

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

Zemědělská fakulta

Disertační práce

**VÝVOJ FORMULACÍ BIOMASY MITOSPORICKÝCH HUB CÍLENÉ
NA VYUŽITÍ V PROGRAMECH BIOINTENZIVNÍ INTEGROVANÉ
OCHRANY ROSTLIN**

Autor disertační práce
Ing. Jana Šimková

Školitel
prof. Ing. Zdeněk Landa, CSc.
Katedra rostlinné výroby a agroekologie
ZF JU v Českých Budějovicích

České Budějovice
únor 2011

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma „Vývoj formulací biomasy mitosporických hub cílené na využití v programech biointenzivní integrované ochrany rostlin“ vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a materiálů uvedených v seznamu literatury.

.....
Jana Šimková

České Budějovice, únor 2011

Děkuji svému školiteli prof. Ing. Zdeňku LANDOVI, CSc. za odborné vedení při práci, cenné rady, ochotu, trpělivost a pomoc, které mi poskytoval v průběhu studia a zpracování předkládané práce.

Poděkování dále patří Ing. Andree Bohaté, Ph.D., Ing. Štěpánce Radové, Ph.D. a Ing. Aleši Skalickému za pomoc, rady a připomínky a pracovníkům Katedry rostlinné výroby a agroekologie Marii Nýdlové, Olze Divišové a Michalu Kalistovi za pomoc a asistenci při zakládání pokusů. A v neposlední řadě i mým rodičům za podporu během celého studia.

Jana Šimková

Řešení tématu disertační práce bylo podporováno z grantů:

Identifikace	Název
IG 10/08	Vývoj formulací biopreparátu na bázi mitosporické houby <i>Beauveria bassiana</i>
IG 10/09	Formulace biopreparátů na bázi mitosporických hub (MSM 6007665806)

1.	ÚVOD.....	1
2.	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	2
2.1.	Integrovaná ochrana rostlin (IOR).....	2
2.2.	Biointenzivní integrovaná ochrana rostlin.....	3
2.3.	Biologická ochrana.....	4
2.3.1.	Využití hub v rámci biologické ochrany.....	5
2.4.	Mitosporické houby.....	6
2.5.	Entomopatogenní houby.....	7
2.5.1.	Infekční cyklus entomopatogenních hub.....	8
2.5.2.	Šíření spor a podmínky prostředí.....	10
2.6.	Houby rodu <i>Beauveria</i>	12
2.6.1.	Taxonomické zařazení rodu do systému.....	12
2.6.2.	Nejznámější druhy rodu <i>Beauveria</i>	13
2.7.	Další entomopatogenní houby.....	14
2.8.	Kultivace entomopatogenních hub v podmínkách in vitro.....	16
2.9.	Formulace spor entomopatogenních hub.....	18
2.10.	Skladování spor entomopatogenních hub.....	22
3.	CÍLE PRÁCE.....	24
4.	MATERIÁL A METODY.....	25
4.1.	Organismy používané v biotestech.....	25
4.2.	Uložení kmenů v mykologické sbírce.....	26
4.3.	Standardní biotesty používané v pokusech.....	27
4.4.	Produkce spor.....	30
4.5.	Formulace a skladování spor.....	33
4.6.	Smáčedla a rozpustnost.....	34
4.7.	Statistické analýzy.....	35
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	36
5.1.	Optimalizace produkce spor entomopatogenních hub pro využití v biointenzivní integrované ochraně rostlin.....	36
5.1.1.	Kultivace spor na přirozených substrátech.....	36
5.1.2.	Produkce spor na umělých živných půdách.....	43
5.2.	Hodnocení formulací na základě uchování vitality a virulence houby <i>B. bassiana</i> v průběhu skladování.....	46
5.2.1.	Ovlivnění vitality a virulence houby <i>B. bassiana</i> v průběhu skladování v -20°C.....	46
5.2.2.	Ovlivnění vitality a virulence houby <i>B. bassiana</i> v průběhu skladování ve 4°C.....	52
5.2.3.	Ovlivnění vitality a virulence houby <i>B. bassiana</i> v průběhu skladování ve 22°C.....	57
5.2.4.	Porovnání vitality a virulence neformulovaných konidií v průběhu skladování v různých teplotách.....	68
5.2.5.	Porovnání vitality a virulence konidií formulovaných v nutritivním nosiči v průběhu skladování v různých teplotách.....	71
5.2.6.	Porovnání vitality a virulence konidií formulovaných v inertních nosičích v průběhu skladování v různých teplotách.....	74
5.2.7.	Porovnání vitality a virulence různých kmenů houby <i>B. bassiana</i> formulovaných v inertním nosiči.....	80
5.3.	Předaplikační příprava postřikové jichy z práškové formulace spor houby <i>B. bassiana</i>	82
5.4.	Sledování kvalitativních a kvantitativních parametrů v souvislosti s produkční teplotou inokula houby <i>B. bassiana</i>	85
5.4.1.	Vliv teploty produkce inokula na změnu kvalitativních a kvantitativních ukazatelů sledovaných v teplotě 10°C.....	85
5.4.2.	Vliv teploty produkce inokula na změnu kvalitativních a kvantitativních ukazatelů sledovaných v teplotě 15°C.....	89
5.4.3.	Vliv teploty produkce inokula na změnu kvalitativních a kvantitativních ukazatelů sledovaných v teplotě 20°C.....	93

5.4.4.	Vliv teploty produkce inokula na změnu kvalitativních a kvantitativních ukazatelů sledovaných v teplotě 25°C	97
5.4.5.	Vliv teploty produkce inokula na změnu kvalitativních a kvantitativních ukazatelů sledovaných v teplotě 30°C	100
5.4.6.	Porovnání vlivu teploty produkce inokula na následné parametry ve všech kultivačních teplotách	103
5.4.7.	Porovnání dvou kmenů houby <i>B. bassiana</i> pocházejících z odlišných klimatických oblastí.....	107
6.	DISKUSE	114
7.	ZÁVĚRY	126
8.	SUMMARY	128
9.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	131
10.	PŘÍLOHY	149

1. ÚVOD

Biologická ochrana je zvláště v posledních letech stále častěji skloňovaným termínem, ke kterému se navíc přidává i dosud méně zaběhnutý termín biointenzivní integrovaná ochrana (Bio-IOR). Vzhledem k současné situaci v zemědělské produkci, která zanedlouho projde zásadní změnou spočívající v přechodu konvenčního hospodaření na integrovaný systém, bude Bio-IOR tvořit jeden ze stavebních kamenů celého systému. Tyto metody jsou chápány jako alternativní způsob boje proti škodlivým organismům, který je nezbytný k omezení používání chemické ochrany a k naplnění požadavků definovaných pro zavedení integrované produkce potravin. Vzhledem k tomu, že není možné pouze vynechat chemickou ochranu a tím dosáhnout vysoké kvality produkce, musí dojít k adekvátní náhradě jinou formou. Pozvolný odklon od konvenčního způsobu produkce byl dosud realizován pouze formou integrované ochrany, která se ovšem v průběhu času nevyvíjí směrem k širšímu uplatnění biologické ochrany, jak bylo původním záměrem, ale bohužel stále častěji se jedná pouze o určitou formu usměrněného používání chemických přípravků, které jsou v Bio-IOR neakceptovatelné. V případě zavádění Bio-IOR se jedná o mnohem ucelenější systém, na jehož počátku stojí důkladný monitoring a znalost prostředí, škodlivých organismů a stejně tak i organismů introdukovaných jako „ochranný prostředek“ a jejich interakcí s prostředím. V principu se jedná o záměrnou a cílenou podporu vlastního potenciálu ekosystému, konkrétně pak o podporu všech skupin přirozených nepřátel (parazitů, resp. parazitoidů, predátorů a patogenních, parazitických nebo antagonistických mikroorganismů, včetně virů). Zvláštní důraz by měl být kladen na mikroorganismy, jejichž potenciál je na rozdíl od makroorganismů stále málo využívaný v praktické ochraně. Jednou ze skupin mikroorganismů splňujících předpoklady pro využití v Bio-IOR jsou i entomopatogenní houby. Jejich vysoký potenciál spočívá hlavně v jejich kosmopolitním charakteru a přímé a přirozené asociaci s mnoha druhy organismů. Zvláštní důraz je pak kladen na lokální kmeny, které tvoří nativní složku daného ekosystému. Výhoda používání lokálních kmenů spočívá v jejich adaptaci na ošetřované prostředí. Tento systém si neklade za cíl absolutní odstranění škodlivého činitele, ale jeho udržení pod prahem ekonomické škodlivosti s co možná nejširším využitím původních organismů.

Cesta k zajištění kvalitního a účinného bioagens může být delší než by se mohlo na první pohled zdát. V souvislosti s praktickým použitím je z naší strany snaha navracet zpět organismy, které se na daném území přirozeně vyskytují, tudíž je kladen velký důraz na strategii tzv. lokálních kmenů a zachování diverzity prostředí. Na počátku stojí organismus, se kterým je třeba pracovat a dokonale pochopit jeho vývojový cyklus a nároky na prostředí a na jejich základě vytvořit odpovídající podmínky *in vitro*. Po izolaci z prostředí následuje namnožení a uchovávání a celý proces je ukončen navrácením EH zpět do lokality původního výskytu v životaschopném stavu, aby mohlo dojít k rychlému rozšíření a vytvoření supresivního prostředí. Toto pojetí je výhodné i z hlediska přizpůsobení organismu „domovským“ podmínkám a jeho snazšího uchycení a rychlejšího působení. V předkládané práci je představen možný metodický postup pro vytvoření modelu využívajícího původní kmeny entomopatogenních hub a možnosti do jisté míry ovlivnit jejich schopnost růstu a produkce v umělých systémech i přirozeném prostředí tak, aby s vynaložením co nejmenších nákladů byl získán kvalitní „přípravek“ použitelný v Bio-IOR.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Integrovaná ochrana rostlin (IOR)

Výraz „integrováná ochrana“ byl původně zaveden k popisu používání insekticidů kompatibilních s biologickou ochranou proti hmyzu (Norris et al. 2003). Obecné principy integrovaného boje se škůdci formulovali Stern et al. již v roce 1959. V současné době existuje zhruba 77 definic (Dufour 2001).

Definice integrované ochrany dle Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2009/128/ES

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

Integrovaná ochrana je jednou z klíčových součástí integrované produkce plodin (Boller et al. 2004). Při používání systémů integrované ochrany je důležité se problému věnovat v širším měřítku než v případě používání prosté chemické ochrany. Je nutné hlubší porozumění vztahům mezi hmyzími škůdci a systémem obhospodařování (Jackson et al. 2010). Vyžaduje selektivní agens účinné na cílové organismy, chrání přirozené nepřátele a zvyšuje jejich podíl na celkové ochraně (Caulder 1999). Kombinuje mnoho zásad pro produkci rostlin s důkladným monitoringem škodlivých organismů a jejich přirozených nepřátel (Whipps, Lumsden 2001) a využívá komplexní informace o životním cyklu škůdců a jejich interakcích s prostředím (EPA 2009). Tyto praktiky jsou sjednocovány s biologickou ochranou, rezistencí hostitelských rostlin, pěstební praxí a úzkým spektrem pesticidů (Koul, Cuperus 2007).

