 °C	7,46±0,04E+08	2,12E+05	a	2,17±0,05E+09	8,03E+05	b	9,85±0,05E+09	3,31E+06	a
30 °C	2,63±0,08E+08	1,44E+05	b	3,75±0,05E+08	1,33E+05	d	3,75±0,03E+08	1,34E+05	e
F=787,252; df=5,6; p=0,0000				F=527,244; df=5,6; p=0,0000			F=11586,71; df=5,6; p=0,0000		

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

Graf 30 - Produkce spor na mm² kultury kmenů *M. anisopliae* pasážovaných přes dospělé *T. molitor*



Na rozdíl od radiálního růstu pasážovaný kmen BIO 1020 ve srovnání s ostatními pasážovanými kmeny vykazoval nejmenší výtěžnost spor téměř ve všech teplotách kultivace. Výjimkou byla kultivace v 10 °C, kdy tento kmen vyprodukoval přibližně desetkrát více spor než ostatní pasážované kmeny. Kmen BIO 1020 ztratil metodou pasážování přes dospělé potměníka moučného schopnost produkce spor. Největší výtěžnost spor na mm² byla zaznamenána u kmene Man 3B. Naopak tento kmen metodou pasážování nabyl schopnost produkovat větší množství spor. Nárůst produkce spor je výrazně patrný po kultivaci ve 25 °C. Kmen Man 3B produkuje daleko větší množství spor i v teplotách, kdy ostatní kmeny v produkci rapidně zaostávají. U kmene Man 3B jako jediného nedošlo ke ztrátě produkce spor během procesu pasážování. Rozdíly v produkci spor kmenů byly statisticky průkazné, viz tabulka 15.

5.4 Standardní test klíčivosti – GI (Germination index)

Cílem tohoto testu bylo zjistit průměrný index růstu a vývoje a procento klíčivosti kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae*

Základní údaje k pokusu:

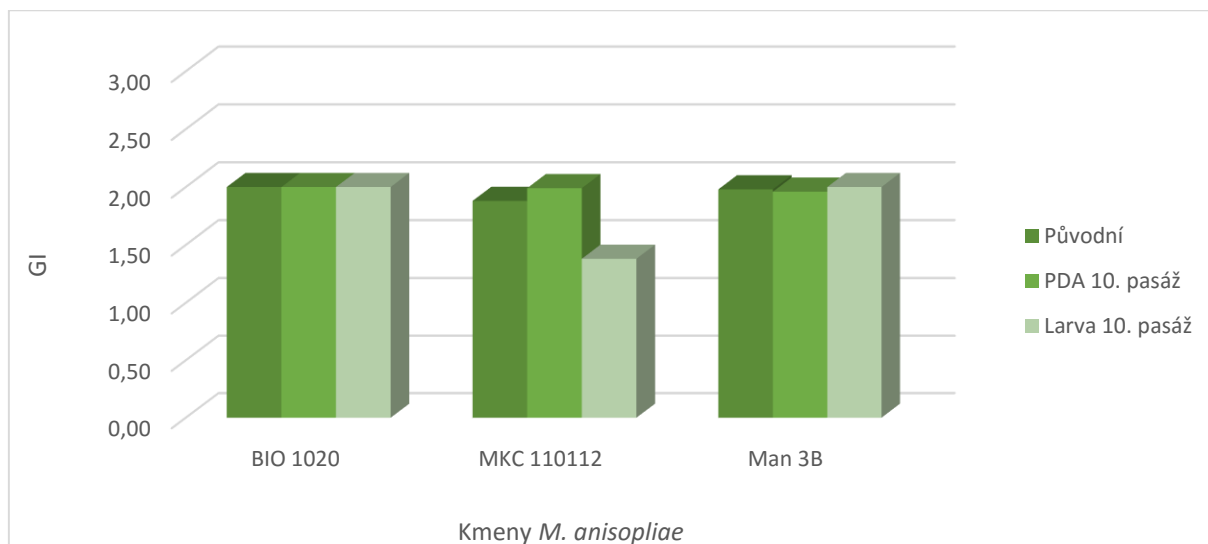
- u původních a pasážovaných kmenů houby *M. anisopliae* byla vytvořena suspenze o standardním titru $1,00 \times 10^6$ v 1ml
- suspenze byla nanesena inokulační kličkou na povrch živné půdy PDA na podložním sklíčku v podobě 10 kapek
- po zaschnutí bylo sklíčko vloženo do vlhké komůrky, kterou tvořily Petriho misky, na jejichž dně byl vlhký filtrační papír
- Petriho misky byly uloženy do vytemperovaného termostatu na požadovanou teplotu 25 ± 1 °C
- hodnocení bylo provedeno po 24 hodinách pomocí světelného mikroskopu
- hodnoceno bylo minimálně 100 spor z vybraných sekcí (zorné pole mikroskopu)
- ke každé konidii byl přiřazen příslušný index GI, který specifikuje vývoj patogena a stupeň naklíčení
- z vyhodnocených vzorků byl vypočítán průměrný index klíčivosti se směrodatnou odchylkou a procento klíčivosti

Tabulka 16 - Klíčivosti původních a pasážovaných kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae*

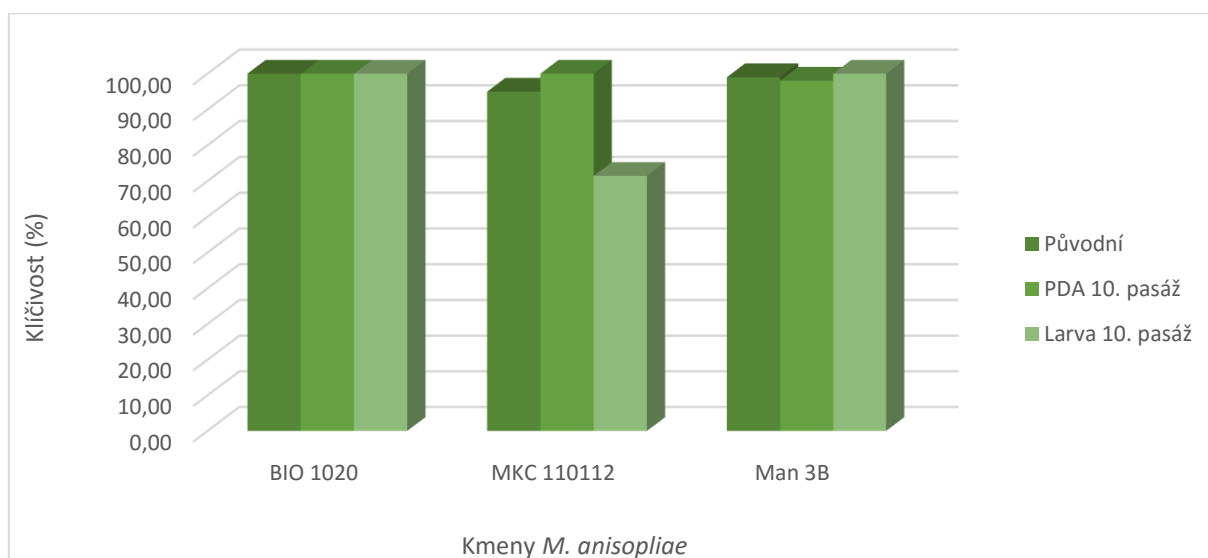
	Kmeny	GI	Klíčivost (%)
BIO 1020	Původní	2,00±0,05	100,00
	PDA 10. pasáž	2,00±0,00	100,00
	Larva 10. pasáž	2,00±0,00	100,00
MKC 110112	Původní	1,88±0,45	94,96
	PDA 10. pasáž	1,99±0,05	100,00
	Larva 10. pasáž	1,38±0,90	71,43
Man 3B	Původní	1,98±0,20	99,01
	PDA 10. pasáž	1,96±0,28	98,04
	Larva 10. pasáž	2,00±0,00	100,00

Všechny hodnocené původní i pasážované varianty kmenů přes živnou půdu PDA a larvy *T. molitor* vykazovaly v *in vitro* testu klíčivosti po 24 hodinách vysokou vitalitu. Výjimku představoval pouze kmen MKC 110112 pasážovaný přes larvy *T. molitor*, který se vyvíjel zřetelně pomaleji, ale na jeho účinnost tento ukazatel vliv neměl.

Graf 31 - Index klíčivosti (GI) u původních a pasážovaných variant kmenů houby *M. anisopliae*



Graf 32 - Procento klíčivosti u původních a pasážovaných variant kmenů houby *M. anisopliae*



5.5 Vliv koncentrace spor kmenů BIO 1020 a Man 3B entomopatogenní houby *M. anisopliae* na účinnost proti larvám *T. molitor*

Cílem biotestu zaměřeného na testování koncentrací kmenů BIO 1020 a Man 3B bylo zjistit optimální koncentraci pro zjištění virulence kmenů na larvách hostitele *T. molitor*. Biotest byl hodnocen v průběhu 11. dnů.

Základní údaje k pokusu

- do 24 sterilních komůrek byl vložen sterilní filtrační papír a bylo přidáno 150 μ l destilované vody
- z chovu byly vybrány larvy stejného instaru, které byly povrchově vysterilovány v 0,05% roztoku NaClO a následně 3 \times opláchnuty vodou
- sterilní larvy byly ponořeny na 2 sekundy do suspenze původních kmenů BIO 1020 a Man 3B o koncentraci spor $1,00 \times 10^5$ a $1,00 \times 10^6$ v 1 ml
- po ošetření byly larvy vloženy do jednotlivých komůrek
- ke každému pokusu byla vždy připravena kontrolní varianta, kdy byly larvy namočeny pouze ve sterilním 0,05% roztoku Tween 80
- test byl vyhodnocován 4., 5., 6., a 11. den
- hodnocena byla kumulovaná mortalita a každé larvě *T. molitor*, byla přidělena příslušná hodnota na stupnici FDGI

5.5.1 Kumulovaná mortalita u larev *T. molitor* infikovaných rozdílnými koncentracemi spor kmenů BIO 1020 a Man 3B houby *M. anisopliae* ve 25 ± 1 °C kultivace

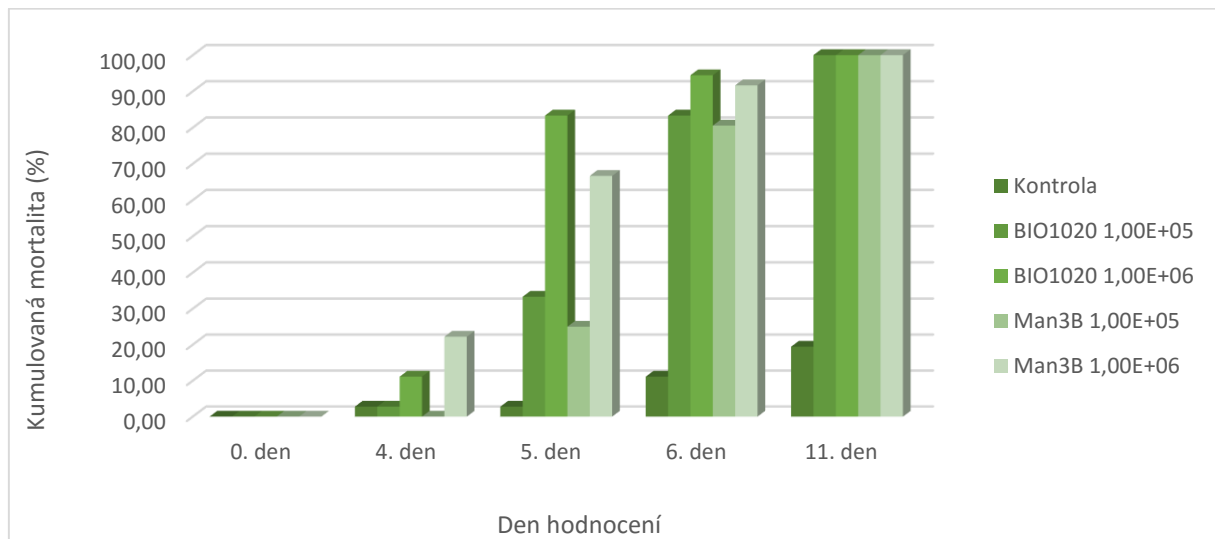
Tabulka 17 - Kumulovaná mortalita larev *T. molitor* po ošetření kmeny BIO 1020 a Man 3B

		4. den		5. den		6. den		11. den	
		Průměr	Tukey HSD	Průměr	Tukey HSD	Průměr	Tukey HSD	Průměr	Tukey HSD
Kontrola		2,77 \pm 3,93	a	2,77 \pm 3,93	c	11,09 \pm 15,71	b	19,42 \pm 21,87	b
BIO1020	1,0E+05	2,77 \pm 3,93	a	33,28 \pm 13,61	bc	83,27 \pm 11,79	a	100,0 \pm 0,0	a
	1,0E+06	11,09 \pm 7,86	a	83,27 \pm 6,80	a	100,0 \pm 0,0	a	100,0 \pm 0,0	a
Man3B	1,0E+05	0,00 \pm 0,00	a	24,97 \pm 11,79	bc	80,48 \pm 17,12	a	100,0 \pm 0,0	a
	1,0E+06	22,20 \pm 14,16	a	66,61 \pm 20,41	ab	91,61 \pm 6,80	a	100,0 \pm 0,0	a

F=3,29986; df=4,10; p=0,0572 F=13,4081; df=4,10; p=0,0005 F=10,6150; df=4,10; p=0,0013 F=27,9449; df=4,10; p=0,0000

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

Graf 33 - Porovnání kumulované mortality u larev *T. molitor* po ošetření kmeny BIO 1020 a Man 3B



Samotné kmeny i koncentrace kmenů vykazovaly odlišnosti v účinnosti proti larvám *T. molitor*. Kmen BIO 1020 prokázal vyšší účinnost ve srovnání s divokým kmenem Man 3B. Jediný den, kdy byla statisticky průkazná účinnost při různých koncentracích spor, byl 5. den. Kmeny vykazovaly statisticky průkazné rozdíly v účinnosti při odlišných koncentracích spor na larvách *T. molitor* $F=13,4081$; $df=4,10$; $p=0,0005$. Při použití nižší koncentrace kmene BIO 1020 byla zaznamenána po 5 dnech kumulovaná mortalita 33,28 %, zatímco u vyšší koncentrace byla kumulovaná mortalita vyšší o 50 %. Tento trend byl zaznamenán i u kmene Man 3B. Po 6 dnech byla již při použití koncentrace $1,00 \times 10^6$ spor v 1 ml 100% mortalita v populaci larev. U nižší koncentrace byla mortalita pouze 83,27 %, nicméně po 11 dnech byly všechny larvy mrtvé. U kmene Man 3B nedošlo ke 100% mortalitě ani u jedné koncentrace spor po 6 dnech hodnocení. Stoprocentní kumulovaná mortalita byla zaznamenána až 11. den hodnocení. Předpoklad je, že larvy byly mrtvé dříve, ale hodnocení se mezi 6 dnem a 11 dnem neprovádělo.