V integrované ochraně nejde o to, aby byla jedna metoda nahrazena jinou, ale o to, aby se metody vzájemně doplňovaly, protože používání biologické ochrany může být v některých ohledech omezeno (Inglis et al. 2001). Každý přirozený nepřítel poskytuje efektivní ochranu proti specifickému škůdci, ačkoli další škůdci a choroby rostlin, které nemohou být chráněny chemicky, musí být chráněny jinak. Proto je zde systém integrované ochrany, kde jsou predátoři, parazité, chemické a mikrobiální insekticidy a fungicidy používány společně, aby bylo minimalizováno riziko poškození rostlin (Coombs, Coombs 2003).

Biopesticidy jsou klíčovou součástí programu IOR v současném zemědělství a bioinsekticidy představují jejich největší část a zahrnují nejširší spektrum různých mikrobiálních a přírodních produktů (Menn, Hall 1999). V některých systémech, především ve sklenicích, je možná ochrana založená výhradně na mykoinsekticidech. Některé druhy hub vykazují výbornou schopnost potlačovat samostatně hmyzí škůdce ve sklenicích. Patří mezi ně *Aschersonia* spp., *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *I. fumosorosea* a *L. lecanii* (Inglis et al. 2001).

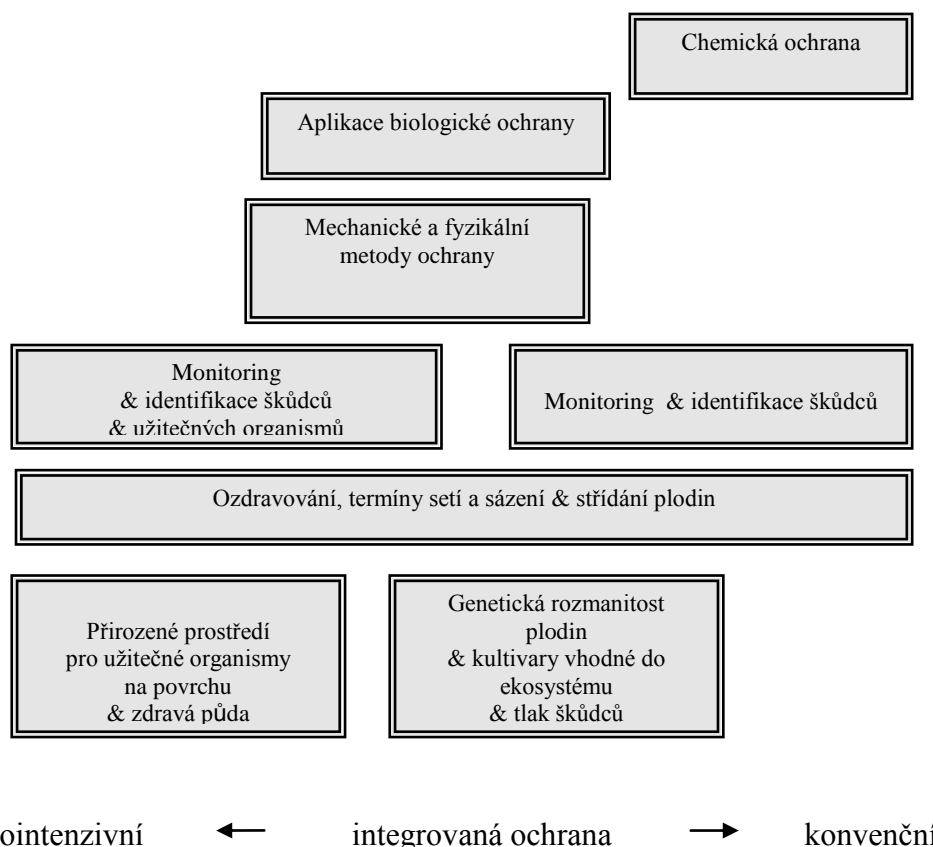
2.2. Biointenzivní integrovaná ochrana rostlin

V současné době se objevují termíny jako biointenzivní integrovaná ochrana (Bio-IOR) nebo podobný termín ekologicky založená integrovaná ochrana. Jedná se o program, který by měl reprezentovat udržitelný přístup ke kontrole škodlivých organismů, který kombinuje nástroje biologické, chemické, fyzikální a pěstitelské pro zajištění kladných ekonomických, ekologických a sociologických návazností (Kennedy, Sutton 2000). Přílišné spoléhání na syntetické pesticidy v programech na ochranu rostlin na celém světě, má za následek narušení životního prostředí, udržování škůdců a jejich odolnost vůči pesticidům a letální nebo subletální účinky na necílové organismy, včetně člověka (Prakash, Rao 1997). Jednou z klíčových priorit konceptu Bio-IOR a integrované produkce rostlin je záměrná podpora přirozeně se vyskytujících druhů, představujících nativní potenciál v oblasti biologické regulace populací škůdců a při supresi šíření a vývoje původců onemocnění rostlin, při současném důrazu na preventivní regulační opatření a minimalizaci regulačních opatření kurativní povahy (Dufour 2001, Boller et al. 2004). Měl by být kladen důraz na porozumění ekologickým vztahům mezi hostitelskou rostlinou a způsoby ochrany, jako je kontrola pěstování, biologická ochrana a rezistence hostitelské rostliny (Koul, Cuperus 2007). Začíná kroky k přesné diagnóze prostředí a zdrojů problémů se škůdci a dále spoléhá na řadu preventivních opatření a biologických zásahů k udržení populací škůdců v přijatelných mezích. Pokud nebyly použité strategie dostatečně účinné, používají se jako poslední možnost šetrné pesticidy s ohledem na minimalizaci rizik (Benbrook 1996).

Důležitý rozdíl mezi konvenční a Bio-IOR je důraz na následnou přestavbu zemědělského ekosystému tak, aby se stal nevýhodným pro škůdce a vhodný pro komplex jejich parazitů a predátorů. Velmi důležitou součástí je monitoring, který vyžaduje soustavnou kontrolu škůdců a užitečných organismů v porostech, provádí se v pravidelných intervalech a kritických časech pro získání informací o plodině, škůdci a přirozeném nepříteli. Pracovník musí znát biologii škůdce a užitečných organismů asociovaných s hmyzem a rozumět interakcím uvnitř prostředí (Dufour 2001). Snížení biodiverzity vede ve výsledku k opakujícím se přemnožením hmyzu a mnoha dalším problémům (Altieri 1994).

Tento způsob ochrany má dvě složky, proaktivní a reaktivní, přičemž proaktivní složka hraje nejdůležitější roli. Patří do ní např. střídání plodin a tvorba prostředí pro užitečné organismy, čímž se permanentně snižuje kapacita prostředí pro škůdce. Spočívá ve zdravé, biologicky aktivní půdě (zvyšuje podpovrchovou diverzitu), prostředí pro užitečné organismy (zvyšuje nadzemní diverzitu) a používání vhodných kultivarů rostlin (Dufour 2001). Nerovnováha v půdě může vést k tomu, že rostliny jsou více atraktivní pro hmyzí škůdce, nejsou schopné se bránit proti poškození nebo jsou více vnímavé k druhotným infekcím způsobeným rostlinnými patogeny (Phelan 1997).

Dufour (2001) definoval koncepci Bio-IOR jako určitou oblast, v níž je zakomponována ochrana rostlin, nicméně nastínil její vymezení jako prostor mezi dvěma krajními variantami, kterými je biointenzivní a konvenční IOR. Hlavní odlišnost spočívá v tom, že v rámci konvenční IOR je možné v opodstatněných případech použít kurativní ošetření pomocí chemických přípravků, zatímco v Bio-IOR je používání syntetických pesticidů zakázáno. Celý systém je znázorněn na následujícím obrázku.

Jednotlivé kroky v rámci integrované ochrany rostlin (upraveno dle Dufour 2001)


2.3. Biologická ochrana

Existuje tzv. přirozená biologická ochrana, kdy přirozeně se vyskytující nepřátelé udržují škůdce na nižší úrovni než by tomu bylo bez jejich přítomnosti, a je obecně charakteristická pro biodiverzní systém. Savci, ptáci, netopýři, hmyz, houby, bakterie a viry, ti všichni hrají roli jako predátoři a paraziti v zemědělských systémech (Dufour 2001). Cílem biologické ochrany je objektivně převést škůdce zpět na původní nízkou úroveň napadení a zabránit tak jejich rozmnožení a způsobení ekonomických škod (Coombs, Coombs 2003).

Biologická ochrana je poměrně významnou součástí integrované ochrany rostlin. Ekologické principy omezování škůdců se často uplatňovaly již v minulosti (Hrdý et al. 1991). Vychází se z obecného poznatku, že mezi hostitelem, patogenem a vnějším prostředím existuje přirozená rovnováha v rámci daného ekosystému. Bouřlivý rozvoj chemie sice způsobil, že tyto metody byly na čas zatlačeny do pozadí (Čača 1990), ovšem nebyly zapomenuty úplně. Jednou z nesporných výhod těchto metod je fakt, že se pracuje s přírodě vlastními prostředky (Tichá 2001), jako jsou bakterie, viry a houby, na ochranu proti škůdcům, plevelům a nemocem (Butt et al. 2001), takže nedochází k zatěžování životního prostředí a zpravidla neohrožují necílové organismy. Působí přitom dlouhodobě (Tichá 2001).

Základní metody biologické ochrany jsou – konzervace, introdukce a uchycení (augmentace) (Waage, Mills 1992). Konzervace ochraňuje nebo zvyšuje množství přirozených nepřátel, kteří už jsou v prostředí přítomni. Introdukce znamená dovážení a vypouštění exotických (nepůvodních) přirozených nepřátel proti cizím i původním škůdcům. Uchycení značí využití přirozených nepřátel chovaných v laboratorních podmínkách a jejich vypouštění do prostředí. Tyto strategie lze kombinovat podle momentální potřeby (Hagler

2000). Klasickou biologickou metodou potlačování (regulace) škodlivých organismů je zavedení parazitoidů, predátorů nebo patogenů do populací škůdců s tím, že se dosáhne dlouhodobě rovnovážného stavu bez opakovaných intervenčních zásahů - tj. nižší populační hustoty škůdce, než jaká by panovala bez působení uvedených regulačních činitelů. Příkladem jsou jednorázové nebo jen nečetně opakované introdukce specifických parazitoidů či predátorů do oblastí, kde chyběli (Hrdý et al. 1991).

Jako první komerční produkt biologické ochrany se v USA ve čtyřicátých letech 20. století dostal na trh produkt na bázi *Bacillus popilliae* jako ochrana proti listokazu japonskému (*Popillia japonica*) (Caulder 1999). Bioagens mohou z hlediska přírodního prostředí nabídnout mnohem příznivější alternativy chemických pesticidů. Mohou být využity tam, kde došlo ke vzniku rezistence ke konvenčním pesticidům (Butt et al. 1999), protože u biopreparátů je vznik rezistence nepravděpodobný a navíc mají méně devastující vliv na prostředí (Elad, Freeman 2002).

Biologické přípravky na bázi mikroorganismů registrované v ČR pro rok 2010 (Seznam registrovaných přípravků na ochranu rostlin, 2010)

Název přípravku (biologická funkce přípravku)	Účinný organismus	Obsah	Zařazení přípravku Úprava Toxicita člověk včely	Hořla- vost	Registrant Zástupce	Registrační číslo / Platí do rok-měsíc Použitelnost (més.)	* Str.
Biobit WP (I,BT)	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. kurstaki	16000 mj/mg	WP -	PR -	VBC-BCN	3776-2/2011-12 48	231
Biobit XL (I,BT)	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. kurstaki	12700 mj/mg	SL - SL -	PR - PR -	VBC-BCN VBC-BCN	4213-1/1999-12 24* 4213-2/1999-12 24*	231
Contans WG (BT,F)	<i>Coniothyrium minitans</i> (strain CON/M/91-08)	100 g/kg	WG -	-	PBP-AGZ	4531-0/2013-12 6	231
Foray 48 B (I,BT)	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. kurstaki	12700 mj/ml	SC -	PR -	VBC-BCN	3728-3/2014-04 24	231
Polyversum (F,BT)	<i>Pythium oligandrum</i> -oospóry	1 milion ks/g	WP -	PR -	BIP-BIP	4556-0/2015-12 24	232
Polyversum - Biogarden (F,BT)	<i>Pythium oligandrum</i> -oospóry	1 milion ks/g	WP - WP -	PR - PR -	BIP-BIP BIP-BIP	4556-1/2015-12 24 4556-2/2015-12 24	232

2.3.1. Využití hub v rámci biologické ochrany

Houby jsou díky své schopnosti aktivně infikovat a zabít cílové škůdce jedinečnými kandidáty na použití v inundativní biologické ochraně (Jackson et al. 2010). Biologická ochrana prostřednictvím houbových organismů má vliv na produktivitu rostlin, živočichy, lidské zdraví a produkci potravin. Tato oblast zahrnuje množství důležitých disciplín, jako je patologie, ekologie, genetika, fyziologie, masová produkce, formulace a strategie aplikace (Butt et al. 2001). Nejběžnějšími druhy entomopatogenních hub podílejících se na biologické ochraně jsou *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *I. fumosorosea* a *L. lecanii* (Butt et al. 1999). Propagule entomopatogenních hub zodpovědné za šíření a infekci v přírodních podmínkách jsou nejčastěji vzdušné konidie (Barlett, Jaronski 1988).

Mykopesticidy (Hall, Menn 1999)

Mykopesticidy jsou masově produkované, obvykle komerčně formulované výrobky na bázi hub, které jsou patogeny, parazity nebo antagonisty – hmyzích škůdců (mykoinsekticidy), parazitických hlístic rostlin (mykonematicidy), plevelů (mykoherbicidy) nebo patogenů plodin (mykofungicidy). Jsou aplikované inundativně jako chemické pesticidy.

Jednou z možných překážek v používání entomopatogenních hub je fakt, že všechny třídy agrochemikálií, což zahrnuje herbicidy, insekticidy i fungicidy, jsou jejich potenciálními inhibitory (Inglis et al. 2001). Přesto existuje mnoho příkladů, kdy došlo po aplikaci subletální dávky insekticidů ke zvýšení účinnosti entomopatogenních hub (Anderson et al. 1989, Quintela, McCoy 1998). Účinnost je někdy nižší, někdy však vyšší než u chemických pesticidů (Lewis 2007).

2.4. Mitosporické houby

Organismy dnes označované jako mitosporické houby, byly dříve nazývány Deuteromycotina, Deuteromycetes nebo Fungi imperfecti, houby bez pohlavního vývoje nebo konidiální houby (Kirk et al. 2001).

Houby jsou fylogeneticky rozlišná skupina mikroorganismů, kde všichni zástupci jsou heterotrofní eukaryota, jednobuněčná (kvasinky) nebo hyfovité (vláknitá) a rozmnožují se pohlavními nebo nepohlavními spory (Inglis et al. 2001). Právě houby se od předešlých tříd odlišují přítomností chitinu v buněčné stěně (Khachatourians et al. 2002).

Charakteristické kombinace znaků (Kirk et al. 2001)

- (1) nepřítomnost nebo předpokládaná nepřítomnost stadia produkujícího vřeska s askosporami, bazidie s bazidiosporami, teliospory nebo jiné bazidie vytvářející orgány (tj. nepřítomnost teleomorfy, perfektního nebo pohlavního stadia);
- (2) nepřítomnost nebo předpokládaná nepřítomnost meiotických nebo mitotických rozmnožovacích struktur (agonomycety, sterilní mycelia);
- (3) přítomnost konidií tvořených mitózou (nebo s předpokládanou mitózou)

Tato třída doplňuje systém vyšších hub tvořený třídami Ascomycetes a Basidiomycetes. První třídění nepohlavních forem provedl Fuckel v roce 1869 do kategorie Fungi Imperfecti. V roce 1899 Saccardo zavedl označení Deuteromycetae (Kiffer, Morelet 2000). Hyphomycetes je jedna ze skupin mitosporických hub. Tato umělá třída je tradičně členěna do tří (nebo čtyř, zahrnuje-li agonomycety) řádů podle přítomnosti nebo nepřítomnosti konidií a stupně sdružení konidioforů do složitějších struktur (konidiomat). Použije-li se třídění do 4 řádů, pak se dělí na Agonomycetales, Hyphomycetales, Stilbellales a Tuberculariales. Hyphomycetales mají konidiofory oddělené, většinou neorganizované v synematálních nebo sporodochiálních konidiomatech. Hyphomycetes mají konidie vytvořené na hyfách, které většinou nejsou součástí diferencovaného konidiomatu (Kirk et al. 2001). Konidie jsou mitotické, exogenní a nepohyblivé. Jsou produkovány konidiogenními buňkami, které mohou být nesené na konidioforu (Kiffer, Morelet 2000).

U řady druhů, zvláště u vřeckovýtusných hub, může být stadium anamorfy morfologicky značně odlišné od stadia, v němž dochází k pohlavnímu rozmnožování (Váňa 1998). U mnoha hub bylo pohlavní rozmnožování dlouho neznámé a u některých není známo dodnes (Khachatourians et al. 2002), řada druhů představuje dosud tzv. mitotickou holomorfu. Prakticky to znamená, že se druh vyskytuje pouze v konidiálním stadiu (jako anamorfa) (Váňa 1998). V některých případech se může v životním cyklu houby vyskytnout pohlavní rozmnožování (teleomorfa), existující společně s nepohlavní formou (anamorfou). Bylo provedeno několik studií, které předpokládají, že některé druhy rodů *Beauveria*, *Fusarium*, *Isaria* (*Paecilomyces*) a *Lecanicillium* (*Verticillium*) si prostřednictvím anastomozy somatických hyf vyměňují jádra a dochází ke karyogamii nebo vzniku diploidních

Patří sem rozsáhlá skupina hub zahrnující mnoho entomopatogenních druhů (Inglis et al. 2001) majících velmi široké spektrum hmyzích hostitelů (Lacey et al. 2001). Většina hub této skupiny může realizovat kompletní vývojový cyklus i v alternativních systémech bez přímé vazby na živého hostitele (např. saprofytický cyklus na odumírající organické hmotě různého původu) (McCoy et al. 1988; Humber 1997; Charnley 1997). Nejběžnější rody entomopatogenních vláknitých hub jsou *Aspergillus*, *Beauveria*, *Culicinomyces*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Isaria*, *Tolypocladium* a *Lecanicillium*. Mnoho čeledí entomopatogenních vláknitých hub má zřejmě teleomorfní stádium *Cordyceps* (Inglis et al. 2001).

2.5. Entomopatogenní houby

Entomopatogenní organismy, hmyzí patogeny, jsou mikroby z mnoha čeledí, které vyvolávají nemoci u hmyzu. Jsou zkoumány již více než 100 let ve snaze definovat způsob jejich účinku, ekologické rozpětí a účinnost v ochraně plodin a komodit a potenciál jako součást IOR. Stávají se součástí ekosystému, do kterého jsou introdukovány a nejsou pouze jedovatými látkami zabíjejícími cílového škůdce (Lewis 2007). Zahrnují mnoho druhů, které byly zkoumány pro účely biologické ochrany. V rámci některých druhů hmyzu je mnoho škůdců, kteří jsou citliví k přirozené infekci těmito houbami (Coombs, Coombs 2003).

Entomopatogenní houby se běžně vyskytují v přírodě a vyvolávají přirozené epizootie v populacích hmyzu (Butt, Goettel 2000). Dominantní postavení mají druhy zastoupené v řádech Entomophthorales (obligátně entomopatogenní houby) a Moniliales (převážně fakultativně entomopatogenní vláknité houby). Z rodů řádu Entomophthorales jsou nejčastěji detekovány houby rodu *Entomophthora*, *Conidiobolus*, *Entomophaga*, *Neozygites*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Empusa* a *Culicicola*, z řádu Moniliales rody *Aschersonia*, *Hirsutella*, *Lecanicillium*, *Beauveria*, *Isaria* (*Paecilomyces*), *Fusarium*, *Penicillium* a *Pleurodesmospora* (Poinar, Poinar 1998). Třída Hyphomycetes obsahuje přes 40 entomopatogenních rodů, které jsou rozšířené po celém světě (Khachatourians et al. 2002). Vyskytují se i ve třídách Oomycetes, kde se jedná o vodní druhy a Chytridiomycetes, které parazitují na moskytech a jiném dvoukřídlém hmyzu (Goettel et al. 2000).

Entomopatogenní houby hrají svou úlohu v redukci hmyzích škůdců. Co se týká výskytu, lze je nalézt jak ve vodním tak i suchozemském (lesy i zemědělská půda) prostředí. Obvykle jsou nalézány v asociaci s hmyzem (Khachatourians et al. 2002). Parazitují na zástupcích všech řádů hmyzu. Nejčastěji jsou parazitické mykózy zjišťovány na družicích patřících do řádů ploštice (*Hemiptera*), rovnokřídlí (*Orthoptera*), třásnokřídlí (*Thysanoptera*), stejnokřídlí (*Homoptera*), motýli (*Lepidoptera*), brouci (*Coleoptera*) a dvoukřídlí (*Diptera*). Nejčastěji infikovaným stadiem hmyzu jsou larvy, případně kukly. Méně často jsou houbami infikováni dospělci a vajíčka hmyzu (Landa 1998). Mají prokazatelný potenciál redukovat

populace hmyzích škůdců na polích, v lesech a skleníkových kulturách a představují velký příslib jako nástroj šetrné ochrany proti nim (Parker et al. 1997).

Některé druhy mohou být vysoce specializované, např. *Aschersonia aleyrodis* napadá pouze molice a *N. rileyi* téměř výhradně motýli z řádu můrovití. Narozdíl od nich druhy jako *B. bassiana* a *M. anisopliae* mají mnohem širší hostitelské spektrum zahrnující mnoho řádů z kmene členovci (Inglis et al. 2001).

Ačkoli bylo zaznamenáno více než 750 druhů hub schopných infikovat hmyz, pouze některé jsou považovány za vážné kandidáty pro komerční využití (Menn, Hall 1999). Výběr vhodných hub pro komerční produkci musí být založen na mnoha kritériích, nejen na patogenitě. Tato kritéria zahrnují přežití na stanovišti, schopnost růstu a sporulace, genetickou stabilitu, stejně jako zmíněnou patogenitu (Tarocco et al. 2005). *B. bassiana* se zdá mít nejširší potenciál jako bioagens proti hmyzu (Feng et al. 1994).