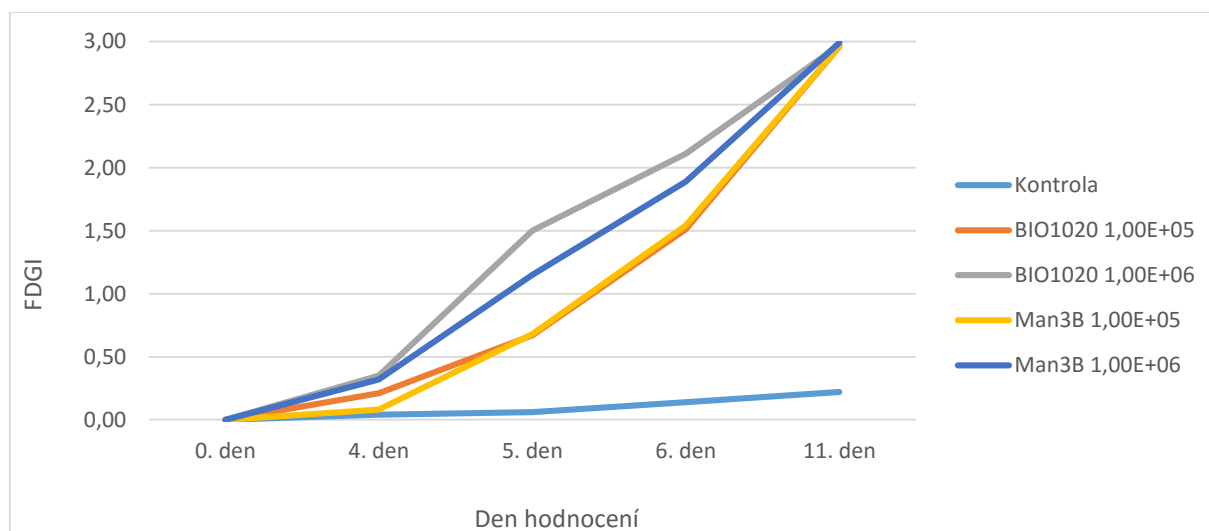
5.5.2 Index růstu a vývoje nákazy (FDGI) na larvách *T. molitor* infikovaných rozdílnými koncentracemi spor kmenů BIO 1020 a Man 3B houby *M. anisopliae* ve 25 ± 1 °C kultivace

Tabulka 18 - Průměrná hodnota FDGI kmenů BIO 1020 a Man 3B na larvách *T. molitor*

		4. den	5. den	6. den	11. den
Kontrola		0,04±0,10	0,06±0,15	0,14±0,21	0,22±0,27
BIO1020	1,0E+05	0,21±0,29	0,67±0,54	1,51±0,62	2,96±0,11
	1,0E+06	0,35±0,43	1,50±0,59	2,11±0,56	2,97±0,06
Man3B	1,0E+05	0,08±0,19	0,68±0,45	1,54±0,52	2,96±0,11
	1,0E+06	0,32±0,50	1,15±0,75	1,89±0,71	2,99±0,05

Pomocí testu FDGI je zaznamenán průběh infekce v populaci larev. Čím vyšší index je v populaci zaznamenán, tím je kmen houby přítomný ve formě mycelia na povrchu larvy. Index 1,50 poukazuje na počátek infekce patogenem a index blíží se hodnotě 3,00 značí, že kmen je schopen dokončit svůj vývoj, tj. plně sporuluje na povrchu hostitele. U kmene BIO 1020 byl zaznamenán rychlejší vývoj infekce zejména při použití koncentrace $1,00 \times 10^6$ spor v 1 ml ve srovnání s kmenem Man 3B. U koncentrace $1,00 \times 10^5$ spor v 1 ml není zaznamenán výrazný rozdíl u obou kmenů. Počátek infekce byl u obou kmenů zaznamenán již po 5 dnech, kdy výraznější infekce byla zaznamenána u kmene BIO 1020. U tohoto kmene byla zaznamenána sporulace již po 6 dnech při použití koncentrace $1,00 \times 10^6$ spor v 1 ml.

Graf 34 - Porovnání hodnot FDGI kmene BIO 1020 a Man 3B na larvách *T. molitor*



5.6 Vliv původních a desetkrát pasážovaných variant kmenů houby *M. anisopliae* na účinnost proti hostiteli potemníka moučného (*T. molitor*)

Cílem biotestu zaměřeného na hodnocení původních a pasážovaných kmenů *M. anisopliae* bylo zjistit účinnost kmenů na larvy hostitele *T. molitor*. Biotest byl hodnocen v průběhu 11. dnů.

Základní údaje k pokusu

- do experimentálních komůrek byl vložen sterilní filtrační papír a bylo přidáno 150 μ l destilované vody, čímž byly vytvořeny „vlhké komůrky“
- z chovu byly vybrány larvy stejného instaru, které byly povrchově vysterilovány v 0,05% roztoku NaClO a následně 3 \times opláchnuty vodou
- sterilní larvy byly ponořeny na 2 s do suspenze původních a desetkrát pasážovaných kmenů přes substrát (PDA) a larvy *T. molitor* o koncentraci spor $1,00 \times 10^7$ v 1 ml
- po ošetření byly larvy vloženy do jednotlivých komůrek
- ke každému pokusu byla vždy připravena kontrolní varianta, kdy byly larvy namočeny pouze ve sterilním 0,05% roztoku Tween 80
- test byl vyhodnocován 4., 6., 7., a 11. den
- hodnocena byla kumulovaná mortalita a každé larvě *T. molitor*, byla přidělena příslušná hodnota na stupnici FDGI

5.6.1 Kumulovaná mortalita a index FDGI na larvách *T. molitor* po ošetření původním a pasážovaným kmenem BIO 1020 přes substrát a larvy *T. molitor* ve 25 \pm 1 $^{\circ}$ C

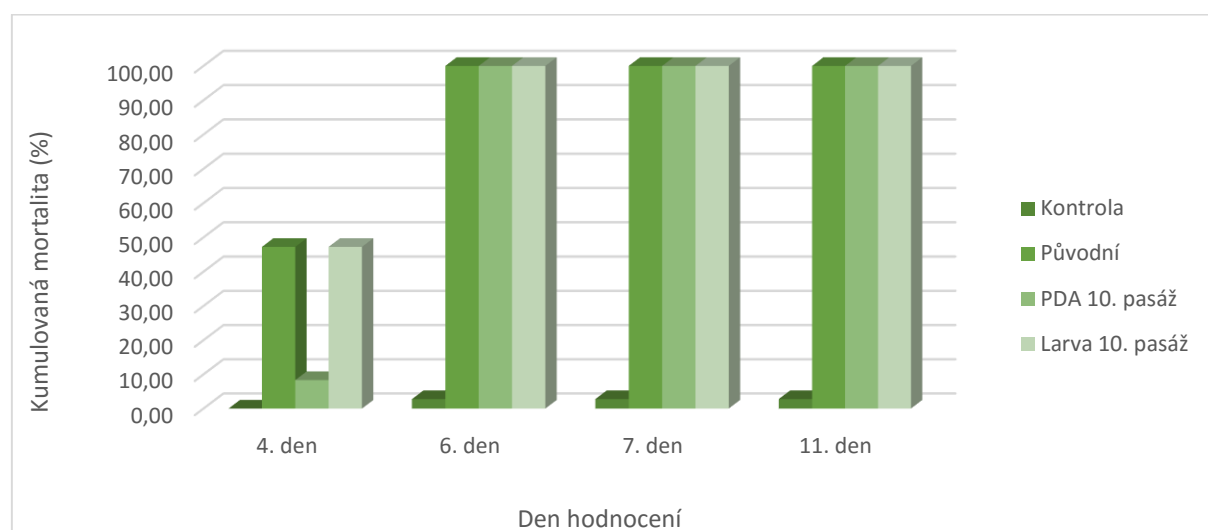
Tabulka 19 - Kumulovaná mortalita u larev *T. molitor* po ošetření původním a pasážovaným kmenem BIO 1020 přes substrát a larvy *T. molitor*

	4. den		6. den		7. den		11. den	
	Kumulovaná mortalita	Tukey HSD	Kumulovaná mortalita	Tukey HSD	Kumulovaná mortalita	Tukey HSD	Kumulovaná mortalita	Tukey HSD
Kontrola	0,00 \pm 0,00	b	2,77 \pm 3,93	b	2,77 \pm 3,93	b	2,77 \pm 3,93	b
Původní	47,17 \pm 7,86	a	100,00 \pm 0,00	a	100,00 \pm 0,00	a	100,00 \pm 0,00	a
PDA 10. p.	8,32 \pm 6,80	b	100,00 \pm 0,00	a	100,00 \pm 0,00	a	100,00 \pm 0,00	a
Larva 10. p.	47,17 \pm 14,16	a	100,00 \pm 0,00	a	100,00 \pm 0,00	a	100,00 \pm 0,00	a
	F=20,0401; df=3,8; p=0,0004		F=227,765; df=3,8; p=0,0000		F=227,765; df=3,8; p=0,0000		F=227,765; df=3,8; p=0,0000	

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

Původní a pasážovaný kmen BIO 1020 vykazoval odlišnosti v účinnosti proti larvám potěmníka moučného *T. molitor* pouze 4. den biotestu. Původní kmen a pasážovaný kmen přes larvy vykázal 4. den téměř 50% mortalitu. Kmen subkultivovaný přes PDA nebyl proti larvám 4. den tak účinný. Účinnost byla po 4 dnech statisticky průkazná $F = 20,0401$; $df = 3,8$; $p = 0,0004$. Nicméně, v následujících dnech hodnocení vykázal 100% mortalitu jako dvě předchozí varianty.

Graf 35 - Porovnání kumulované mortality u larev *T. molitor* po ošetření původním a pasážovaným kmenem BIO 1020 přes substrát a larvy *T. molitor*



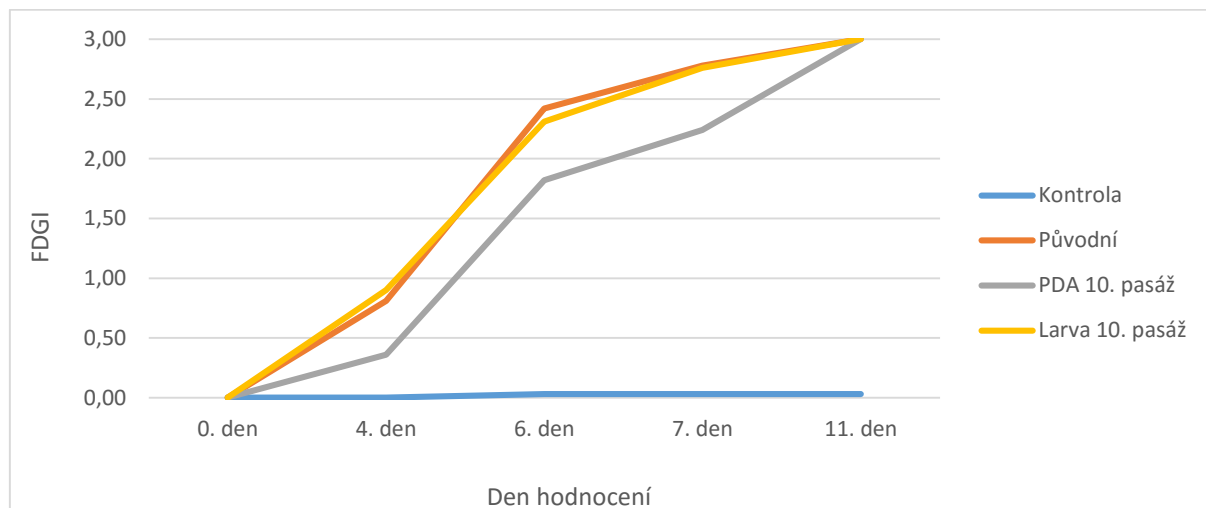
Tabulka 20 - Průměrný index FDGI u původního a pasážovaného kmene BIO 1020 houby *M. anisopliae* přes substrát a larvy *T. molitor* v čase

	4. den	6. den	7. den	11. den
Kontrola	0,00±0,00	0,03±0,10	0,03±0,10	0,03±0,10
Původní	0,81±0,51	2,42±0,40	2,78±0,31	3,00±0,00
PDA 10. p.	0,36±0,34	1,82±0,47	2,24±0,35	3,00±0,00
Larva 10. p.	0,90±0,45	2,31±0,58	2,76±0,30	3,00±0,00

Pomocí testu FDGI je zaznamenán průběh infekce v populaci larev. Po 4 dnech byl zaznamenán menší index než je hodnota 1, tj. v populaci se ve všech testovaných variantách kmene BIO 1020 objevovaly stále živé larvy. Po 6 dnech inkubace byla zaznamenána 100% mortalita u všech variant, nicméně podle indexu lze říci, že původní a pasážovaný kmen přes larvu je rychlejší ve svém růstu a vývoji než kmen pasážovaný přes živnou půdu PDA. U těchto dvou kmenů došlo již ke jejich sporulaci, zatímco u subkultivovaného kmene přes PDA byly larvy porostlé pouze myceliem. Po 7 dnech začal i kmen pasážovaný přes PDA sporulovat

na povrchu těla hostitele. U zbylých kmenů byla zaznamenána již plně vysporulovaná ohniska, která se projevují tmavě zelenou barvou. Plně zelené larvy byly zaznamenány 11. den ve všech variantách.

Graf 36 - Porovnání indexu FDGI u původního a pasážovaného kmene BIO 1020 houby *M. anisopliae* přes substrát a larvy *T. molitor* v čase



5.6.2 Kumulovaná mortalita a index FDGI na larvách *T. molitor* po ošetření původním a pasážovaným kmenem MKC 110112 přes substrát a larvy *T. molitor* ve 25±1 °C

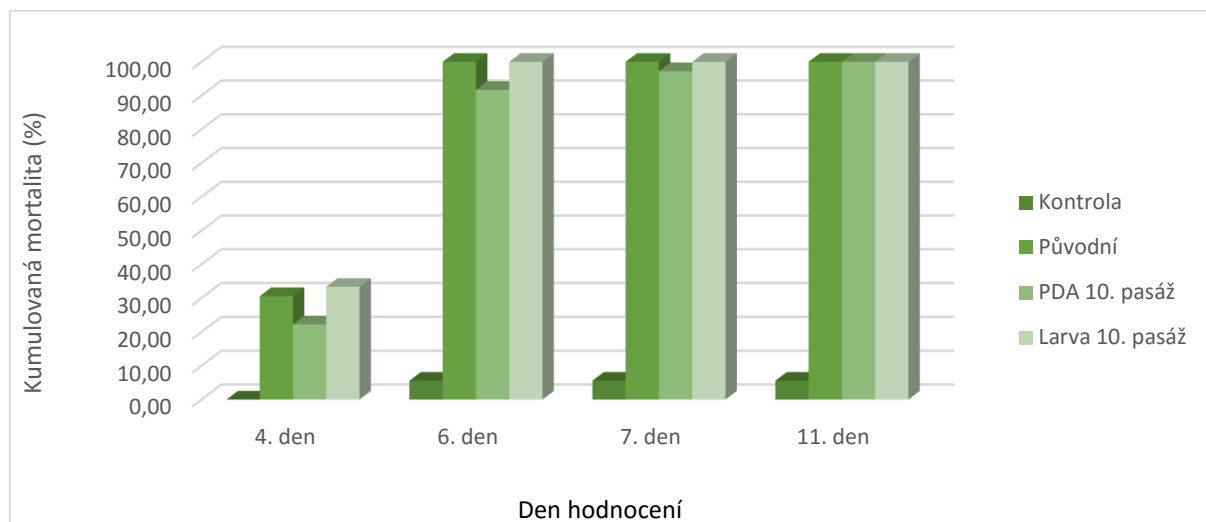
Tabulka 21 - Kumulovaná mortalita larev *T. molitor* po ošetření původním a pasážovaným kmenem MKC 110112 přes substrát a larvy *T. molitor*

	4. den		6. den		7. den		11. den	
	Kumulovaná mortalita	Tukey HSD	Kumulovaná mortalita	Tukey HSD	Kumulovaná mortalita	Tukey HSD	Kumulovaná mortalita	Tukey HSD
Kontrola	0,00±0,00	a	5,54±7,86	a	5,54±7,86	a	5,54±7,86	a
Původní	30,52±10,39	b	100,00±0,00	b	100,00±0,00	b	100,00±0,00	b
PDA 10. p.	22,20±7,86	b	91,61±6,80	b	97,19±3,93	b	100,00±0,00	b
Larva 10. p.	33,28±13,61	b	100,00±0,00	b	100,00±0,00	b	100,00±0,00	b
	F=14,4456; df=3,8; p=0,0014		F=53,3909; df=3,8; p=0,0000		F=67,2790; df=3,8; p=0,0000		F=104,157; df=3,8; p=0,0000	

Původní a pasážovaný kmen MKC 110 112 způsobil 4. den mortalitu v rozmezí od 22,20 do 33,28%. Nejnižší mortalita byla zaznamenána u kmene desetkrát pasážovaného přes umělou živnou půdu PDA, nicméně nebyl 4. den zaznamenán statisticky průkazný rozdíl v účinnosti kmene proti larvám *T. molitor* $F = 14,4456$; $df = 3,8$; $p = 0,0014$. Obdobný trend byl

zaznamenán i 6. a 7. den hodnocení. Mortalita larev nebyla po těchto kontrolních dnech stoprocentní na rozdíl od kmene původního a pasážovaného přes larvy *T. molitor*.