Je třeba brát v potaz, že entomopatogenní vláknité houby jsou často relativně pomalu účinkující nebo jejich efekt může být subletální, což znamená, že hmyz nezemře, ale jsou ovlivněny některé aspekty jeho biologie (Inglis et al. 2001).

2.5.1. Infekční cyklus entomopatogenních hub

Pro vznik infekce je velmi důležitá patogenita houby. Je to kvalitativní schopnost patogena způsobit onemocnění v populaci hmyzu a je závislá na mnoha různých faktorech včetně fyziologie daného hostitele (např. obranné mechanismy), fyziologie entomopatogenní houby (např. produkce enzymů a sekundárních metabolitů) a na faktorech vnějšího prostředí (Inglis et al. 2001).

Houby jsou unikátní mezi hmyzími patogeny, protože primárně infikují hostitele přes vnější kutikulu, ačkoli několik čeledí (např. *Culicinomyces*) je schopno invaze skrz zažívací trakt (Inglis et al. 2001). Houby se tak, narozdíl od bakterií nebo virů, nemusí dostat do těla pozerem (Butt et al. 1995). Konidie některých druhů hub jsou pro fázi adheze vybaveny lepivým mucilagenním povrchem, pomocí kterého vytvářejí pevnou vazbu s kutikulou hostitele již při prvním kontaktu (např. houby *L. lecanii*, *A. aleyrodis*, *Hirsutella thompsonii* aj.). Jiné druhy entomopatogenních hub (např. *B. bassiana*, *I. fumosorosea* aj.) produkují suché, silně hydrofobní konidie s rozmanitě strukturovaným povrchem. Primární adheze takovýchto konidií je zajištěna buď přímou interakcí mezi dvěma hydrofobními povrchy (konidie-kutikula hmyzu) nebo prostřednictvím elektrostatických sil, případně i molekulární interakcí mezi látkami, které jsou přítomny na povrchu konidií a kutikuly hostitele (např. hemaglutiny, N-acetylglucosamin, glykoproteidy, steroly, polární lipidy a jiné) (Boucias et al. 1988, Boucias and Pendland 1991, Sosa-Gomez et al. 1997).

Infekční cyklus má obecně následující fáze (dle Zimmermann 2007)

- (1) přichycení spor na kutikulu hostitele;
- (2) klíčení spor;
- (3) penetrace kutikuly;
- (4) překonání imunitních obranných reakcí hostitele;
- (5) růst uvnitř těla hostitele (parazitická fáze vývojového cyklu);
- (6) externí růst a konidiogeneze (saprofytická fáze vývojového cyklu)

Klíčení konidií přímo souvisí s jejich přichycením. Některé povrchové substance na konidiích a kutikule hostitele se účastní jak přichycení tak i indukce klíčení konidií (např. glykoproteiny a celý komplex uhlohydrátů) (Boucias, Pendland 1988). Jakmile se jednou spora přichytí na hmyzí kutikulu, může začít klíčit a produkovat penetrační struktury (např. zduřování klíční hyfy, tvorba apresorií), ze kterých se tvoří penetrační hyfy (Inglis et al. 2001). Častým místem penetrace jsou méně sklerotizované části na povrchu těla. Kromě přímé penetrace kutikulou, ke které používají kombinaci enzymů a mechanické síly (Butt 2002), využívají entomopatogenní houby k pronikání do tělní dutiny i přirozené otvory (Landa 1998). Jakmile se houba dostane do tělní dutiny bohaté na živiny, začne růst a tvořit tenkostěnné blastospory nebo hyfy (Butt et al. 1999). Blastospory se rychle namnožují (dělení pučením, exponenciální růst titru v hemolymfě) a ve velmi krátké době zcela vyplňují a mumifikují hostitele (Landa 1998). Mnoho kmenů tvoří histolytické enzymy nebo insekticidní metabolity. Ty mohou způsobit dezorientaci hostitele, zastavení příjmu potravy nebo smrt ještě před tím, než dojde ke kolonizaci tělní dutiny myceliem (Butt et al. 1999). Smrt hostitele je způsobena většinou kombinací působení houbových toxinů, fyzickým bráněním cirkulace hemolymfy, vyčerpáním živin a poškozením orgánů (Goettel, Inglis 1997). Po smrti hostitele roste houba saprotrofně. Následně hyfy prorůstají na povrch mrtvého těla, produkují konidiogenní buňky a začíná se objevovat sporulace. Konidie se šíří pasivně (Inglis et al. 2001). Jsou roznášeny větrem, deštěm nebo kontaktem s dalším hmyzem a šíří tak infekci (Coombs, Coombs 2003). Vlákňité houby rychle kolonizují hmyzí kadaver, zvláště pokud ještě není napaden žádným jiným patogenem (Goettel, Inglis 1997). Po uhynutí hostitele tvoří houba reprodukční spory uvnitř, na nebo okolo mrtvého těla hostitele. Mohou to být pohyblivé spory, odpočivné spory, konidie nebo spory vzniklé na sporangiích, které infikují další hmyz (Coombs, Coombs 2003). Saprophytická fáze patogena končí jeho úplnou sporulací (Osborne, Landa 1992).

Nové konidie si v přirozeně dormantním stavu udržují vitalitu po dobu několika týdnů až měsíců. Dočasná dormance konidií je ukončena šířením a adhezí konidií na povrchu těla nového vhodného hostitele (Landa 1998). Přirozené epizooecie jsou nejčastěji během vlhkých podmínek. Účinnost těchto hub proti hmyzím škůdcům závisí na přítomnosti správných druhů a kmenů hub a vnímavých stádií hmyzu za vhodné vlhkosti prostředí, půdní struktury a teploty (Coombs, Coombs 2003). V optimálních podmínkách (např. teplé mikroklima skleníků a foliových krytů) může být celý vývojový cyklus realizován v průběhu 3-5 dnů, v běžných podmínkách vegetačního období mírného pásma probíhá v rozmezí od 7 do 21 dnů (Landa 1998). Mohou tak decimovat např. mšice, larvy much na kořenech, housenky, koníky a populace třásněnek a proto mohou být důležitým přírodním faktorem v kontrole proti škůdcům plodin (Coombs, Coombs 2003).

Entomopatogenní houby produkují široké spektrum biologicky aktivních sloučenin působících proti ostatním organismům, většinou se jedná o sekundární produkty metabolismu (Butt 2002). Oosporein je sekundární metabolit produkovaný velkým množstvím půdních hub včetně rodu *Beauveria* (Vey et al. 2001) a má cytotoxické účinky, které uvádí Strasser et al. (2000). Beauvericin je produkovan entomopatogenními houbami rodu *Beauveria* a *Paecilomyces* spp. a saprofytním rodem *Fusarium* a způsobuje rozpad membrán (Steinrauf 1985). Dalším z produktů je např. bassianolide (Namatame et al. 1999). Hmyz napadený houbou vykazuje jako první příznaky drobné černé skvrny na kutikule, později zčerná celý, usychá a padá k zemi (Weiser 1991).

2.5.2. Šíření spor a podmínky prostředí

Vnímavost hostitele k infekci houbovým patogenem může ovlivnit mnoho faktorů. Jedná se o kmen houby, fyziologický stav hostitele, výživu, obranné mechanismy, kutikulární a epikutikulární mikroorganismy stejně jako mnoho dalších faktorů jako například prostředí (Goettel, Inglis 1997). Aplikace entomopatogenních hub neposkytuje vždy zaručené potlačení hmyzích škůdců. Faktory zodpovědné za iniciaci a rozvoj epizoozie v hmyzí populaci jsou silně komplexní, vyvolávající interakce mezi patogenem, hostitelským hmyzem, prostředím a časem. Porozumění této dynamice interakcí je velmi důležité a osvětlení faktorů, které limitují iniciaci a rozvoj choroby umožňuje překonat překážky a dosáhnout efektivní ochrany proti hmyzím škůdcům (Inglis et al. 2001).

Klíčovým faktorem prostředí je vlhkost. Klíčení konidií zpravidla vyžaduje relativní vlhkost vzduchu vyšší než 90% a i ostatní fáze vývoje probíhají nejrychleji při vyšších vlhkostech. Pouze v období od proniknutí patogena do tělní dutiny do opětovného prorůstání mycelia na povrch těla nejsou nároky na vlhkost v okolním prostředí tak vysoké. Teplotní tolerance entomopatogenních hub je poměrně velká. Délka vývojového cyklu probíhá v úzké korelaci s okolní teplotou. Optimální teploty charakterizuje rozmezí 20-30°C, krátkodobě mohou entomopatogenní houby přežít i vysoké teploty (40-45°C). Většina druhů entomopatogenních hub je dokonale adaptována i na dlouhotrvající nízké teploty a přežívá i dlouhodobé zmrazení. Ostatní abiotické faktory svým významem nedosahují relevance vlhkosti a teploty (Landa 1998). Faktor, který hraje výraznou roli v úspěchu entomopatogena je vývojové stádium hmyzu. Ne všechna stádia jsou stejně vnímavá k infekci entomopatogenními houbami (Inglis et al. 2001).

Vždy musí být brány v potaz podmínky prostředí panující během ošetření proti hmyzu a musí být vybrány vhodné houby resp. jejich propagule pro použití v inundativní biologické ochraně (Jackson et al. 2010). Konidie vláknitých hub jsou tlustostěnné buňky s velkou schopností přetrvávat v prostředí v širokém rozmezí podmínek (Wraight, Carruthers 1999).

Běžným mechanismem šíření houbových nákaz v populacích hmyzu je kontakt zdravých jedinců s jedinci infikovanými nebo tzv. autodiseminace, při které dochází k šíření konidií uvnitř populace v souvislosti se specifickými vnitropopulačními procesy (migrace, kopulace, kladení vajíček...). Doposud je známo jen málo případů šíření konidií entomopatogenních hub pomocí jiných biotických vektorů (např. roztoči, háďátka, jinými druhy hmyzu), nicméně i tyto mechanismy se při šíření hub v některých případech výrazně uplatňují (Landa 1998). Šíření a přežívání mikroorganismu je silně ovlivněno několika dalšími abiotickými a biotickými faktory (Zimmermann 2007). Hlavními faktory, které ovlivňují úspěch entomopatogenních hub je sluneční záření, teplota, dostupnost vody, srážky a vítr (Inglis et al. 2001). Šíření a mechanismy zajišťující jejich primární kontakt s hostitelem jsou procesy převážně nahodilé (Landa 1998). Většina, ne-li všechny entomopatogenní houby, synchronizují svůj životní cyklus se stádiem hmyzích hostitelů a podmínkami prostředí (Shah, Pell 2003).

Teplota

Kritické faktory prostředí, jako je teplota, mohou mít vážný vliv na růst a patogenitu houbového entomopatogena proti cílovému hmyzu (Faria, Wraight 2001). Teplo a chladno jsou dva velmi důležité abiotické faktory prostředí, které omezují používání entomopatogenních hub jako biogans v ochraně proti hmyzu (Hallsworth, Magan 1999; Fernandes et al. 2008). Teplota může ovlivnit entomopatogena v různých směrech ovlivňováním klíčivosti, růstu a vitality houby na a v hostitelském hmyzu a v prostředí (Zimmermann 2007). Některé teploty mají výrazný efekt také na mortalitu škůdce (Lecuona

et al. 2005). V suchých a chladných podmínkách zůstává infikovaný hmyz často neporušený jako „mumie vyplněná houbou“, houba začne prorůstat na povrch a sporulovat až při vhodných podmínkách pro její růst a vývoj (Goettel, Inglis 1997).

Teplota je jedním z hlavních faktorů ovlivňujících účinnost entomopatogenů. Je dobře zdokumentováno, že okolní teplota ovlivňuje úroveň napadení a čas potřebný k usmrcení hostitele ošetřeného entomopatogenní houbou (Inglis et al. 2001). *B. bassiana* roste v širokém rozmezí teplot (8-35°C) (Fargues et al. 1997). Optimální teplotní zóna aktivity většiny entomopatogenních hub se pohybuje v rozmezí 20 – 30°C. Klíčení konidií probíhá nejrychleji při teplotách okolo 25°C (McCoy et al. 1988). Podle Inglise et al. (2001) je to 20 až 25°C, ale infekce a onemocnění se mohou objevit v rozmezí teplot 15-30°C. Nad 30°C se vegetativní růst většiny čeledí inhibuje a řádově ve 37°C se zastavuje úplně. Některé studie ukazují, že *B. bassiana* by mohla lépe snášet vyšší teploty (Shimazu 2004) a nízké teploty mohou redukovat nebo zastavit klíčení a růst a narušit nebo prodloužit tak úspěšnou infekci (Zimmermann 2007). Na druhé straně některé genetické skupiny rostou průkazně lépe v nižších teplotách, protože původ izolátu ovlivňuje jeho termotoleranci (Bidochka et al. 2002) a vysoká teplota obecně klíčení houby a šíření choroby redukuje (Sun et al. 2003). V podstatě když amplituda teploty stoupá, růst hub *B. bassiana* a *M. anisopliae* klesá (Inglis et al. 1999).

Mnoho výzkumníků se zabývá možností výběru genotypů majících specifické teplotní charakteristiky (např. vyšší optimální teploty) ze specifických geografických oblastí (např. pochází-li izolát z teplé oblasti, může být tolerantnější k vyšším teplotám nebo naopak, pokud pochází z chladného klimatu, bude účinnější v nízkých teplotách) (Inglis et al. 2001). Některé studie zaznamenaly pouze nízký nebo dokonce žádný vliv geografického původu na teplotní charakteristiky (McCammon, Rath 1994; Fargues et al. 1997; Ouedraogo et al. 1997). Existuje velká fenotypová a genotypová variabilita mezi kmeny entomopatogenních vláknitých hub, která ovlivňuje jejich přežívání na stanovišti (Goettel, Inglis 1997). Vidal et al. (1997) pozorovali silnější spojení mezi teplotní charakteristikou in vitro a místem původu. Rovněž zjistili výraznou variabilitu mezi izoláty *I. fumosorosea* a jejich schopností růst v různých teplotách.

Sluneční záření

Konidie, hyfová tělíska i hyfy všech čeledí Hyphomycetes jsou velmi citlivé k poškození slunečním zářením (Inglis et al. 2001). U všech entomopatogenních hub může jeho vlivem dojít ke škodlivým změnám, zejména podílem ultrafialových paprsků UVB spektra (285-320nm) a UVA spektra (320-400nm). Viditelné záření a infračervené záření je méně škodlivé než záření UV (Fargues et al. 1997). Nejškodlivější je ultrafialové záření-B (Fargues et al. 1996). Je to jedna z věcí, která způsobuje inaktivaci bioagens, jeho vysoké hodnoty mohou vést k rychlé degradaci materiálu i během jediného dne (Butt et al. 1999).

Vlhkost

Nároky na relativní vzdušnou vlhkost zpravidla výrazně stoupají v období sporulace. Většina entomopatogenních hub dobře sporuluje při relativní vzdušné vlhkosti nad 95% (Hall 1981). V přirozeném prostředí si živý organismus vytváří na povrchu pokožky vrstvičku nasycenou vodními parami (Weiser 1966). Relativní vzdušná vlhkost v kombinaci s teplotou ovlivňuje vypařování kapek, což může způsobit ztrátu malých částic a tím nepříznivě ovlivnit přesnost aplikace. Navíc vlhkost může mít velmi významný vliv na přetrvávání inokula v prostředí. Voda není důležitá pouze pro vyklíčení spor, ale rovněž reguluje konidiogenezi na těle uhynulého hmyzu. Každopádně, konidiogeneze na povrchu hmyzu vyžaduje vysokou vlhkost a produkce konidií může ovlivnit horizontální šíření patogena (Inglis et al. 2001).

2.6. Houby rodu *Beauveria*

Kolonie jsou většinou pomalu rostoucí, vatovité, zpočátku bílé, později často přechází do žlutavé až narůžovělé barvy. Rod *Beauveria* je charakteristický sympodiálním vývojem jednobuněčných konidií (amerokonidie) v cik-cak postavení na konidioforu. Konidiogenní buňky jsou lahvicovitého tvaru a jsou často seskupeny do sporodochií nebo synnemat. Konidie jsou hyalinní a kulaté nebo ovoidní (Anonym 2010).

2.6.1. Taxonomické zařazení rodu do systému

První taxonomickou revizi rodu *Beauveria* provedl MacLeod v roce 1954. Studie zahrnuje morfologické charakteristiky a charakteristiky kultur řady izolátů a druhů rodu *Beauveria*. 14 dříve popsaných druhů bylo popsáno jako synonyma druhu *B. bassiana* a *B. tenella*. *B. stephanoderis*, *B. laxa*, *B. globulifera*, *B. effusa*, *B. vexans*, *B. doryphorae*, *B. delacroixii* a *B. acridiorum* byly zahrnuty pod druh *B. bassiana*, zatímco *B. densa*, *B. melolonthae*, *B. brongniartii* a *B. shiotae* pod druh *B. tenella*. Později De Hoog v roce 1972 omezil rod *Beauveria* Vuill. na tři druhy : *B. bassiana*, *B. brongniartii* a *B. alba* (Zimmermann 2007).

Taxonomické zařazení rodu je možné dvěma způsoby. Jeden na základě anamorfy, čili nepohlavního stádia a druhý na základě teleomorfy, tedy pohlavního stádia.

Taxonomické zařazení hub rodu *Beauveria*

Řazení na základě anamorfy (Váňa 1998)	Řazení na základě teleomorfy (Sung et al. 2007)
Třída : Ascomycetes Pomocné pododdělení : Deuteromycotina Pomocná třída : Hyphomycetes Pomocný řád : Moniliales Rod : <i>Beauveria</i>	Třída : Ascomycetes Řád : Hypocreales Čeleď : Cordycipitaceae Rod : <i>Beauveria</i>

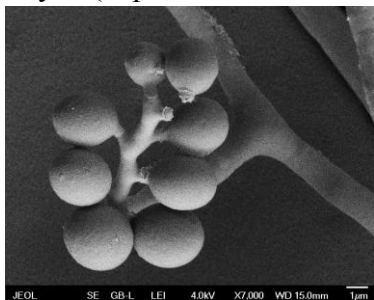
V systému řazení teleomorfy byly v posledních letech prováděny změny, jak uvádí Sung et al. (2007) v čeledi Clavicipitaceae došlo k reklasifikaci a jejímu rozdělení na tři samostatné čeledi – Clavicipitaceae, Ophiocordycipitaceae a Cordycipitaceae. Do poslední jmenované čeledi je řazen i rod *Beauveria* a tato čeleď byla ustanovena na základě typu představovaného rodem *Cordyceps*, zahrnuje většinu jeho druhů, které mají světle zbarvená mohutná stromata.

Klasifikace parazitů obratlovců dříve řazených v čeledi Clavicipitaceae (dle Sung et al. 2007; Blackwell 2010)

Clavicipitaceae	Cordycipitaceae	Ophiocordycipitaceae
<i>Conoideocrella</i> , <i>Hypocrella</i> , <i>Metacordyceps</i> , <i>Moelleriella</i> , <i>Orbiocrella</i> , <i>Regiocrella</i> , <i>Samuelsia</i> , <i>Shimizuomyces</i> , <i>Villosiclava</i> (většina anamorf: <i>Metarhizium</i> , <i>Paecilomyces</i> s.l. <i>Pochonia</i>), a další	<i>Ascopolyporus</i> , <i>Cordyceps</i> , <i>Hyperdermium</i> , <i>Torrubiella</i> , (většina anamorf: <i>Akanthomyces</i> , <i>Beauveria</i> , <i>Isaria</i> , <i>Lecanicillium</i> , <i>Simplicillium</i>)	<i>Cordyceps</i> s.l., <i>Elaphocordyceps</i> , <i>Ophiocordyceps</i> (většina anamorf: <i>Haptocillium</i> , <i>Hirsutella</i> , <i>Hymenostilbe</i>)

2.6.2. Nejznámější druhy rodu *Beauveria*

Rod *Beauveria* (nejvýznamnější zástupci *B. bassiana*, *B. brongniartii* a *B. tenella*) reprezentují převážně široce polyfágní houby, které se běžně vyskytují v půdě a parazitují na půdním hmyzu, resp. na stádiích hmyzu, která se vyskytují v půdě (např. při přezimování). V sortimentu hostitelů jsou zastoupeni zástupci z řádů rovnokřídlí (např. krtonožky), brouci (např. larvy a kukly chroustů a chroustků, mandelinky bramborové, lalokonosců a mnoho dalších druhů), larvy a kukly motýlů a dvoukřídlého hmyzu. V poslední době byly izolovány i kmeny *B. bassiana*, které vykazují vysokou virulenci na různých druzích stejnokřídlého hmyzu (např. na molících a mšicích) (Landa 1998).



Konidiofor houby *B. bassiana* s konidii

Rod *Beauveria* produkuje hydrofobní konidie a to díky přítomnosti proteinů bohatých na cystein uvnitř svrchní vrstvy buněčné stěny, které se nazývají hydrofobiny (Inglis et al. 2001) a zajišťují stabilitu v prostředí (Wraight et al. 2001). Hydrofobiny jsou jedinečné pro houby a není známa jejich přítomnost u jiných organismů (Wessels 2000). Konidie jsou suché, malé, téměř kulaté, $\leq 3,5\mu\text{m}$ v průměru (Humber 1997) a jsou produkovány v prášivých shlucích. Z toho důvodu jsou snadno roznášeny větrem (Zimmermann 2007).

Beauveria bassiana (Balsamo-Criv.) Vuillemin

Druh *B. bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin byl poprvé popsán zhruba před 170 lety. Houbu *B. bassiana* objevil v roce 1834 Aogostino Bassi. Determinaci entomopatogenní houby provedl v roce 1835 Giuseppe Balsamo Crivelli a zařadil ji do rodu *Botrytis* (*Botrytis paradoxa*), později změnil označení na *Botrytis bassiana* na počest jejího objevitele. V roce 1912 provedl Vuillemin revizi systematického zařazení a do dnešní doby je respektováno jeho zařazení do rodu *Beauveria* a označí druhu *bassiana* (Diribeková 1991).