Graf 37 - Porovnání kumulované mortality u larev *T. molitor* po ošetření původním a pasážovaným kmenem MKC 110112 přes substrát a larvy *T. molitor*

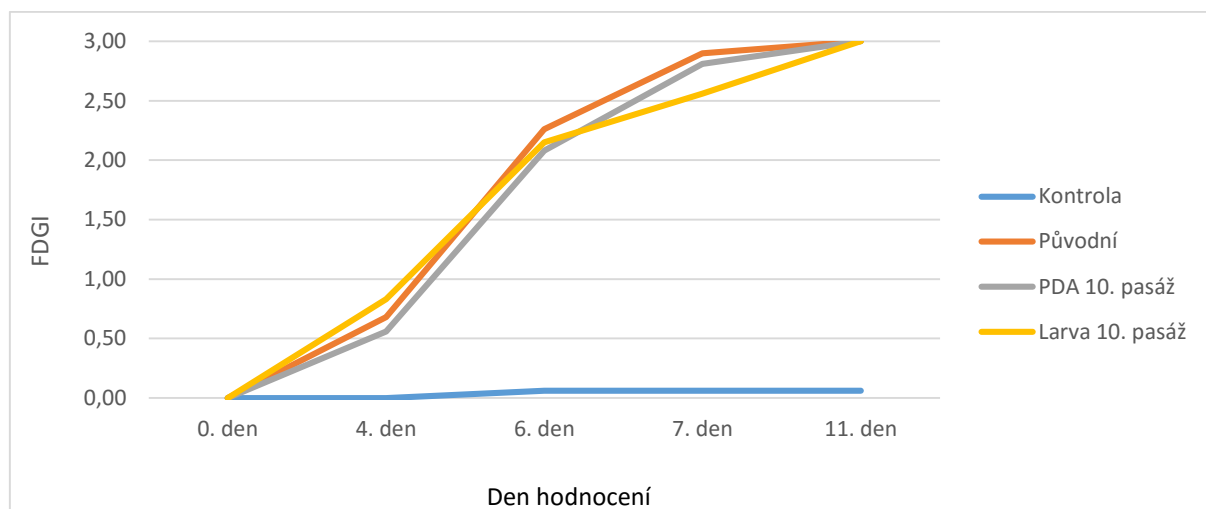


Tabulka 22 - Průměrný index FDGI u původního a pasážovaného kmene MKC 110112 houby *M. anisopliae* přes substrát a larvy *T. molitor* v čase

	4. den	6. den	7. den	11. den
Kontrola	0,00±0,00	0,06±0,13	0,06±0,13	0,06±0,13
Původní	0,68±0,35	2,26±0,45	2,90±0,18	3,00±0,00
PDA 10. p.	0,56±0,43	2,08±0,67	2,81±0,36	3,00±0,00
Larva 10. p.	0,83±0,47	2,15±0,45	2,56±0,35	3,00±0,00

Po 4 dnech byl opět zaznamenán menší index, než je hodnota 1. Nejvíce živých larev v populaci se objevovalo 4. den u původního i pasážovaného kmene MKC 110112 přes PDA. U kmene pasážovaného přes larvy se v populaci 4. den objevovalo nejvíce mrtvých jedinců. Po 6 dnech inkubace se index FDGI pohyboval v rozmezí od 2,08 do 2,26. Po 7 dnech docházelo u všech variant k plné sporulaci kmene. Rozdíl byl zaznamenán u kmene pasážovaného přes PDA, kde byla plná sporulace daleko vyšší než u kmene pasážovaného přes larvy.

Graf 38 - Porovnání indexu FDGI u původního a pasážovaného kmene MKC 110112 houby *M. anisopliae* přes substrát a larvy *T. molitor* v čase



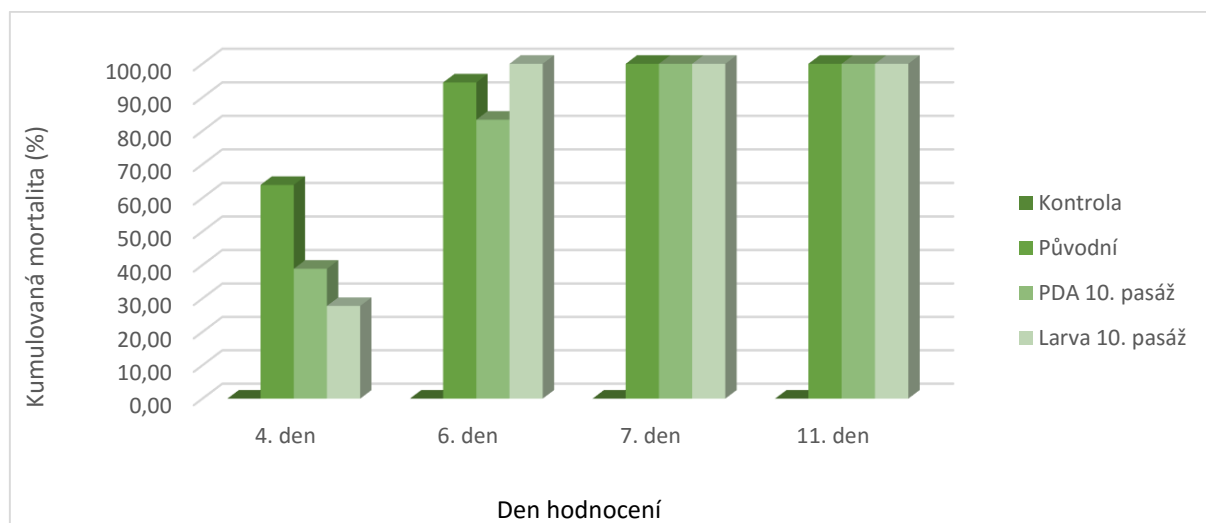
5.6.3 Kumulovaná mortalita a index FDGI na larvách *T. molitor* po ošetření původním a pasážovaným kmenem Man 3B přes substrát a larvy *T. molitor* ve 25 ± 1 °C

Tabulka 23 - Kumulovaná mortalita larev *T. molitor* po ošetření původním a pasážovaným kmenem Man 3B přes substrát a larvy *T. molitor*

	4. den		6. den		7. den		11. den	
	Kumulovaná mortalita	Tukey HSD	Kumulovaná mortalita	Tukey HSD	Kumulovaná mortalita	Tukey HSD	Kumulovaná mortalita	Tukey HSD
Kontrola	0,00±0,00	c	0,00±0,00	c	0,00±0,00	b	0,00±0,00	b
Původní	63,81±14,16	a	94,40±3,93	ab	100,00±0,00	a	100,00±0,00	a
PDA 10. p.	36,07±3,93	b	83,27±11,79	b	100,00±0,00	a	100,00±0,00	a
Larva 10. p.	27,75±3,93	b	100,00±0,00	a	100,00±0,00	a	100,00±0,00	a
	F=43,8504; df=3,8; p=0,0000		F=94,3362; df=3,8; p=0,0000		F=0,0; df=3,8; p=0,0000		F=0,0; df=3,8; p=0,0000	

Původní kmen Man 3B způsobil v populaci larev 4. den téměř 64% mortalitu. U obou variant pasážovaného kmene byla mortalita nižší, 36,07 % u varianty pasáže přes umělou živnou půdu a 27,75 % u kmene pasážovaného přes larvu *T. molitor*. Po 4 dnech byla prokázána statistická odlišnost v testování kmene proti potměníku moučnému $F = 43,8504$; $df=3,8$; $p=0,0000$. Po 6 dnech naopak kmen pasážovaný přes larvy prokázal v populaci 100% mortalitu, zatímco zbylé kmeny způsobil mortality menší o 5 %, resp. o 17 %. Během 7. dne byla zaznamenána již 100% mortalita u všech testovaných variant kmene Man 3B.

Graf 39 - Porovnání kumulované mortality u larev *T. molitor* po ošetření původním a pasážovaným kmenem Man 3B přes substrát a larvy *T. molitor*

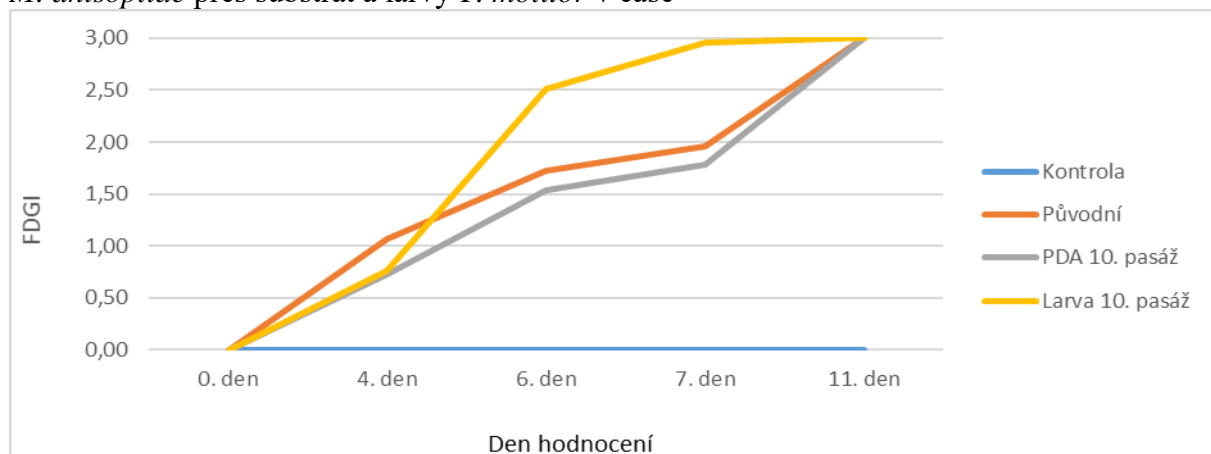


Tabulka 24 - Průměrný index FDGI u původního a pasážovaného kmene Man 3B houby *M. anisopliae* přes substrát a larvy *T. molitor* v čase

	4. den	6. den	7. den	11. den
Kontrola	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Původní	1,07±0,45	1,72±0,46	1,96±0,23	3,00±0,00
PDA 10. p.	0,72±0,55	1,53±0,55	1,78±0,50	3,00±0,00
Larva 10. p.	0,76±0,44	2,51±0,52	2,96±0,11	3,00±0,00

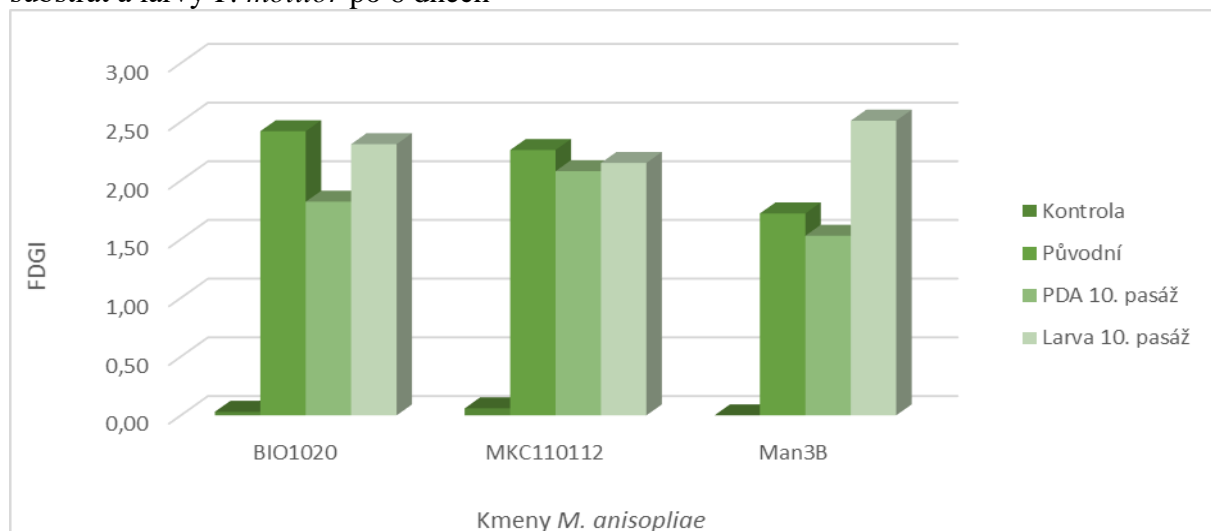
Po 4 dnech byl zaznamenán u původního kmene Man 3B index vyšší než 1, což znamená, že u některých jedinců v populaci byla zaznamenána i zjevná infekce na povrchu těla hostitele. U dalších dvou variant kmene byl index téměř totožný. Po 6 dnech byl zaznamenán daleko rychlejší růst a vývoj u kmene pasážovaného přes larvy *T. molitor*. Index dosahoval hodnoty 2,51, kdy došlo již v tak krátké době k plné sporulaci kmene na povrchu těla hostitele. Tato vlastnost kmene je velmi důležitá v prostředí, protože nově se vytvořené spory mohou dále šířit a způsobovat infekce u dalších jedinců v populaci daného škůdce. Ostatní varianty vykazovaly pouze růst mycelia na povrchu těla hostitele. Ke sporulaci zatím u těchto variant vůbec nedocházelo. Tento jev byl zaznamenán i po 7 dnech hodnocení biotestu.

Graf 40 - Porovnání indexu FDGI u původního a pasážovaného kmene Man 3B houby *M. anisopliae* přes substrát a larvy *T. molitor* v čase



5.6.4 Porovnání účinnosti původních a pasážovaných kmenů *M. anisopliae* na larvách *T. molitor* s ohledem na jejich růst a vývoj po 6 dnech inkubace ve 25±1 °C kultivace

Graf 41 - Porovnání indexu FDGI původních a pasážovaných kmenů houby *M. anisopliae* přes substrát a larvy *T. molitor* po 6 dnech



Porovnání kmenů po 6 dnech hodnocení naznačuje, že pasážování může navýšit vývoj patogena na hostiteli. U kmene Man 3B je tato vlastnost nejprůkaznější. Kdy kmen pasážovaný přes larvu, se daleko rychleji na larvách vyvíjel a tím i způsobil největší mortalitu v populaci. Původní a pasážovaný kmen Man 3B přes PDA ve vývoji zaostával. U kmene BIO 1020 došlo po subkultivaci přes živnou půdu PDA ke ztrátě schopnosti rychleji kolonizovat hostitele, nicméně mortalita byla 100% jako u zbylých dvou variant tohoto kmene. Pomalejší vývoj není žádoucí z důvodu sekundárního šíření infekce v prostředí. U kmene MKC 110112 byly varianty vyrovnané, tj. kmen se vyvíjel přibližně stejně, ať byl či nebyl pasážován.

5.7 Hodnocení účinnosti kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* na dospělých blýskáčka řepkového (*Meligethes aeneus*)

Cílem experimentu bylo zjistit, který kmen entomopatogenní houby *M. anisopliae* nejvíce účinkuje na dospělé *M. aeneus*. Experiment byl hodnocen po dobu 6 dní.

Základní údaje k pokusu

- z kmenů BIO 1020, MKC 110112 a Man 3B byla připravena suspenze o koncentraci $1,00 \times 10^7$ v 1 ml
- připravené suspenze byly nanесeny na 2% agar a rozptýleny inokulační hokejkou po celém povrchu Petriho misky
- následující den se na povrch agaru aplikovali dospělci *M. aeneus* (12 jedinců na misku)
- byla připravena také kontrolní varianta, kdy byli dospělci aplikováni pouze na sterilní 2% agar bez suspenze kmenů
- kontrola a všechny varianty kmenů *M. anisopliae* byly připraveny v 5 opakováních
- Petriho misky byly uloženy do termostatu o 25 ± 1 °C
- hodnocení účinnosti kmenů bylo provedeno 3. 4., 5. a 6. den
- hodnocena byla celková kumulovaná mortalita a poté samostatně natalita, mortalita a infekce jedinců v procentech

5.7.1 Kumulovaná mortalita u dospělců *M. aeneus* po ošetření kmeny entomopatogenní houby *M. anisopliae* ve 25 ± 1 °C kultivace

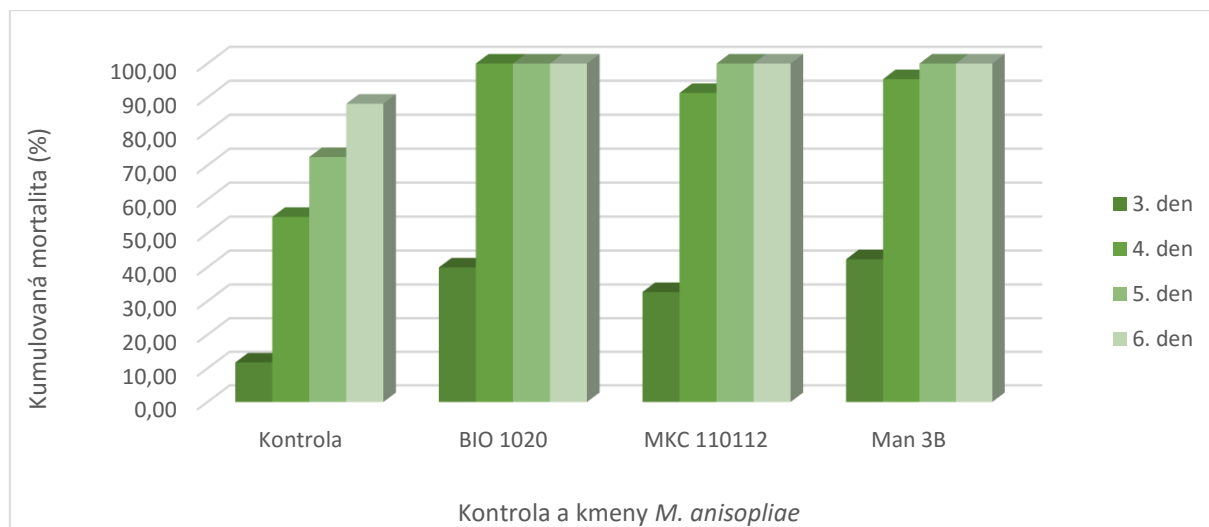
Tabulka 25 - Kumulovaná mortalita u dospělců *M. aeneus*

	3. den	4. den	5. den	6. den
	Kumulovaná mortalita	Kumulovaná mortalita	Kumulovaná mortalita	Kumulovaná mortalita
Kontrola	11,75±8,39	54,83±19,10	72,47±14,33	88,17±10,57
BIO 1020	39,95±11,27	100,00±0,00	100,00±0,00	100,00±0,00
MKC 110112	32,71±10,42	91,33±12,93	100,00±0,00	100,00±0,00
Man 3B	42,37±9,34	95,41±3,53	100,00±0,00	100,00±0,00

Po 3 dnech kultivace se nejvíce v účinnosti proti dospělci *M. aeneus* projevil kmen Man 3B, již po takto krátké době byl schopen usmrtit 42 % jedinců v populaci. Kmen BIO 1020 také prokázal vysokou účinnost, kdy usmrtil téměř 40 % jedinců. Nejnižší účinnost po 3 dnech od vystavení patogena vykazoval kmen MKC 110112. Po 4 dnech od infekce patogena *M. anisopliae* se podařilo kmenu BIO 1020 usmrtit a infikovat 100 % populace dospělců

M. aeneus. Ostatní kmeny se po této době pohybovaly již nad hranicí 90% úmrtnosti jedinců v populaci. Po 5 a 6 dnech kultivace byla zaznamenána u všech kmenů 100% kumulovaná mortalita, po této době se vyskytovali mrtví jedinci i u kontroly. Dospělci *M. aeneus* neměli v kontrolní variantě pravděpodobně vhodné podmínky prostředí. Je možné, že úmrtnost byla způsobena také nedostatkem potravy.

Graf 42 - Porovnání kumulované mortality u dospělců *M. aeneus* po ošetření kmeny entomopatogenní houby *M. anisopliae*



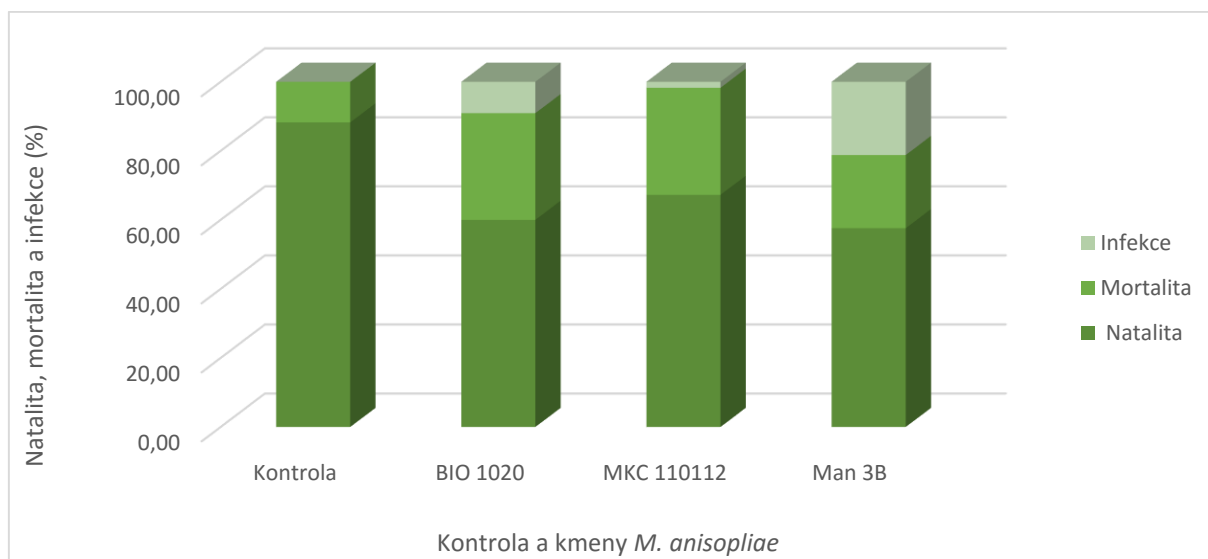
5.7.2 Natalita, mortalita a infekce u dospělců *M. aeneus* po ošetření kmeny entomopatogenní houby *M. anisopliae* ve 25±1 °C kultivace

Tabulka 26 - Účinnost kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* na dospělcích *M. aeneus* po 3 dnech

3. den	Natalita (%)	Mortalita (%)	Infekce (%)
Kontrola	88,24	11,76	0,00
BIO 1020	60,00	30,91	9,09
MKC 110112	67,24	31,03	1,73
Man 3B	57,58	21,21	21,21

Po 3 dnech od infekce kmenů *M. anisopliae* byla relativně vysoká životnost dospělců *M. aeneus* v populaci, nicméně již po této době kultivace se objevili mrtví i infikovaní jedinci. U kmenů BIO 1020 a MKC 110112 se v populaci blýskáček vyskytovala přibližně 31% mortalita a u kmene BIO 1020 se začala rozvíjet v nezanedbatelném množství (9 %) také infekce v populaci. Kmen Man 3B vykazoval silnou účinnost, byl schopen infikovat jedince v populaci ve velké míře (21 %), i po takto krátké době od vystavení patogenem.

Graf 43 - Porovnání účinnosti kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* na dospělého blýskáčka řepkového (*M. aeneus*) po 3 dnech

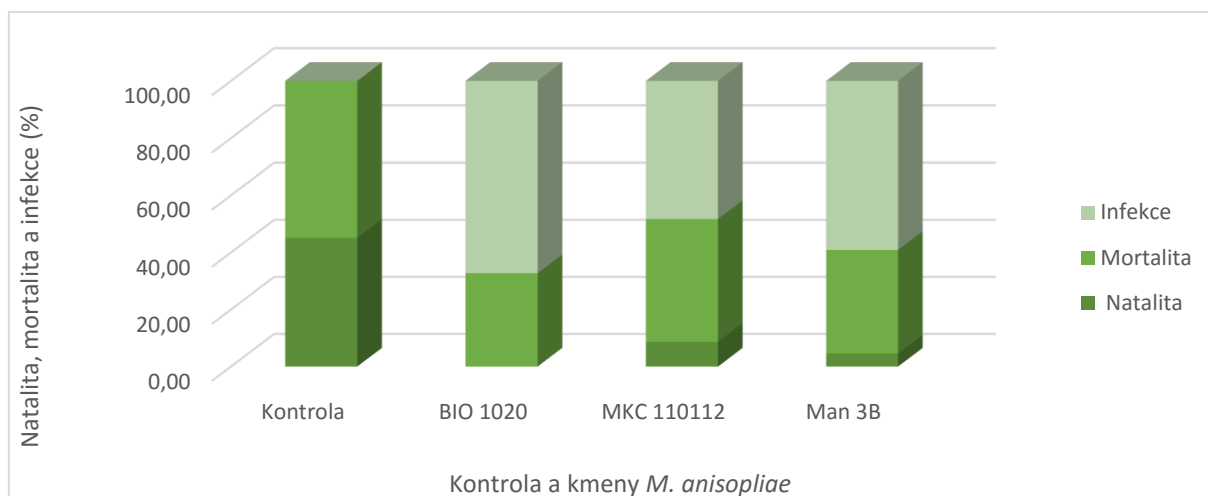


Tabulka 27 - Účinnost kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* na dospělé *M. aeneus* po 4 dnech

4. den	Natalita (%)	Mortalita (%)	Infekce (%)
Kontrola	45,10	54,90	0,00
BIO 1020	0,00	32,73	67,27
MKC 110112	8,62	43,10	48,28
Man 3B	4,55	36,36	59,09

Po 4 dnech hodnocení došlo u kmene BIO 1020 k vysokému nárůstu mrtvých a infikovaných jedinců *M. aeneus*, v populaci se nevyskytovali živí jedinci. Většina dospělců *M. aeneus* v populaci byla tímto kmenem infikovaná a to z 67 %. U kmene Man 3B se stále v populaci vyskytovali živí jedinci, ale infekce postihla 59 % jedinců a mortalita činila 36 %. Kmen Man 3B vykazoval po 4 dnech vysokou účinnost. Nejvíce živých jedinců *M. aeneus* se vyskytovalo u kmene MKC 110112, tento kmen je ve srovnání s ostatními kmeny v účinnosti po 4 dnech kultivace nejslabší.

Graf 44 - Porovnání účinnosti kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* na dospělých blýskáčka řepkového (*M. aeneus*) po 4 dnech

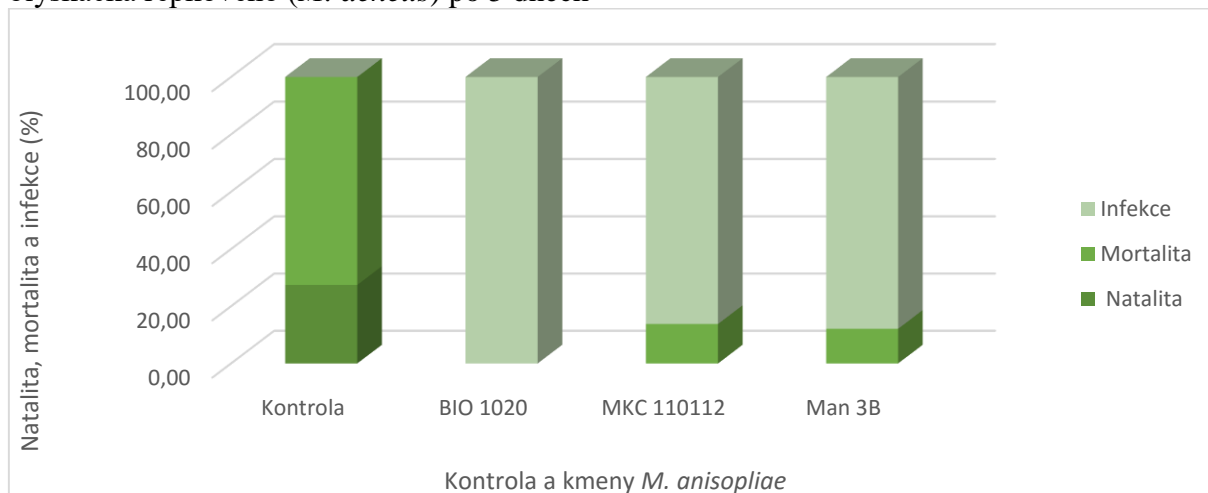


Tabulka 28 - Účinnost kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* na dospělé *M. aeneus* po 5 dnech

5. den	Natalita (%)	Mortalita (%)	Infekce (%)
Kontrola	27,45	72,55	0,00
BIO 1020	0,00	0,00	100,00
MKC 110112	0,00	13,79	86,21
Man 3B	0,00	12,12	87,88

Kmen BIO 1020 po 5 dnech hodnocení vykazoval 100 % účinnost na dospělé *M. aeneus*. Zbylé kmeny MKC 110112 a Man 3B se v účinnosti po této době kultivace téměř nelišily. Mortalita činila u kmene MKC 110112 14 % a u kmene Man 3B 12 %, většina dospělců blýskáčka v populaci byla těmito kmeny infikovaná.