Je nejrozšířenějším druhem rodu a je považována za houbu, která může a měla by být využívána v ochraně proti hmyzím škůdcům (Zimmermann 2007). Přirozeně se nachází na některých rostlinách nebo v půdě a byla izolována z velké škály druhů napadeného hmyzu (Coombs, Coombs 2003). Je známa svým širokým hostitelským spektrem (Shimazu et al. 2002), parazituje na mnoha zástupcích z řádu *Orthoptera*, *Coleoptera*, *Lepidoptera* a *Diptera* (Inglis et al. 1996; Chikwenhere, Vestergaard 2001) a je studována v mnoha oblastech jako jedno z důležitých mikrobiálních bioagens (Shimazu et al. 2002), nabízející alternativu k chemickým pesticidům (McGuire et al. 2005).

B. bassiana je charakteristická tvorbou bílých, později nažloutlých nebo příležitostně i načervenalých kolonií. Spodní strana je bezbarvá nebo může přecházet od nažloutlé do narůžovělé barvy (Zimmermann 2007). Obecně je známa jako bílá muskardina (Coombs, Coombs 2003). Konidiogenní buňky mají kulatou nebo lahvicovitou bazální část, konidie jsou v cik-cak postavení na konidioforu (Zimmermann 2007), po jedné na každém zoubku zubovitého konidioforu a jsou nepřehrádkované (Humber 1997). Když dozrávají tak se oddělují na úzkém krčku. Vznik konidií je holoblastický, na témže místě se tedy další konidie netvoří (Kiffer, Morelet 2000).



Ips typographus napadený houbou *B. bassiana*

Oblast, která není zatím příliš prozkoumaná je endofytický růst mitosporických hub, o kterém hovoří ve vztahu ke kukuřici Inglis et al. (2001). Rostliny kukuřice byly vnitřně kolonizované houbou *B. bassiana* a další studie potvrdily, že houba se dostává do rostlinných pletiv a zůstává tam po celou sezónu (Bing, Lewis 1991). Tvoří tak s rostlinami kukuřice vztah, díky němuž může navodit sezonní supresi zavíječe kukuřičného (Coombs, Coombs 2003).

***Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch**

B. brongniartii je méně běžná než *B. bassiana*, ale rovněž je celosvětově rozšířena na hmyzu stejně jako v různých dalších prostředích. Byla zaznamenána v otevřených rašeliništích, vysokohorských oblastech, lesích a na dalších místech (Zimmermann 2007).

Pro houbu *B. brongniartii* je charakteristická tvorba z počátku bílých, později nažloutlých až narůžovělých, někdy i načervenalých kolonií. Elipsoidní konidie o velikosti 2,5-4,5 μ m se shlukují, jsou uspořádané do malých skupinek či samostatně (Zimmermann 2007).

Je to entomofágní houba, která je používána komerčně v ochraně proti larvám chroustů (*Melolontha melolontha*). V Japonsku jsou spory *B. brongniartii* produkovány ve formulaci s otrubami a jsou používány jako ochrana proti tesaříkům (*Psacotha hilaris*) na mandarinkovnících. V Peru proti nosatcům na bramborách stejně jako proti široké škále dalšího hmyzu, zahrnující molice, třásněnky, mšice, svilušky, zavíječe (*Ostrinia furnacalis*, *O. nubilalis*). Může být použita na zemědělské komodity a bavlnu, stejně jako okrasné rostliny, travníky a rašelinu (Coombs, Coombs 2003).

2.7. Další entomopatogenní houby

***Isaria fumosorosea* (Wize) Brown & Smith**

I. fumosorosea (dříve *Paecilomyces fumosoroseus*) má podlouhlé, vejčité konidie, $\leq 4\mu$ m dlouhé, ve větších množstvích světle růžové až šedorůžové barvy (Humber 1997). Změna barvy kolonií přímo souvisí se stupněm sporulace kultury. Starší, plně sporulující kultury, mají až šedofialové zbarvení a vatovitý charakter kolonie se mění v prašný, s povrchem zcela pokrytým obrovským množstvím konidií (Landa 1994). V případě optimálních podmínek způsobuje rychlé infekce a smrt u všech vývojových stádií molice (Osborne et al. 1990).

Je jedním z nejběžnějších houbových patogenů napadajících molice a je zodpovědný za epizootie, které mohou výrazně ovlivňovat populace škůdce jak ve skleníku, tak v polních podmínkách (Lacey et al. 1996). Optimální růst je mezi 20 a 30°C (Vidal et al. 1997). *I. fumosorosea* je geograficky široce rozšířený druh, který může infikovat různé řády hmyzu ve všech vývojových stádiích a může být často izolován z půdních vzorků (Samson 1974). *I. fumosorosea* může být použita na ochranu proti broukům, mravencům, stejně jako molícím (Coombs, Coombs 2003). Kavková a Čurn (2005) uvádí i pokusy, které byly prováděny na *Sphaerotheca fuliginea* (padlí okurkové), ve kterých došlo díky *I. fumosorosea* k potlačení vývoje a šíření patogena.

***Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin**

Houba *Metarhizium anisopliae* byla poprvé popsána jako entomopatogen proti brouku z čeledi Scarabidae *Anisoplia austriaca* Metschnikoffem v roce 1879 a původně nazvaná *Entomophthora anisopliae* (Zimmermann 1993).

Mycelium zcela pokrývá napadeného hostitele, konidiofory jsou v kompaktních shlucích, jednotlivé konidiofory se široce větví, konidiogenní buňky tvoří husté hymenium. Konidie jsou nepřehrádkované, cylindrické nebo vejčité a tvoří řetízky. Velikost konidií je $\geq 9\mu\text{m}$ (Humber 1997). Konidiofory se často shlukují a tvoří sporodochia, jednoduchá nebo větvená, nesoucí konidie na fialidách na větvích, fialidy jsou na konci zašpičatělé (Watanabe 2002). Je uváděno, že houba infikuje více než sto druhů hmyzu z rozdílných řádů, především *Orthoptera*, *Hemiptera*, *Coleoptera*, *Diptera*, *Lepidoptera* a *Hymenoptera* (Zimmermann 1993).

Houba *M. anisopliae* je registrovaná ve Spojených státech na ochranu proti švábům v domácnostech. V Jižní Americe je používána proti křísům (*Cercopidae*). V jihovýchodní Asii je tato houba využívána proti škůdcům palmových ořechů (nosorožci, mandelinky, atd.). Byla také zkoumána proti chroustům na pastvinách (*Aphodius tasmaniae*), termitům (*Nasutiterenes exitiosus*), škůdcům na cukrové třtině, pekanových ořeších a černé révě. *M. anisopliae* produkuje množství insekticidních toxinů zahrnujících destruxin E, který je aktivní proti mnoha druhům mšic (Coombs, Coombs 2003).

***Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams**

Lecanicillium lecanii je dobře známá a rozšířená entomopatogenní houba. Dříve známá pod názvem *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas. V roce 2001 provedli Zare a Gams revizi rodu a přejmenování druhu na *Lecanicillium lecanii*.

Mycelium je bílé nebo krémové. Na vzdušném myceliu se vytvářejí dlouhé úzké lahvicovité konidiofory, na jejichž koncích se postupně tvoří elipsoidní konidie. Konidiofory jsou v přeslenech a z jednoho místa protilehle vyrůstají 2, 3 až 4 konidiofory. Na koncích hyf může být přeslen tvořen i více konidiofory. Konidiofory jsou vytvářeny postupně a nová konidie odtlačuje dříve vytvořenou konidii do shluku, který má podobu kuličky. V závěru sporulace se kuličky pokrývají mucilagenní hmotou, která udržuje kompaktní tvar finálního útvaru (Hall 1985).

Houba má extrémně široké hostitelské spektrum, které zahrnuje mšice (Sopp et al. 1990), červce (Hall 1981), molice (Hall 1982, Ravensberg et al. 1990), třásněnky (Schreiter et al. 1994), fytopatogenní houby (Verhaar et al. 1998) a parazitická háďata rostlin (Eapen et al. 2005; Shinya et al. 2008). Houba *Lecanicillium* spp. je rovněž schopna potlačovat řadu houbových patogenů rostlin, jako padlí, rzi, plísně nebo *Pythium* (Goettel et al. 2008).

2.8. Kultivace entomopatogenních hub v podmínkách in vitro

Většina entomopatogenních vláknitých hub roste na mnoha běžných druzích umělých médií, překvapivě málo z nich je složité pěstovat v in vitro podmínkách nebo pouze se zvláštními požadavky na živiny (Humber 1997). Většina entomopatogenních hyfomycet jsou fakultativní patogeny a relativně snadno rostou v čistých kulturách na definovaných nebo polo-definovaných médiích (Goettel, Inglis 1997). Na rozdíl od dalších patogenů rostou houby dobře na jednoduchých a levných médiích. Tato charakteristika, společně s jejich relativně širokým hostitelským spektrem dělá z houbových patogenů potenciální vhodné kandidáty pro komerční produkci (Hagler 2000).

Produkce je jedním z kritických bodů vývoje houbových bioagens (Jackson et al. 2010). Statut fakultativních parazitů umožňuje produkci biomasy infekčních jednotek (konidií resp. blastospor) pomocí velkokapacitních biotechnologií, což je základní technologický předpoklad pro vývoj a tržní realizaci standardního biopreparátu (Landa 1998). Výsledné bioagens musí poskytovat cenovou výhodu pro konečného uživatele (nízká cena), mít přiměřeně dlouhou životnost a poskytovat vyrovnanou ochranu v polních podmínkách (působit dobře v prostředí, kam je aplikováno). Tyto cíle produkce se však často dostávají do rozporu s ekologickými a místními požadavky na trvalou infektivitu a ochranu proti cílovému hmyzu (Jackson et al. 2010).

Technologické výhody při produkci, formulaci a přežívání přispěly významně k využívání mykoinsekticidů v praktickém boji proti hmyzu, který může v určitých situacích ekonomicky konkurovat chemickým insekticidům (Menn, Hall 1999). Ekonomicky výhodná produkce stálého inokula je zásadní věc pro úspěšné zavádění houbových bioagens (Butt et al. 2001). Je třeba najít velmi virulentní kmeny s nízkými náklady na produkci, aby bylo možno realizovat výsledný produkt (Butt 2002).

Povrchová kultivace

Většina entomopatogenních vláknitých hub produkuje velké množství malých (<10 μ m) hydrofobních konidií v kompaktních shlucích (Wraight et al. 2001). Biotechnologie jejich produkce imituje přirozený cyklus, při kterém je zprvu vytvořena povrchová myceliální biomasa a na konci cyklu se na vzdušném myceliu tvoří konidie (Landa 1998). Je známo, že houby mohou klíčit, růst a produkovat konidie navzdory variabilitě ve velikosti kolonií a potenciálu k produkci konidií (Feng et al. 1994).

Pro produkci konidií se používají povrchové kultury (Goettel, Inglis 1997). Kultivace probíhá na pevné nebo tekuté půdě nebo substrátu (agar, řepa, brambor, rýže, proso, sladinka, Sabouraud agar apod.) při nerušeném růstu (Weiser 1991). Sabouraud's dextrose agar obohacený kvasnicovým extraktem (SDAY) je jedním z nejpoužívanějších médií. Dále jsou běžně používány agary jako cornmeal agar (CMA), Czapeck-Dox, malt extract agar (MEA), nutrient agar (NA), potato dextrose agar (PDA), Sabouraud's maltose agar (Goettel, Inglis 1997) a yeast petpone dextrose agar (YPDA) (Kamp, Bidochka 2002). Pro produkci většího množství konidií se používají levnější živné substráty jako je rýže, otruby nebo obiloviny (Goettel, Inglis 1997), případně zbytky z brambor nebo vylisovaná cukrová třtina (Dalla Santa et al. 2004).