Graf 45 - Porovnání účinnosti kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* na dospělých blýskáčka řepkového (*M. aeneus*) po 5 dnech

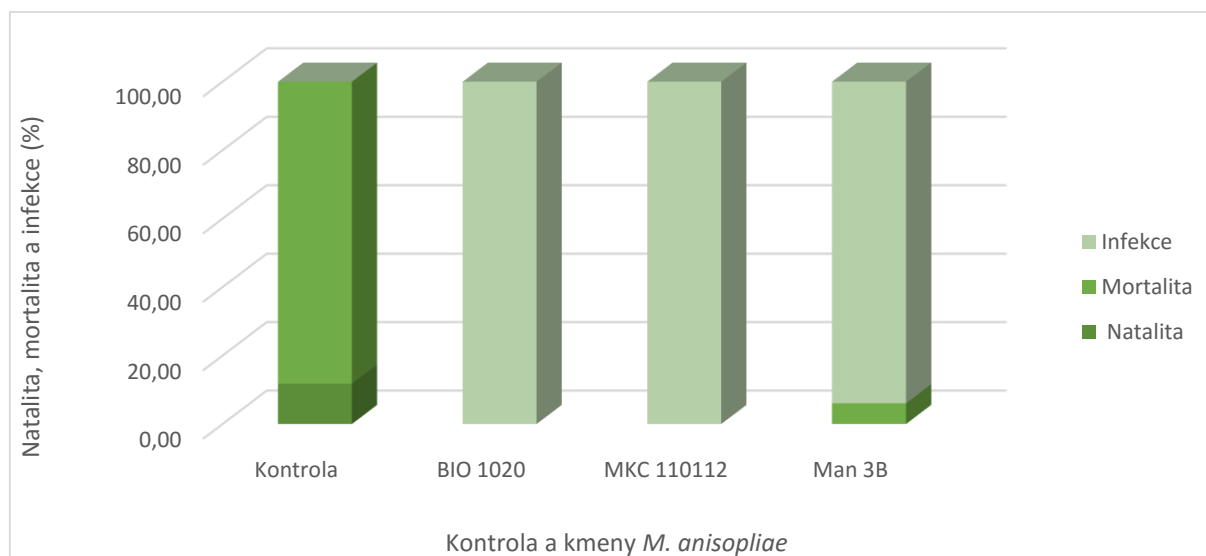


Tabulka 29 - Účinnost kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* na dospělé *M. aeneus* po 6 dnech

6. den	Natalita (%)	Mortalita (%)	Infekce (%)
Kontrola	11,76	88,24	0,00
BIO 1020	0,00	0,00	100,00
MKC 110112	0,00	0,00	100,00
Man 3B	0,00	6,06	93,94

Po 6 dnech hodnocení byla u kmenů BIO 1020 a MKC 110112 pozorována 100 % účinnost na populaci dospělců blýskáčka řepkového. U kmene Man 3B se v populaci *M. aeneus* stále nacházeli v 6 % mrtví neinfikovaní jedinci. Po této době kultivace byl vysoký výskyt mrtvých jedinců *M. aeneus* i u kontrolní varianty, která pravděpodobně neposkytovala vhodné podmínky prostředí.

Graf 46 - Porovnání účinnosti kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* na dospělících blýskáčka řepkového (*M. aeneus*) po 6 dnech



Metodu biotestu je třeba upravit tak, aby poskytovala v kontrolní variantě vhodné podmínky prostředí. Dospělci *M. aeneus* jsou velmi citliví na změny jejich přirozeného prostředí. Je pravděpodobné, že vysoká úmrtnost v kontrolní variantě byla způsobena nedostatkem potravy. Nicméně, i tak byla pozorována vysoká účinnost kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* na tyto škůdce.

5.8 Hodnocení účinnosti kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* na dospělých krytonosce šesulového (*Ceutorhynchus obstrictus*)

Cílem experimentu bylo zjistit, který kmen entomopatogenní houby *M. anisopliae* nejvíce účinkuje na dospělé *C. obstrictus*. Experiment byl hodnocen po dobu 6 dní.

Základní údaje k pokusu

- z kmenů BIO 1020, MKC 110112 a Man 3B byla připravena suspenze o koncentraci $1,00 \times 10^7$ v 1 ml
- připravené suspenze byly nanесeny na 2% agar a rozptýleny inokulační hokejkou po celém povrchu Petriho misky
- následující den se na povrch agaru aplikovali dospělci *C. obstrictus* (7 jedinců na misku)
- byla připravena také kontrolní varianta, kdy byli dospělci aplikováni pouze na sterilní 2% agar bez suspenze kmenů
- kontrola a všechny varianty kmenů *M. anisopliae* byly připraveny v 5 opakováních
- Petriho misky byly uloženy do termostatu o 25 ± 1 °C
- hodnocení účinnosti kmenů bylo provedeno 5. a 6. den
- hodnocena byla celková kumulovaná mortalita a poté samostatně natalita, mortalita a infekce jedinců v procentech

5.8.1 Kumulovaná mortalita u dospělců *C. obstrictus* po ošetření kmeny entomopatogenní houby *M. anisopliae* ve 25 ± 1 °C kultivace

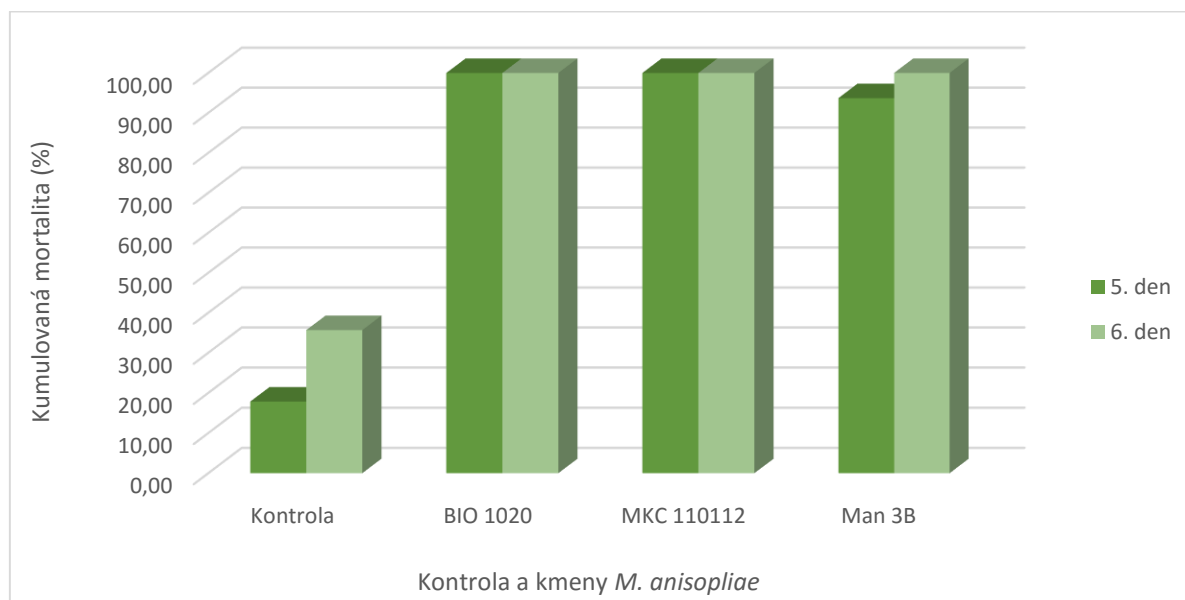
Tabulka 30 - Kumulovaná mortalita u dospělců *C. obstrictus*

	5. den	6. den
	Kumulovaná mortalita	Kumulovaná mortalita
Kontrola	17,84 \pm 1,63	35,67 \pm 4,68
BIO 1020	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00
MKC 110112	100,00 \pm 0,00	100,00 \pm 0,00
Man 3B	93,70 \pm 7,26	100,00 \pm 0,00

Kmeny BIO 1020 a MKC 110112 po 5 a 6 dnech hodnocení vykazovaly 100% kumulovanou mortalitu v populaci dospělců krytonosce šesulového. Nejnižší účinnost ve srovnání s těmito dvěma kmeny měl kmen Man 3B, nicméně kumulovaná mortalita činila

94 %. Všechny kmeny vykazovaly vysokou účinnost proti škůdci *C. obstrictus*. V kontrole byla zaznamenána též vysoká kumulovaná mortalita, což mohlo být způsobeno nedostatkem potravy nebo nevhodnými podmínkami biotestu.

Graf 47 - Porovnání kumulované mortality u dospělců *C. obstrictus* po ošetření kmeny entomopatogenní houby *M. anisopliae*



5.8.2 Natalita, mortalita a infekce u dospělců *C. obstrictus* po ošetření kmeny entomopatogenní houby *M. anisopliae* ve 25±1 °C kultivace

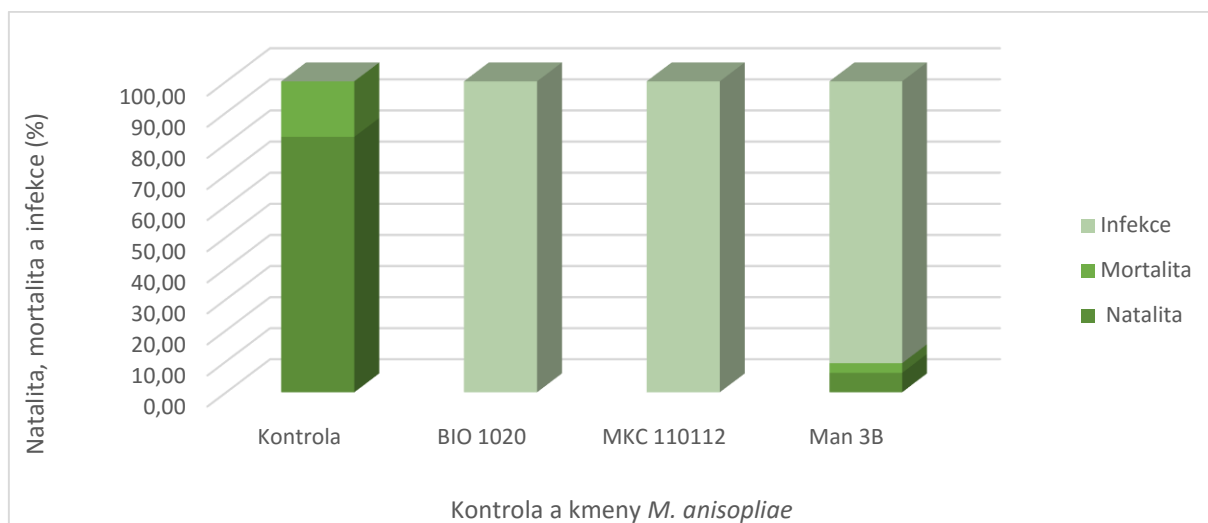
Tabulka 31 - Účinnost kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* na dospělých *C. obstrictus* po 5 dnech

5. den	Natalita (%)	Mortalita (%)	Infekce (%)
Kontrola	82,14	17,86	0,00
BIO 1020	0,00	0,00	100,00
MKC 110112	0,00	0,00	100,00
Man 3B	6,24	3,13	90,63

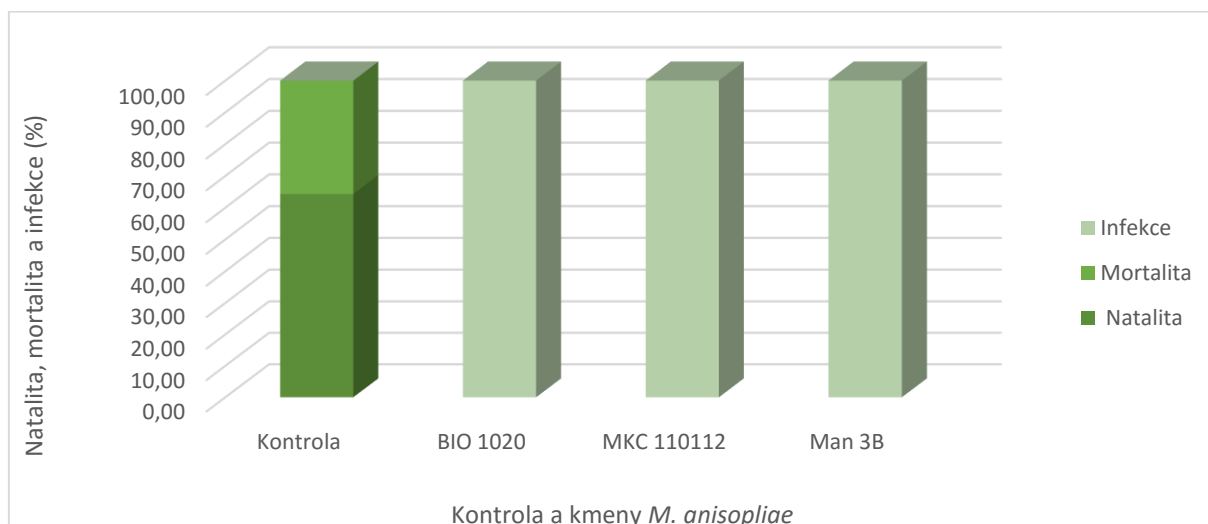
Tabulka 32 - Účinnost kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* na dospělých *C. obstrictus* po 6 dnech

6. den	Natalita (%)	Mortalita (%)	Infekce (%)
Kontrola	64,29	35,71	0,00
BIO 1020	0,00	0,00	100,00
MKC 110112	0,00	0,00	100,00
Man 3B	0,00	0,00	100,00

Graf 48 - Porovnání účinnosti kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* na dospělých *C. obstrictus* po 5 dnech



Graf 49 - Porovnání účinnosti kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae* na dospělých *C. obstrictus* po 6 dnech



Po 5 dnech kultivace měly nejvyšší účinnost kmeny BIO 1020 a MKC 110112, které infikovaly 100 % populace dospělců *C. obstrictus*. U kmene Man 3B se v populaci stále vyskytovali živí jedinci v 6 %, ale infekce byla již také velmi rozsáhlá (91 %). Po 6 dnech již všechny kmeny infikovaly 100 % populace. Kmeny vykazovaly velmi vysokou účinnost proti tomuto škůdci.

Opět zde byla zaznamenána vysoká úmrtnost jedinců v kontrolní variantě jako u dospělců *M. aeneus*. Je potřeba upravit metodu biotestu, tak aby jedinci v kontrolní variantě bez problémů prospívali. Nicméně je opět zřejmé, že kmeny entomopatogenní houby *M. anisopliae* jsou účinné proti těmto škůdcům.

5.9 Vliv ošetření na růst a vývoj entomopatogenních hub na vajíčkách mandelinky bramborové (*L. decemlineata*) pomocí biotestu FDGI

Cílem experimentu bylo zjistit, který druh entomopatogenní houby nejvíce účinkuje na vajíčka *L. decemlineata*. Experiment byl hodnocen po dobu 4 dní.

Základní údaje k pokusu

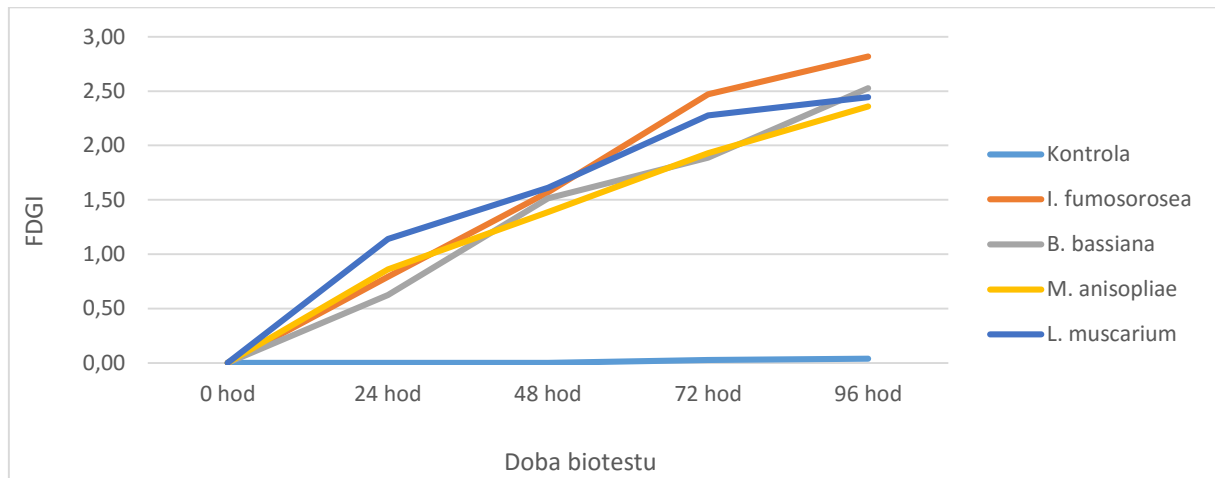
- použity entomopatogenní houby *M. anisopliae* kmen F52, *B. bassiana* kmen I101, *I. fumosorosea* kmen PFR 97 a *L. muscarium* kmen I9.
- z kmenů byla vytvořena suspenze o koncentraci $1,00 \times 10^7$ v 1 ml
- na podložní sklíčka pro každý kmen byla nanášena připravená suspenze ve formě 18 kapek
- do 16 kapek byly nanášeny pomocí speciálně upravené jehly vajíčka *L. decemlineata*
- zbylé 2 kapky byly ponechány jako kontrolní varianty.
- po zaschnutí suspenze s vajíčky, bylo podložní sklíčko vloženo do vlhké komůrky
- pro každý kmen byly připraveny 2 opakování.
- hodnocení bylo provedeno po 24, 48, 72 a 96 hodinách pomocí optického mikroskopu
- každému vajíčku byl přiřazen příslušný index a průběh vývoje patogena (FDGI)

5.9.1 Hodnocení účinnosti entomopatogenních hub na vajíčkách *L. decemlineata* pomocí stupnice FDGI ve 25 ± 1 °C kultivace

Tabulka 33 - Účinnost entomopatogenních hub na vajíčkách mandelinky bramborové

	Kontrola	<i>I. fumosorosea</i>	<i>B. bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>	<i>L. muscarium</i>
24 hod	0,00±0,00	0,79±0,27	0,63±0,26	0,86±0,31	1,14±0,20
48 hod	0,00±0,00	1,57±0,17	1,51±0,21	1,39±0,24	1,61±0,20
72 hod	0,03±0,00	2,47±0,33	1,89±0,28	1,93±0,38	2,28±0,18
96 hod	0,04±0,00	2,82±0,33	2,53±0,33	2,36±0,22	2,44±0,16

Graf 50 - Hodnocení vlivu entomopatogenních hub na vajíčka mandelinky bramborové pomocí biotestu FDGI



Během biotestu FDGI vykazovaly všechny testované druhy hub vysokou účinnost proti vajíčkám mandelinky bramborové. Nejlepší vývoj patogena na vajíčkách měl kmen PFR 97 entomopatogenní houby *I. fumosorosea*. Tento patogen vykázal plnou sporulaci na vajíčkách již po 72 hodinách. Entomopatogenní houba *L. muscarium* měla o něco pomalejší vývoj, nicméně ani po 96 hodinách nedošlo k plné sporulaci na povrchu vajíček. Entomopatogenní houba *B. bassiana* kmen Bba I 101 a *M. anisopliae* kmen BIO 1020 měly prakticky identický průběh, ani u těchto dvou kmenů nedošlo po 96 hodinách biotestu k úplné sporulaci na povrchu vajíček. V kontrolní variantě byla vajíčka zdravá a probíhal v nich vývoj larev.

6. DISKUZE

Studium entomopatogenních hub nabývá v současné době stále většího významu. Velmi často bývají využívány v biologické ochraně rostlin k potlačení výskytu celé řady druhů významných škůdců. Biopreparáty na bázi entomopatogenní houby *M. anisopliae* jsou ve velkém měřítku aplikovány v zemích Jižní Ameriky (BIO-Blast), Africe, Francii a Velké Británii (Green Muscle[®]), Německu (Met52), Austrálii (BioCane) a ve Švýcarsku (Metarhizium Schweizer). Faria a Wraight (2007) ve své práci uvádějí, že procentuální podíl biopreparátů na bázi *M. anisopliae* ze všech 171 využívaných přípravků na bázi entomopatogenních hub ve světě tvoří až 33,9 %. V České republice byly preparáty na bázi *M. anisopliae* testovány, nicméně žádné z nich bohužel nejsou doposud u nás registrovány.

Optimální teplota pro většinu entomopatogenních hub se pohybuje v rozmezí mezi 20 a 25 °C (Inglis *et al.* 2001). Ve studii zaměřené na vliv teploty na růst a vývoj kmenů entomopatogenních houby *M. anisopliae* vyšlo, že neoptimálnější teplota je u nich stanovena na 20 °C, 25 °C a 30 °C. Dané rozmezí teplot bylo jako neoptimálnější zjištěno jak u původních kmenů, tak i u pasážovaných variant kmenů přes dospělce *T. molitor*. Srovnatelné výsledky byly zaznamenány v různých studiích. Bidochka *et al.* (2001), prováděl výzkum s 83 kmeny *M. anisopliae* a zjistil, že kmeny vykazují růst a vývoj v širokém rozmezí teplot od 8 do 37 °C. Podle studie Fargues *et al.* (1997b) byla u 4 izolátů *M. anisopliae* var. *acridum* zaznamenána jako nejvhodnější teplota vývoje v rozmezí od 25 do 30 °C. Studie Kotwal *et al.* (2012), také prokázala nejvhodnější teplotu pro růst a vývoj *M. anisopliae* při 25 °C.

Virulence entomopatogenních hub může být ovlivněna opakovanou subkultivací přes umělá živná média nebo přes hmyzí hostitele. Stabilita virulence u entomopatogenních hub je nezbytná vlastnost pro výrobu biopreparátů (Mohammadbeigi 2013). V naší práci bylo provedeno 10 cyklů kontinuálních pasáží přes živné médium (PDA), živné substráty (ovesné vločky) a vývojová stádia (larva, kukla, dospělec) hostitele *T. molitor*. Snížení nebo zvýšení virulence entomopatogenních hub po opakovaných subkultivacích byly pozorovány v celé řadě studií (Fargues, Robert 1983; Schaerffenberg 1964; Kawakami 1960). Butt *et al.* (2006) uvedl, že virulenci lze zvýšit i po dvou kontinuálních pasážích přes hmyzího hostitele. Zajímavé jsou také práce týkající se houby *M. anisopliae*, kde k výraznému navýšení virulence došlo již po první pasáži (Fargues, Robert 1983; Daoust, Roberts 1982). Na druhou stranu některé studie uvádějí, že subkultivace přes umělá živná média způsobují útlum ve virulenci (Quesada-Moraga, Vey 2003; Fransen *et al.* 1987; Schaerffenberg 1964). Vliv na virulenci může mít i poměr uhlíku a dusíku (C:N) v používaném médiu (Mohammadbeigi 2013). Shah *et al.* (2005)

ve své studii potvrzuje, že houba *M. anisopliae* ztratila po subkultivaci na médiu s vysokým poměrem C:N svou virulenci proti *Galleria mellonella* a *T. molitor*. Obecně platí, že na umělém médiu s ideálními výživovými podmínkami entomopatogenní houby postupně degenerují, ztrácí svoji virulenci, popřípadě mohou měnit i fenotyp. Tento jev je daný tím, že houby mají optimální podmínky nejen prostředí, ale i vyvážené nutriční zdroje a nejsou negativně ovlivňovány nepříznivými podmínkami. Naopak, ve stresových podmínkách může být virulence entomopatogenních hub posílena (Mohammadbeigi 2013). V naší práci byla metoda kontinuálního pasážování přes živého hostitele *T. molitor* velmi úspěšná u kmene Man 3B, kdy došlo k výraznému navýšení virulence na larvách *T. molitor*. Naopak, virulence u pasážované varianty kmene Man 3B přes živné médium PDA se snížila. Pasážovaný kmen přes tento substrát vykázal po aplikaci daleko nižší účinnost na larvy potemníka moučného. Výsledek odpovídá výsledkům výše uvedených studií. U kmenů BIO 1020 a MKC 110112 neměla metoda kontinuálního pasážování téměř žádný vliv na virulenci, nebyly patrné rozdíly ve virulenci vůči larvám *T. molitor* mezi původními a pasážovanými variantami přes živné médium a hostitele *T. molitor*. Tomuto výsledku odpovídají i další studie (Mohammadbeigi 2013; Ansari, Butt 2011; Brownbridge *et al.* 2001; Vandenberg, Cantone 2004), které uvádějí, že nedošlo k žádnému poklesu ve virulenci u hub subkultivovaných na umělých živných médiích.

V rámci diplomové práce byly zkoumány pasážované varianty také v *in vitro* testech, kdy se hodnotil růst a produkce spor. Z výsledků je patrné, že došlo po desátých pasážích ke změnám ve fenotypu středových kultur, které byly zdokumentovány. Kontinuální pasážování mělo výrazný vliv na produkci konidií. U některých pasážovaných variant došlo k méně intenzivní pigmentaci spor. Ztráta pigmentace spor byla patrná zejména u pasážované varianty kmene BIO 1020 přes dospělce potemníka moučného. Ze středové kultury bylo získáno výrazně menší množství konidií, než z ostatních variant pasážování nebo z původních kmenů. Pravděpodobně ke snížení produkce došlo v důsledku fyziologické změny pasážovaného kmene. U pasážovaných kmenů může dojít ke změně fenotypu, jako je barva, růst a tvar kolonií (Safavi 2012; Song, Feng 2010). Podle Butt *et al.* (2006) může dojít pasážováním pravděpodobně i ke snížení schopnosti produkovat v dostatečné míře kutikulu degradující enzymy, což se projevuje ztrátou pigmentace a snížením produkce spor. V důsledku pak pasážovaným kmenům přes dospělce zabere více času dokončit vývojový cyklus. U této pasážované varianty nebyla hodnocena virulence na larvách *T. molitor*, nicméně lze předpokládat, že virulence bude pravděpodobně u této kultury velmi nízká. Santoro *et al.* (2014) upozorňuje na to, že může docházet po pasážování k méně virulentní nebo avirulentní formě,

což může být způsobeno změnou genotypu daného kmene. U ostatních kontinuálně pasážovaných variant nedošlo k výraznému snížení produkce spor.

Aby bylo možné komerčně vyrábět entomopatogenní houby, musí být masová produkce spor realizována na přirozeném substrátu nebo na umělém živném médiu. Z výsledků je však patrné, že v některých situacích může dojít při produkci na umělém médiu ke ztrátě schopnosti produkovat větší množství spor, nebo ke ztrátě virulence. Před komerčním využitím konkrétního kmene houby musí být zjišťována jeho účinnost na vybraných hostitelích. Zejména tehdy, je-li kmen udržován po delší dobu na umělých živných půdách. Aby se zabránilo těmto negativním jevům, jsou zakládány z původního inokula tzv. matečné kultury, které jsou udržovány v nízkých teplotách. Nejdůležitějším krokem je i v masové produkci hub vybrat vhodnou metodu a zaměřit se na její optimalizaci, aby nedošlo ke snížení virulence u entomopatogenních hub (Mohammadbeigi 2013). Virulenci lze obnovit nebo i navýšit právě pasážováním přes konkrétního živého hostitele. Podle Adames *et al.* (2011) opakované pasáže přes vhodného hostitele můžou učinit lepší přilnavost konidií a vyšší rychlost klíčení na počátku vývoje houby, která způsobuje následně rychlejší invazi do těla hostitele. Celkově lze říci, že konidie vyprodukované sekundárně na mrtvém hmyzím těle mají vyšší virulenci než konidie produkované v *in vitro* systémech. Nicméně, produkce konidií v *in vivo* systémech pomocí kontinuálního pasážování přes hmyzí hostitele je nepravděpodobná, protože by stouply výrazně náklady na produkci spor a to by bylo ekonomicky neúnosné. Přesto při zjištění snížení virulence doporučuji, alespoň jednou provést kontinuální pasáž přes vhodného hmyzího hostitele.

Poslední část této práce se zabývala účinností kmenů *M. anisopliae* proti vybraným zemědělsky významným škůdcům. Pokusy prováděné na dospělcih blýskáčka řepkového (*Meligethes aeneus*) prokázaly, že kmeny *M. anisopliae* byly vysoce virulentní vůči tomuto škůdci. Vysoká mortalita byla pozorována ale i v kontrolní variantě, což značí o nepříznivých podmínkách prostředí v Petriho miskách. Vysoká mortalita u dospělcih v kontrolní variantě byla pozorována až po delší době trvání biotestu. Pro další testování účinnosti kmenů na blýskáčka bude nutné metodu biotestu propracovat, tak aby byly zajištěny vhodné podmínky pro dospělce v kontrolní variantě. Nejúčinnější byl kmen BIO 1020, kdy byli dospělci usmrceni a infikováni již po 4 dnech, ostatní kmeny dosáhly 100% kumulované mortality až po 5 dnech. Podobné výsledky uvádí i studie Husberg a Hokkanen (2001), kdy virulence entomopatogenní houby *M. anisopliae* proti dospělcih *M. aeneus*, dosahovala po 5 dnech 85 %. V diplomové práci bylo vypořádováno, že infikováni jedinci blýskáčka řepkového zůstali strnulí a měli roztažené končetiny, oproti jedincům v kontrolní variantě. U dospělcih krytonosce šesšulového

(*Ceutorhynchus obstrictus*) se tento fenomén též objevoval. Strnulí jedinci s roztaženými nohama byli popsáni také ve studii Husberg a Hokkanen (2001) u dospělců *M. aeneus*, a ve studii Moorhouse *et al.* (1993), která byla zaměřena na účinnost houby *M. anisopliae* proti larvám lalokonosce rýhovaného (*Otiorhynchus sulcatus*). Výsledky ukazují, že entomopatogenní houba *M. anisopliae* je vysoce účinná proti výše uvedených hmyzím škůdcům. Hodnocení vlivu entomopatogenních hub na vajíčkách mandelinky bramborové potvrdilo vysokou účinnost. Nejlepší výsledky vykazovala entomopatogenní houba *I. fumosorosea* kmen PFR 97, která byla schopna dokončit celý svůj vývojový cyklus na vajíčkách za pouhé 3 dny. Studie od ostatních autorů potvrzují účinnost entomopatogenních hub na tomto škůdci ale většinou se zaměřují na buď na larvy nebo na dospělé *L. decemlineata* (Wraight, Ramos 2015; Kryukov *et al.* 2009; Klinger *et al.* 2006; Wraight, Ramos 2002).