Výtěžnost konidií může být omezena nejen médiem, ale i velikostí konidií. Např. u houby *B. bassiana* je oproti ostatním entomopatogenním houbám dosahováno nejvyšší výtěžnosti, vzhledem k tomu, že její konidie jsou relativně malé (Wraight, Carruthers 1999). Dvě třetiny komerčních produktů zahrnují preparáty na bázi konidií houby *B. bassiana* nebo

M. anisopliae, k jejichž získávání se pravděpodobně využívá produkce na pevných substrátech (Jackson et al. 2010).

Submerzní kultivace

Submerzní kultivace se používá pro produkci mycelia, blastospor a v některých případech konidií (Goettel, Inglis 1997). Blastospory jsou buňky podobné konidiím, ale s tenčí stěnou a méně odolné (Weiser 1991). Mnoho druhů entomopatogenních hub může být produkováno v submerzních kulturách, kde se tvoří podmínky podobné jako v hemolymfě hostitele a houba pak tvoří již zmíněné typické oválné jednobuněčné blastospory (Wraight, Carruthers 1999). Produkce blastospor a dalších propagulí ze submerzní kultivace je méně efektivní než produkce vzdušných konidií (Wraight et al. 2001). Blastospory entomopatogenních hub jsou produkovány ve fermentačních biotechnologiích (submerzní kultivace v tekuté živné půdě) a využívají fenoménu změny morfologické formy patogena po proniknutí do semi-aerobních podmínek tělní dutiny (Landa 1998).

Vliv kultivace na vlastnosti spor

Víme, že podmínky kultivace mohou velmi výrazně ovlivnit toleranci houby *B. bassiana* např. k teplotnímu stresu (Ying, Feng 2006). Je důležité objasnit teplotní optimum a teplotní limity pro kultivaci hub, aby mohla být optimalizována produkce (Shimazu 2004). Optimální teplota růstu je 23 – 26°C, maximální teplota pro růst mycelia je 28 – 31°C (Dirlbeková 1991). Ovšem toto rozmezí neplatí pro všechny kmeny stejně.

Výběr fermentačního média (tzn. pevné fáze nebo submerze), koncentrace fermentačních složek, přenos kyslíku, teplota pro inkubaci, doba ukončení růstu a následné úpravy (Stowell 1991; Montazeri and Greaves 2002) vyžadují intenzivní výzkum pro určení optimálních podmínek, které poskytují velké, stabilní a účinné mikrobiální populace.

Produkce se dá výrazně ovlivnit složením média. Přizpůsobení nutričních podmínek během růstu a sporulace blastospor houby *B. bassiana* ovlivňuje jejich životnost (Lane et al. 1991). Koncentrace uhlíku a dusíku v médiu ovlivňuje produkci blastospor *I. fumosorosea* a jejich odolnost proti vysychání (Cliquet, Jackson 1997). A je důležité i množství dostupných živin, které mají výrazný vliv na růst kultury, sporulaci a morfologii entomopatogenních hub. Růst a sporulaci kultury lze ovlivnit nejen výběrem média, ale i jeho mocností (objemem média v jedné Petriho misce) (Kamp, Bidochka 2002). Kultivačním médiem lze ovlivňovat i životnost konidií (Derakhshan et al. 2008).

Je třeba zmínit, že živným médiem lze ovlivnit nejen růst kultur vzhledem ke zvyšování výtěžnosti propagulí, ale může dojít i k negativnímu ovlivnění kultury a to tak, že dlouhodobá kultivace na umělých médiích povede až ke změnám fenotypu (např. snížení virulence) (Goettel, Inglis 1997), případně dalších vlastností, což je označováno jako oslabení houby a může být definováno jako omezení vitality, hustoty a již zmíněné schopnosti napadat patogena. V případě entomopatogenních hub může vzniknout v důsledku jednorázové nebo opakované kultivace na umělém živném médiu (Butt 2002). Při opětovné kultivaci kmenů entomopatogenních hub na umělých živných médiích může docházet ke snižování virulence k cílovému organismu nebo může dojít až k úplné ztrátě virulence (Brownbridge et al. 2001, Goettel 1992). Je tedy důležité pasážovat kmeny přes hostitele (Hirte et al. 1989).

Rychlost snižování až úplné ztráty virulence závisí více na jednotlivém kmenu než na druhu či rodu entomopatogenní houby. Některé kmeny jsou schopny si svou virulenci udržet i po dlouhodobé opakované kultivaci *in vitro*, např. *B. bassiana* (Inglis et al. 2001).

2.9. Formulace spor entomopatogenních hub

Existuje velká škála formulací v souvislosti s požadovaným způsobem použití. V celé řadě formulací se biopesticidy překrývají s chemickými pesticidy. Stejně jako u chemického pesticidu je formulace důležitou součástí úspěšného využívání entomopatogenních hub (Wraight, Carruthers 1999). Efektivní formulace je nutností pro převedení laboratorní práce na použití v přirozeném prostředí. V ideálním případě by měl formulovaný materiál vykazat vyšší účinnost v porovnání s neformulovaným (Rhodes 1990). Některé formulace mohou zvýšit virulenci houby zlepšením přilnavosti spory k povrchu hostitele, rozpouštěním fungistatických sloučenin ve voscích epikutikuly a podporou klíčení (Butt et al. 2001).

Formulace jako taková má několik základních cílů, které zahrnují zlepšení pokryvnosti postřiku, zvýšení bezpečnosti, jednoduchou manipulaci, zlepšení stability během skladování (především v pokojové a vyšší teplotě), zlepšení stability v prostředí a v neposlední řadě zvýšení účinnosti (Wraight, Carruthers 1999).

Složkami formulace jsou – účinná látka, tzn. jednotlivý mikroorganismus nebo spora, další součástí je nosič, kterým je často inertní materiál používaný jako podpora a přenašeč populací účinných agens k cíli a jako poslední jsou zde adjuvanty a složky, které podněcují a podporují funkci aktivních látek. Každá ze zmíněných složek má svou konkrétní funkci.

Složky formulace musí : (Jones, Burges 1998)

- zajišťovat stabilitu během výroby biopesticidu, manipulace a skladování
- usnadňovat aplikaci
- chránit biopesticid za nepříznivých podmínek
- podporovat aktivitu biopesticidu směrem k cílovému organismu

Formulace aplikované do půdy a na semena vyžadují aktivní složku, která je dormantní během skladování a přizpůsobená podmínkám prostředí, kterým je vystavena po aplikaci; adjuvanty, které stabilizují a chrání aktivní složky před desikací a dalšími nepříznivými podmínkami prostředí, ale dovolují rychlé šíření biopesticidu v příznivých podmínkách; živiny, které podporují biopesticid do doby, než dojde ke kolonizaci rhizosféry nebo spermosféry. Listové aplikace biopesticidů umožňují využívat formulace s různými přísadkami adjuvantů, které vyhovují jejich potřebám (Murillo et al. 2003).

Dále musí zajišťovat stálost na povrchu cílového organismu za různých podmínek prostředí (např. při dešti), udržují vlhkost a chrání proti vysychání nebo podporují šíření a rozptylování biopesticidu (Burges 1998; Boyetchko et al. 2002).

Jak již bylo mnohokrát shrnuto je hlavním požadavkem pro úspěšné využívání hub v biologické ochraně infektivita a perzistence inokula v prostředí. Je dobře zdokumentováno, že tyto vlastnosti vzrůstají s přísadkou oleju (Moore, Prior 1993), které pravděpodobně chrání konidie proti vysychání, zlepšují jejich přilnavost a šíření inokula po těle hostitele (Vimala Devi, Prasad 1996).

Pevné formulace

V souvislosti s pevnými formulacemi se často hovoří o různých druzích nosičů, které se liší svým charakterem. Nejčastěji jsou takoveto biopreparáty finalizovány do formy smírlivých, ve vodě rozpustných prášků (WP) nebo granulí (WDG) (Landa 1998). Jsou dva základní typy, jedná se o nosič inertní nebo nutritivní. Inertní nosič neposkytuje žádné živiny a má za úkol pouze mechanicky chránit formulovanou sporu, případně zlepšovat možnosti jejího šíření. Nutritivní nosič na druhé straně může mít stejné vlastnosti jako inertní s tou výhodou, že rovněž poskytuje výživu propagule po jejím zavedení do prostředí. Stejná pravidla se týkají i využívání plnidel při tvorbě granulí a dalších pevných formulací. S ohledem na finalizaci je možné použít velké množství nosičů. Je nezbytné, aby si konidie izolátu vybraného pro výrobu mykopesticidu udržely vysokou životnost v suché práškové formě (Consolo et al. 2003). Na trhu byly produkty (Boverol a Boverosil) jejichž základem jsou vzdušné konidie různých kmenů houby *B. bassiana* upravených s plnidlem siloxid tak, že funguje jako suchý popraš nebo jako vodní suspenze (Weiser 1991).

Bez vhodné formulace není možné mitosporické houby účinně využívat. Murillo et al. (2003) uvádějí, že biopesticidy aplikované do půdy ve formě granulí nebo ve formulaci aplikované na semenech (např. v kaolinu, kapalně, mikrokapsulích, rašelinném prášku), jsou velice vhodné pro ochranu obilnin před půdními fytopatogeny, fytopatogeny napadajícími kořeny a půdním hmyzem osidlujícím kořeny. Landa et al. (2002) rovněž uvádějí formulační formy vhodné pro aplikace do půdy (WP, WDG, lyofilizované mycelium, myceliální granule) a použití rozmanitých forem jejich aplikace (postřik, injektáž, moření, introdukce granulí a pelet).

Je řada nosičů, které mohou zvyšovat účinnost formulovaného bioagens, např. Pereira a Roberts (1990) prokázali, že takovou schopnost mají formulace v obilném škrobu u biologické ochrany prováděné prostřednictvím hub *M. anisopliae* a *B. bassiana*. Formulace obsahující živiny, které zvyšují rychlost klíčení spor rovněž prokázaly zlepšení efektivity biologické ochrany nejen prostřednictvím konidií *B. bassiana*, ale i *I. fumosorosea* (James 2001). Jako nosiče pro přípravu finalizací je možné použít běžně dostupné materiály, které nejsou ani příliš drahé. Dá se použít například pšeničná, kukuřičná nebo ječná mouka, bramborový škrob nebo semolinová drť (Al-Mazra'awi et al. 2007).