7. ZÁVĚRY

1. Optimální teplota pro růst a vývoj původních testovaných kmenů BIO 1020 a MKC 110 112 houby *Metarhizium anisopliae* byla 20 °C až 25 °C. Kmen Man 3B se projevil jako teplomilnější, optimální teplota byla 25°C až 30 °C. Při kultivaci kmenů v 10 °C byl zaznamenán značně pomalý růst a vývoj.
2. Kmeny *M. anisopliae* byly kontinuálně pasážovány přes živné médium PDA, živné substráty (ovesné vločky) a vývojová stádia (larva, kukla, dospělec) potemníka moučného (*Tenebrio molitor*). Bylo provedeno celkem 10 cyklů kontinuálních pasáží.
3. Metoda kontinuálního pasážování byla v růstu a produkci spor (testy *in vitro*) nejvíce účinná u kmenů BIO 1020 a Man 3B.
4. Laboratorní biotest prokázal, že metoda kontinuálního pasážování zvýšila virulenci u kmene Man 3B, u ostatních kmenů nebyly ve virulenci zaznamenány zásadní rozdíly mezi původními a pasážovanými variantami.
5. *In vivo* testy provedené na dospělých blýskáčka řepkového (*Meligethes aeneus*) prokázaly, že nejúčinnější byl kmen BIO 1020. Jedinci v populaci byli usmrceni a infikováni již po 4 dnech. Testy na dospělých krytonosce šešulového (*Ceutorhynchus obstrictus*), vykazaly obdobné výsledky.
6. Na vajíčkách mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*) byly účinné všechny druhy entomopatogenních hub.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adames M., Fernández-Ruvalcaba M., Peña-Chora G., Hernández-Velázquez V.M. (2011): Effects of passages through a suitable host of the fungus, *Metarhizium anisopliae*, on the virulence of acaricidesusceptible and resistant strains of the tick, *Rhipicephalus microplus*. *Journal of Insect Science*, 11: 1-13.
- Anonym I: Dostupné na https://www.hummert.com/_uploads/01-2790eaac.jpg. Online 29. 03. 2016.
- Ansari M.A., Butt T.M. (2011): Effects of successive subculturing on stability, virulence, conidial yield, germination and shelf-life of entomopathogenic fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 110: 1460-1469.
- Arthurs S., Thomas M.B. (2001): Effects of temperature and relative humidity on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in mycosed cadavers of *Schistocerca gregaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78: 59-65.
- Augustyniuk-Kram A., Kram K.J. (2012): Entomopathogenic Fungi as an Important Natural Regulator of Insect Outbreaks in Forests (Review). In: Forest Ecosystems - More than Just Trees, Dr Juan A. Blanco (Ed.), ISBN: 978-953-51-0202-1.
- Bailey A., Chandler D., Grant W.P., Greaves J., Prince G., Tatchell M. (2010): Biopesticides: pest management and regulation. *CAB International, Wallingford, UK*, 88-90.
- Behie S.W, Bidochka M.J (2014): Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: an additional branch of the soil nitrogen cycle. *Applied and Environmental Microbiology*, 80:1553–1560.
- Bidochka M.J., Kamp A.M., Lavender T.M., Dekoning J., De Croos J.N.A. (2001): Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3): 1335-1342.
- Bischoff J.F., Rehner S.A., Humber R.A. (2009): A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* 101: 512-530.
- Brownbridge M., Costa S., Jaronski S.T. (2001): Effects of *in vitro* passage of *Beauveria bassiana* on virulence to *Bemisia argentifolii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 77: 280-283.
- Butt T.M., Wang C., Shah F.A., Hall R. (2006): Degeneration of entomogenous fungi. In: Eilenberg J., Hokkanen H.M.T. (Eds.): An ecological and societal approach to biological control. *Springer*, 213-226.
- Butt T. M., Goettel M. S., Papierok B. (1999): Directory of specialists involved in the development of fungi as biocontrol agents. *Colin Butt Design & Print, Warley, West Midlands*, 48 p.
- Clarkson J.M., Charnley, A.K. (1996): New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology*, 4: 197-203.
- Daoust R.A., Roberts D.W. (1982): Virulence of natural and insect passaged strains of *Metarhizium anisopliae* to mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 40: 107-117.
- Driver F., Milner R.J., Trueman J.W.H. (2000): A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Reserch*, 104: 134-150.
- Eilenberg J., Hajek A., Lomer C. (2001): Suggestions for unifying the terminology in biological control. *Biocontrol*, 46: 387-400.

- 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.
- Fargues J., Ouedraogo A., Goettel M.S., Lomer C.J. (1997b): Effects of temperature, humidity and inoculation method on susceptibility of *Schistocerca gregaria* to *Metarhizium flavoviride*. *Biocontrol Science and Technology*, 7: 345–356.
- Fargues J.F., Robert P.H. (1983): Effect of passaging through scarabaeid hosts on the virulence and host specificity of two strains of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 29: 575-583.
- Fransen J.J. (1990): Natural enemies of whiteflies - Fungi, In: Gerling D. (Ed.): Whiteflies: their bionomics, pest status and management. *Athenaeum Press, Newcastle upon Tyne*, 187- 209.
- Fransen J.J., Winkelman K., Van Lenteren J.C. (1987): The Differential Mortality at Various Life Stages of the Greenhouse Whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae), by Infection with the Fungus *Aschersonia aleyrodis* (Deuteromycotina: Coelomycetes). *Journal of Invertebrate Pathology*, 50: 158-165.
- Garza-Hernández J.A., Reyes-Villanueva F., Russell T.L., Braks M.A.H., Garcia-Munguia A.M., Rodríguez-Pérez M.A. (2015): Copulation activity, sperm production and conidia transfer in *Aedes aegypti* males contaminated by *Metarhizium anisopliae*: A biological control prospect. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(10): e0004144. doi: 10.1371/journal.pntd.0004144.
- Goettel M.S., Inglis G.D. (1997): Fungi: Hyphomycetes. In: Lacey L. (Ed.): Manual of techniques in insect pathology. *Academic press, San Diego, USA*, 213-249.
- Gul H.T., Saeed S., Khan F.Z.A. (2014): Entomopathogenic Fungi as Effective Insect Pest Management Tactic: A Review. *Applied Sciences and Business Economics*, 1(1): 10-18.
- Hajek A. (2004): Natural enemies: an introduction to biological control. *Cambridge university press, UK*, 378 p.
- Hoffmann M.P., Frodsham A.C. (1993) Natural enemies of vegetable insect pests. *Cooperative Extension, Cornell University, Ithaca, NY*, 63 p.
- Hofmanová D. (2003): Predátoři a parazitoidi v ochraně rostlin. Úroda. Dostupné na <http://uroda.cz/predatori-a-parazitoidi-v-ochrane-rostlin/>. Online 18. 02. 2016.
- Honěk A., Lukáš J., Martinková Z., Pultar O., Řezáč M. (2008): Význam predátorů a parazitoidů v integrovaných systémech ochrany rostlin. *Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha-Ruzyně*, 64 p.
- Husberg G.B, Hokkanen H.M.T. (2001): Effects of *Metarhizium anisopliae* on the pollen beetle *Meligethes aeneus* and its parasitoids *Phradismorionellus* and *Diospilus capito*. *BioControl*, 46: 261-273.
- Hussain A., Tian M.Y., He Y.R., Ruan L., Ahmed S. (2010): *In vitro* and *in vivo* culturing impacts on the virulence characteristics of serially passed entomopathogenic fungi. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 8(3&4) : 481-487 .
- Hýsek J., Vach M. (2015): Biopreparáty určené proti škodlivým makroorganismům. *Úroda*, 2: 37- 38.
- Hýsek J., Vach M. (2014): Nové biopreparáty a jejich účinek. *Úroda*, 12: 66-68.
- Inglis G.D., Goettel M.S., Butt T.M., Strasser H. (2001): Use of hyphomycetes fungi for managing insect pests. In: Butt T.M., Jackson C., Magan N. (Eds): Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. *CAB International, Wallingford, UK*, 23-69.

- Jackson M.A., Dunlap Ch.A., Jaronski S.T. (2010): Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioControl*, 55(1): 129- 145.
- Kalina T., Váňa J. (2005): Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. *Karolinum, Praha*, 229-236.
- Kawakami K. (1960): On the change of characteristics of the silkworm muscardines through successive cultures. *Bulletin of the Sericultural Experiment Station, Japan*, 16: 83-99.
- Klinger E., Groden E., Drummond F. (2006): *Beauveria bassiana* horizontal infection between cadavers and adults of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Environmental entomology*, 35(4): 992-1000.
- Kocourek F. (2013a): Uplatňování systému integrované ochrany rostlin v souvislosti se změnou legislativy (15). Rizika a přínosy pesticidů – poučení z historie používání zoocidů. *Agromanuál*, 8: 50-55.
- Kocourek F. (2013b): Uplatňování systému integrované ochrany rostlin v souvislosti se změnou legislativy (17). Vliv pesticidů na necílové organismy – na přirozené nepřátele škůdců. *Agromanuál*, 11-12: 33-36.
- Kotwal S., Parate R.L., Mane S.S., Deshmukh V.V. (2012): Influence of nutrition and different physical parameters on growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae*. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 1(5): 479-484.
- Kryukov V.Y., Khodyrev V.P., Yaroslavtseva O.N., Kamenova A.S., Duisembekov B.A., Glupov V.V. (2009): Synergistic action of entomopathogenic hyphomycetes and the bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. *morrisoni* in the infection of Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. *Biochemistry and microbiology*, 45(5): 511-516.
- Kůdela V., Bartoš P., Čača Z., Dirlbek J., Frič F., Lebeda A., Šebesta J., Ulrychová M., Valášková E., Veselý D. (1989): Obecná fytopatologie. *Academia, Praha*, 388 p.
- Lacey L.A., Georgis R. (2012): Entomopathogenic nematodes for control of insect pests above and below ground with comments on commercial production. *Journal of Nematology*, 44(2): 218-225.
- Landa Z., Bohatá A., Kalista M. (2008): Záměrné využívání autochtonních kmenů vybraných druhů entomopatogenních hub. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, zemědělská fakulta*, 47 p.
- Landa Z. (2002): Biologická ochrana zahradních rostlin proti chorobám a škůdcům v polních podmínkách, ve sklenících a fóliovnících. In: Demo M., Hričovský I. (Eds.): Trvalo udržatelné technologie v záhradnictve. *Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre*, 225-280.
- Landa Z. (1994): Entomopatogenní houby v biologické ochraně rostlin (habilitační práce). *ZF JU, České Budějovice*, 14-50.
- Lazarovits G., Goettel M.S., Vincent Ch. (2007): Adventures in Biocontrol. In: Vincent Ch., Goettel M.S., Lazarovits G. (Eds.): Biological Control: a global perspective. *CAB International, Wallingfort*, 1-6.
- Liu Z.Y., Liang Z.Q., Whalley A.J.S., Yao Y.J., Liu A.Y. (2001): *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78: 178-182.
- Lovett B., St. Leger R.J. (2015): Stress is the rule rather than the exception for *Metarhizium*. *Current Genetics*, 61: 253-261.

- Ministerstvo zemědělství (2014): Integrovaná ochrana rostlin z pohledu ústředního úřadu pro ochranu rostlin. Dostupné na http://eagri.cz/public/web/file/308545/stanovisko_MZE_k_IOR___kveten_2014.pdf. Online 18. 02. 2016.
- Mohammadbeigi A. (2013): Virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) passaged through artificial media and an insect host *Uvarovistia zebra* (Orthoptera: Tettigoniidae). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 6(16): 1147-1152.
- Moorhouse E., Gillespie A., Charnley A. (1993): Laboratory selection of *Metarhizium* spp.: Isolates for control of vine weevil larvae (*Otiorhynchus sulcatus*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 62: 15-21.
- Nahar P.B., Kulkarni S.A., Kulye M.S., Chavan S.B., Kulkarni G., Rajendran A., Yadav P.D., Shouche Y., Deshpande M.V. (2008): Effect of repeated *in vitro* sub-culturing on the virulence of *Metarhizium anisopliae* against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biocontrol Science and Technology*, 18: 337-355.
- Navrátilová M. (2015a): Uplatňování systému integrované ochrany rostlin v souvislosti se změnou legislativy (27). Biologická ochrana rostlin jako nedílná součást principů IOR (1). *Agromanuál*, 7: 42-46.
- Navrátilová M. (2015b): Uplatňování systému integrované ochrany rostlin v souvislosti se změnou legislativy (28). Biologická ochrana rostlin jako nedílná součást principů IOR (2). *Agromanuál*, 8: 42-46.
- Osborne L.S., Landa Z., (1992): Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Florida Entomologist*, 75: 456-471.
- Ouedraogo R.M., Cusson M., Goettel M.S., Brodeur J. (2003): Inhibition of fungal growth in thermoregulating locusts, *Locusta migratoria*, infected by the fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 82: 103-109.
- Padilla-Guerrero I.E., Barelli L., González-Hernández G.A., Torres-Guzmán J.C., Bidochka M.J. (2011): Flexible metabolism in *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: role of the glyoxylate cycle during insect pathogenesis. *Microbiology*, 157: 199-208.
- Prenerová E. (2007): Studium využitelnosti entomopatogenních hub (*Deuteromycetes*) v systému integrované ochrany smrkových porostů proti ploskohřbetce smrkové (*Cephalcia abietis*) ve stádiu vajíček a prvních instarů. *Projekt grantové služby LČR, Hradec Králové*, 42 p.
- Prokinová E., Duková K. (2015): Biologické ošetření osiva pšenice. *Úroda*, 6: 32-36.
- Quesada-Moraga E., Vey A. (2003): Intra-specific variation in virulence and *in vitro* production of macromolecular toxins active against locust among *Beauveria bassiana* strains and effects of *in vivo* and *in vitro* passage on these factors. *Biocontrol Science and Technology*, 13: 323- 340.
- Ravensberg W.J. (2010): The development of microbial pest control products for control of arthropods: a critical evaluation and a roadmap to success. *PhD Thesis Wageningen University, NL*, 45-98 pp.
- Roberts D.W., Humber R.A. (1981): Entomogenous fungi. In: Cole G.T., Kendrick B. (Eds.): *Biology of conidial fungi*. *Academic Press, New York*, 201-236.
- Safavi S.A. (2012): Attenuation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* following serial *in vitro* transfers. *Biologia*, 67(6): 1062-1068.
- Santoro P.H., Zorzetti J., Constanski K., Neves P.M.O.J. (2014): Conidial production, virulence, and stress tolerance of *Beauveria bassiana* conidia after successive *in vitro* subculturing. *Revista Colombiana de Entomología*, 40(1): 85-90.

- Shah F.A., Wang C.S., Butt T.M. (2005): Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 251: 259-266.
- Shah P.A., Pell J.K. (2003): Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61: 413-423.
- Shahid A.A., Rao A.Q., Bakhsh A., Husnain, T. (2012): Entomopathogenic fungi as biological controllers: New insights into their virulence and pathogenicity. *Archives of Biological Sciences*, 64: 21-42.
- Schaerffenberg B. (1964): Biological and environmental conditions for the development of mycoses caused by *Beauveria* and *Metarhizium*. *Insect Pathology*, 6: 8-20.
- Schrank A., Vainstein M.H. (2010): *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 56: 1267-1274.
- Song T.T., Feng M.G. (2010): *In vivo* passages of heterologous *Beauveria bassiana* isolates improve conidial surface properties and pathogenicity to *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 106: 211-216.
- 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. *Studies in mycology*, 57: 5-59.
- Suwannakut S., Boucias G.D., Wiwat Ch. (2005): Genotypic analysis of *Nomuraea rileyi* collected from various noctuid hosts. *Journal of Invertebrate Pathology*, 90: 169-176.
- Tichá K. (2001): Biologická ochrana rostlin. *Grada Publishing, Praha*, 88 p.
- Vandenberg J.D., Cantone F.A. (2004): Effect of serial transfer of three strains of *Paecilomyces fumosoroseus* on growth *in vitro*, virulence, and host specificity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85: 40-45.
- Vänninen I. (1995): Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type. *Mycological Research*, 100: 93-101.
- Váňa J. (1998): Systém a vývoj hub a houbových organismů. *Karolinum, Praha*, 164 p.
- Vega F.E. (2007): Naming names: The etymology of fungal entomopathogens. In: Ekesi S., Maniania N.K. (Eds.): Use of entomopathogenic fungi in biological pest management. *Research Signpost, Kerala*, 1-11.
- Wang C., St. Leger R.J. (2006): A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(17): 6647-6652.
- Wraight S.P., Ramos M.E. (2015): Delayed efficacy of *Beauveria bassiana* foliar spray applications against Colorado potato beetle: Impacts of number and timing of applications on larval and next-generation adult populations. *Biological control*, 83: 51-67.
- Wraight S.P., Ramos M.E. (2002): Application parameters affecting field efficacy of *Beauveria bassiana* foliar treatments against Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. *Biological control*, 23(2): 164-178.
- Wraight S.P., Carruthers R.I. (1999): Production, delivery and use of mycoinsecticides for control of insect pests of field crops. *Human Press, Totowa, NJ*, 233-269.
- Zimmermann G. (2007b): Review on safety of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*. *Biological Control Science and Technology*, 17: 879-920.

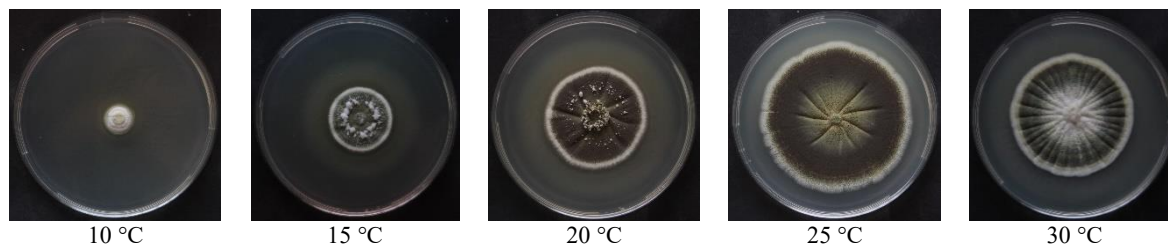
9. PŘÍLOHY

Všechny fotografie byly pořízeny z mého vlastního výzkumu, pokud není uvedeno jinak.

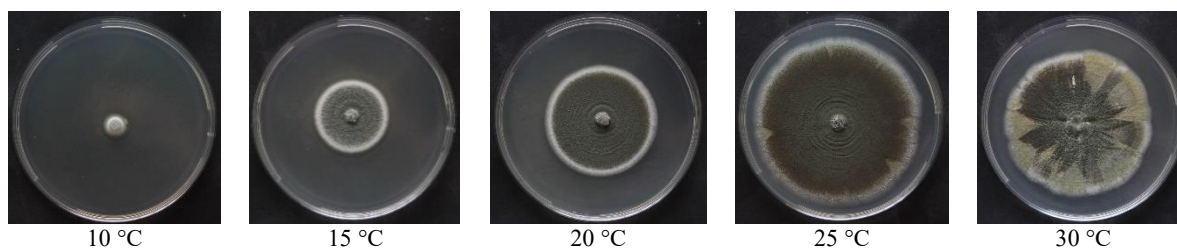
Grafický list 1 – Středové kultury původních a pasážovaných variant kmenů *M. anisopliae*

Ukázka růstu středových kultur původních kmenů houby *M. anisopliae* v různých teplotách kultivace

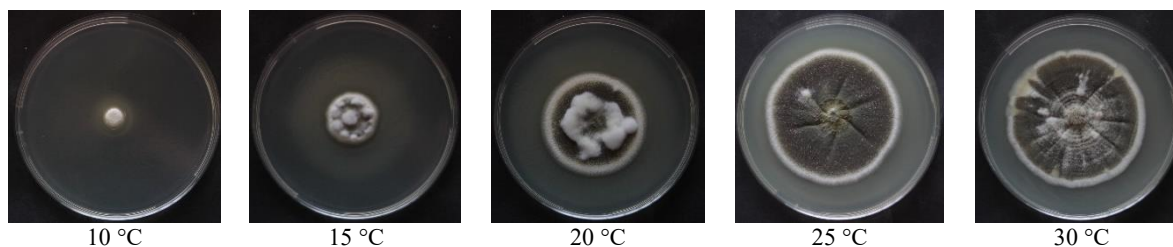
Kmen BIO 1020



Kmen MKC 110112

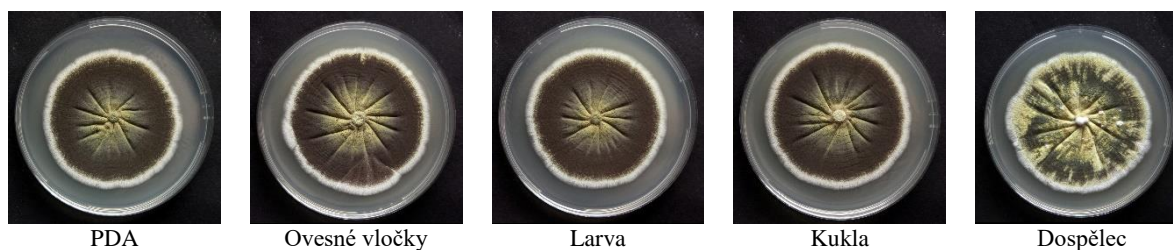


Kmen Man 3B

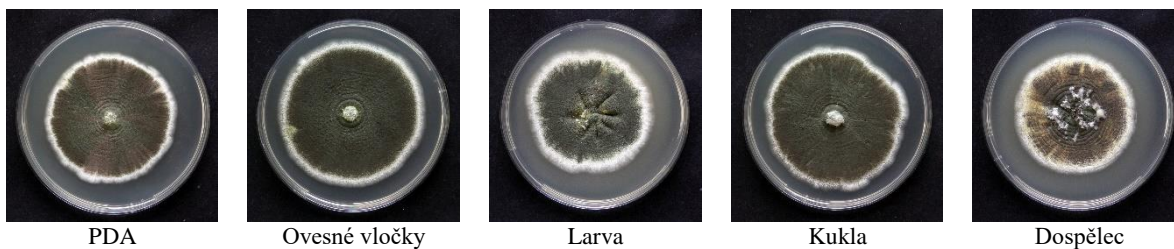


Ukázka vlivu kontinuálního pasážování na fenotyp kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae*

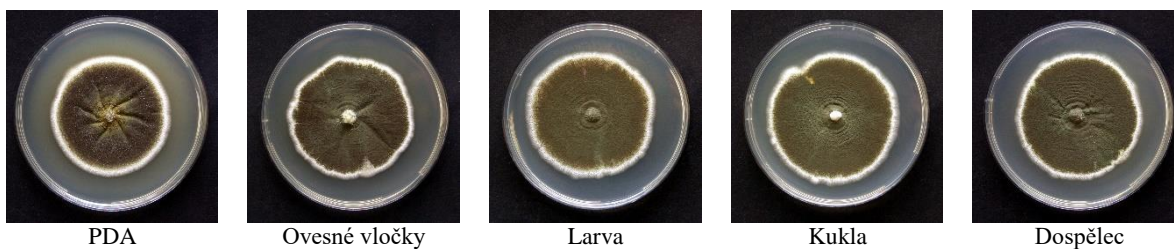
Kmen BIO 1020



Kmen MKC 110112

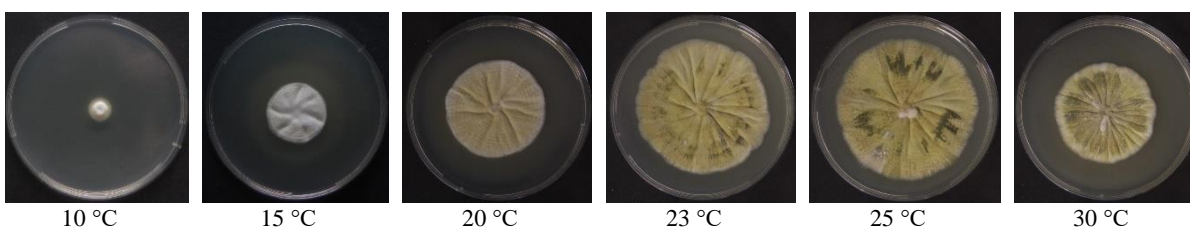


Kmen Man 3B

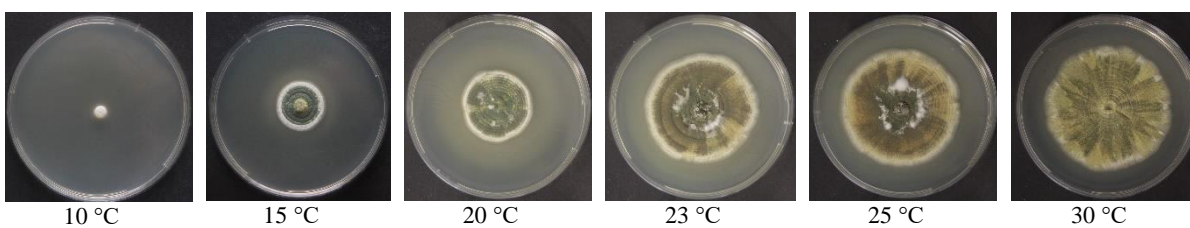


Ukázka růstu středových kultur pasážovaných variant kmenů přes dospělé *T. molitor* v různých teplotách kultivace

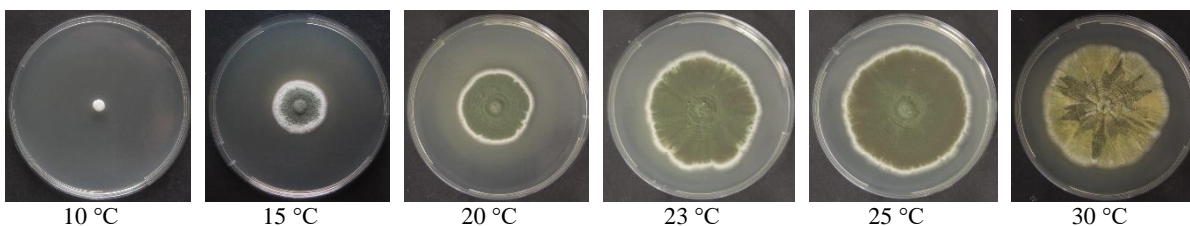
Kmen BIO 1020



Kmen MKC 110112

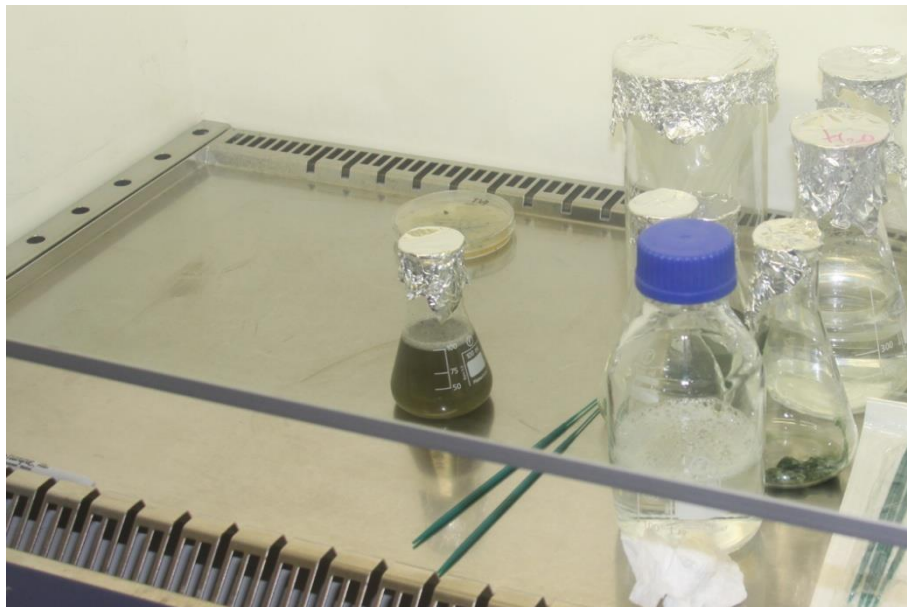


Kmen Man 3B



Grafický list 2 – Kontinuální pasážování kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae*

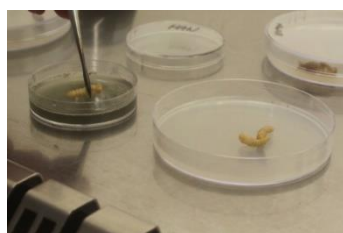
Příprava suspenze kmenů entomopatogenní houby *M. anisopliae*



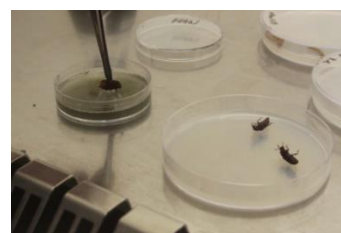
Kontinuální pasážování přes vývojová stádia *T. molitor*



Larva – 1. pasáž



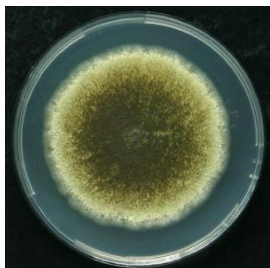
Kukla – 1. pasáž



Dospělec – 1. pasáž

Grafický list 3 - Hodnocení účinnosti entomopatogenních hub na vajíčkách mandelinky bramborové

Použité druhy entomopatogenních hub



Metarhizium anisopliae
kmen BIO1020



Beauveria bassiana
kmen Bba I101

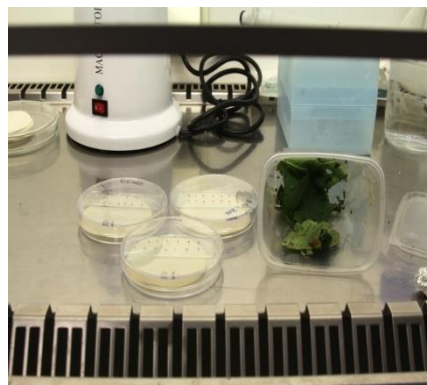
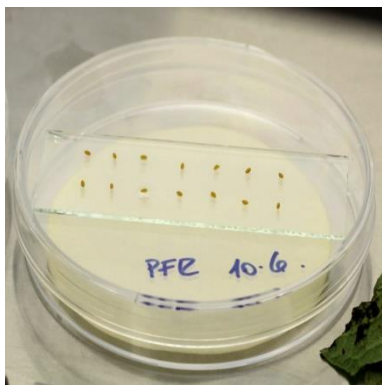


Isaria fumosorosea
kmen PFR 97



Lecanicillium muscarium
kmen I9

Aplikace vajíček do suspenzí entomopatogenních hub na podložní sklíčko



Zdravá vajíčka mandelinky bramborové



Foto: Ing. Jakub Vondruška

Infikovaná vajíčka mandelinky bramborové entomopatogenními druhy hub



Metarhizium anisopliae
kmen BIO1020



Beauveria bassiana
kmen Bba I101



Isaria fumosorosea kmen
PFR 97



Lecanicillium muscarium
kmen I9