Olejové formulace

Další metodou je suspenze spor v olejích, jejímž účelem je vytěsnit kyslík od organismu, tudíž zabránit dýchání (Butt et al. 1999) a umožnit tak dlouhodobější skladování. Pro formulování mykoinsekticidů se používají jak rostlinné tak minerální oleje. Rostlinné oleje mají výhodu v tom, že jsou přijatelné pro systém organické produkce (Wraight et al. 1999). Luz a Batagin (2005) testovali 11 komercializovaných olejových extraktů z různých rostlin. Jednalo se o lněná semena (*Linum usitatissimum*), sojové boby (*Glycine max*), podzemnici olejnou (*Arachis hypogaea*), řepková semena (*Brassica rapa*), bodlák (*Carduus* sp.), slunečnici (*Helianthus annuus*), olivy (*Olea europaea*), sezam (*Sesamum indicum*), kukuřici (*Zea mays*), skočec obecný (*Ricinus communis*) a olejovou palmu (*Orbygnia speciosa*). Všechny oleje byly získávány z organicky pěstovaných rostlin, které nikdy nebyly ošetřeny syntetickými pesticidy.

Olejové suspenzní koncentráty jsou poměrně častou formulací. K aplikaci lze použít standardní aplikační techniku. Při aplikaci je třeba respektovat „kontaktní účinek“ preparátů (nutnost adheze konidií/blastospor na povrch těla cílového druhu hostitele). Při ošetření nadzemních částí rostlin je nutné pečlivě ošetřit niky, ve kterých se vyskytuje cílový druh škůdce (Landa 1998). Olejové nosiče mají mnoho výhod. Jednou z nich je fakt, že mohou

zanést inokulum přes kutikulu hmyzu, často přenášejí konidie přes tenké mezičlánekové membrány, které jsou častěji penetrovány entomopatogenními houbami (Butt et al. 1999). Dále jsou vysoce kompatibilní s lipofilními konidii stejně jako s cílovým systémem kutikula hmyzu-pokožka rostliny a redukuje ztrátu vlhkosti. Cukry, které mohou být součástí těchto formulací pak podporují konzumaci a trávení hmyzími škůdci (Murillo et al. 2003). Navíc již přímá aplikace konidií ve formulaci oleje s vodou na hmyz, indukuje významnou mortalitu mezi larvami třetího instaru *Triatoma infestans* (Luz, Batagin 2005).

Používání olejů navíc zvyšuje účinnost myko-insekticidů, -herbicidů a -fungicidů, protože mohou znemožnit patogenům aktivitu v podmínkách nízké vlhkosti a proto tvoří možnosti pro rozšíření spektra jejich aplikací (Bateman, Alves 2000). Formulace v oleji může rozšířit možnosti aplikace druhů s lipofilními konidii do zemědělských oblastí kde je nízká vlhkost (Bateman et al 1993). Další nespornou výhodou je fakt, že formulace myko-insekticidů v olejích prezentují zvláštní možnosti využití ULV (ultra-low volume) aplikace (Bateman, Alves 2000) a tím i používání menších dávek přípravků.

Kvalitativní a kvantitativní složení mastných kyselin, které jsou součástí rostlinných olejů a surfaktanty, stejně tak jako složení hmyzí epikutikuly ovlivňují vývoj houby (Luz, Batagin 2005). Bylo prokázáno, že rostlinné oleje byly, co se týče zabránění usazování konidií, lepší než oleje minerální a že čím vyšší je viskozita oleje, tím nižší je úroveň usazování. Ovšem není možné připravovat olejový koncentrát, ve kterém se používá příliš viskózní olej a tudíž je např. kukuřičný olej jakýsi kompromis (Milner 2000). Navíc oleje, které vytváří film na kutikule působí jako anti-evaporanty a surfaktanty jako zvlhčovač (vzhledem k tomu, že jejich hydrofilní složky pomáhají udržovat vlhkost), obě složky tak přispívají k zajištění vhodných podmínek pro klíčení a invazi většího počtu konidií (Luz, Batagin 2005).

Neočekávané problémy s fermentací a formulacemi mikroorganismů nebo chybné průzkumy trhu měli za následek stažení některých biopesticidů nebo produktů z trhu. Příznivé vlastnosti, které byly popsány u užitečných organismů při dřívějších studiích biopesticidů, byly často ve sklenicích aplikovány v neúčinných formulacích. V některých případech formulace užitečných mikroorganismů nepůsobily v polních podmínkách, a proto byly označeny za neúčinné a nevyužitelné a výzkum byl zastaven (Hallett 2005).

Přehled biopreparátů na bázi houby *B. bassiana* registrovaných v Evropě (upraveno dle Faria, Wraight 2007)

Název přípravku	Propagule /formulace	Cílový organismus	Stát s registrací
Boverol	C/WP	Coleoptera (Chrysomelidae)	ČR*
Boverosil	C/WP	Coleoptera (Curculionidae)+ other stored-product pests	ČR*
Ostrinil	C+H/TK	Lepidoptera (Crambidae)	Francie
Trichobass-L	C/OD	Coleoptera (Curculionidae, Scarabaeidae), Lepidoptera (Castniidae, Pieridae), Hemiptera (Aleyrodidae)+Acari (Tetranychidae)	Španělsko
BotaniGard ES	C/OD	Coleoptera(Curculionidae, Scarabaeidae), Hemiptera (Aleyrodidae, Aphididae, Pseudococcidae, Psyllidae), Thysanoptera (Thripidae)	Dánsko, Itálie, Španělsko, Švédsko
BotaniGard 22 WP	C/WP	Coleoptera(Curculionidae Scarabaeidae), Hemiptera (Miridae, Cicadellidae, Fulgoridae, Aleyrodidae, Aphididae, Pseudococcidae, Psyllidae), Thysanoptera (Thripidae)	Dánsko, Itálie, Španělsko, Švédsko
Mycotrol O	C/OD	Coleoptera (Chrysomelidae, Curculionidae, Scarabaeidae), Hemiptera (Miridae, Cicadellidae, Fulgoridae, Aleyrodidae, Aphididae, Pseudococcidae, Psyllidae), Lepidoptera (Crambidae, Noctuidae, Pieridae, Plutellidae), Orthoptera (Acrididae, Tettigoniidae), Thysanoptera (Thripidae)	Dánsko, Itálie, Švédsko
Mycotrol WP	C/WP	Coleoptera (Chrysomelidae, Curculionidae, Scarabaeidae), Hemiptera (Miridae, Cicadellidae, Fulgoridae, Aleyrodidae, Aphididae, Pseudococcidae, Psyllidae), Lepidoptera (Crambidae), Orthoptera (Acrididae, Tettigoniidae), Thysanoptera (Thripidae)	Dánsko, Itálie, Švédsko
Naturalis-L (=Fermone Naturalis L-225)	C/OD	Coleoptera (Chrysomelidae, Curculionidae, Scarabaeidae), Diptera (Ephydriidae, Mycetophilidae, Sciaridae, Tipulidae), Hemiptera (Lygaeidae, Miridae, Cercopidae, Cicadellidae, Aleyrodidae, Aphididae, Pseudococcidae, Psyllidae), Hymenoptera (Formicidae), Lepidoptera (Crambidae, Gelechiidae, Geometridae, Noctuidae, Tortricidae), Orthoptera (Acrididae, Gryllotalpidae), Thysanoptera (Thripidae)+Acari (Eriophyidae, Tetranychidae)+Crustacea+Diplopoda	Řecko, Itálie, Španělsko, Švýcarsko

*S respektem k autorům jsou v tabulce uvedeny produkty, které byly v České republice registrovány, nicméně v současné době již nejsou na trhu dostupné

C+H – konidie + hyfy (formulaci tvoří kolonizovaný pevný substrát), C – vzdušné konidie, WP- Smáčitelný prášek (Wettable powder), OD – disperzní olej (Oil dispersion), TK – technický koncentrát

2.10. Skladování spor entomopatogenních hub

Používání mykopesticidů naráží na problémy se skladováním především v souvislosti s aplikací v polních podmínkách, které většinou sezonní a je tedy potřeba udržet bioagens po určitou dobu naživu. Aby mohla být zlepšena vitalita konidií a účinnost mykoinsekticidů, měly by být podmínky rozmanité (Tarocco et al. 2005). Jak je uvedeno v kapitole zabývající se kultivací, lze skladovatelnost propagulí zlepšit i vhodnými podmínkami při produkci. Efektivní skladování mykoinsekticidů za dobrých i špatných skladovacích podmínek je předpokladem pro jejich úspěšné zavádění do praxe (Moore et al. 1995, 1996).

Jedná-li se o krátkodobé skladování, lze tento problém poměrně snadno odstranit např. snížením skladovací teploty. Pokud se však jedná o dlouhodobé skladování, je pro dobrou konkurenceschopnost přípravků vyžadována stabilita v rozmezí 18-24 měsíců v pokojové teplotě (cca 25°C) (Wraight et al. 2001), což musí být podpořeno nejen vhodnými podmínkami prostředí, ale rovněž použitím aditiv, tedy formulací.

Skladování spor v závislosti na podmínkách prostředí

Probíhá velké množství pokusů, které mají osvětlit působení podmínek prostředí na přežívání entomopatogenních hub. Hlavním faktorem je působení teploty. Morley-Davis et al. (1995) hodnotili skladování v šesti různých teplotách, Hong et al. (2001) zkoumali vlastnosti spor houby *B. bassiana* v pěti stálých teplotách, Hidalgo et al. (1998) prověřoval životnost formulovaných konidií v různém časovém období ve 2 teplotách. Takto by se dalo pokračovat mnoha dalšími příklady. Ze všech publikovaných výsledků je patrné, že teplota se jeví jako jeden ze základních faktorů ovlivňujících přežívání houbových propagulí, zejména pak konidií. Je zcela zřejmé, že celková problematika podmínek skladování je velmi důležitá pro vývoj nových produktů a je potřeba jí porozumět do hloubky. Je proto nutné znát co nejvíce informací o tom, jak skladovací teploty ovlivňují přežívání spor (Jenkins, Grzywacz 2000).

Obecně lze říci, že pokles v teplotě zvyšuje životnost konidií (Stathers et al. 1993; Morley-Davies et al. 1995; Hong et al. 1997). Morley-Davies et al. (1995), kteří pracovali s houbami *M. anisopliae* a *B. bassiana* ovšem došli k závěru, že příliš nízká teplota může poškodit konidie a proto by se optimální skladovací teploty měly pohybovat v rozmezí 0°C až 20°C. Přesto je mnoho studií, dokazujících fakt, že konidie většiny druhů entomopatogenních hub lze úspěšně skladovat zmrazené (Goettel, Inglis 1997). Přežívání spor v teplotách pod bodem mrazu je průkazně vyšší než v pokojové teplotě a rozdíl se výrazně zvyšují v průběhu času (Derakhshan et al. 2008). Konidie mitosporických hub (Deuteromycetes) v dormantním stavu snadno přežívají i dlouhodobé zmrazení a krátkodobě i teploty v rozmezí 45 – 55°C (McCoy et al. 1988). Konidie, blastospory a mycelium mohou být skladovány ve 4°C po dobu několika týdnů až měsíců (Goettel, Inglis 1997). Působení nízké teploty může být nedostatečné, pokud se projeví vysoká vlhkost prostředí (Hedgecock et al. 1995).

Skladování spor v závislosti na formulaci

Vzhledem k tomu, že v případě biopesticidů je aktivní složkou živý organismus, který musí být během skladování imobilní a inaktivní, ale musí mít schopnost rychle obnovit normální metabolické procesy po aplikaci (Butt et al. 1999), přidávají se do formulací různé adjuvanty, které to mají zajistit.

Zachování vysoké životnosti a virulence (Derakhshan et al. 2008) během skladování formulovaných konidií mykoinsekticidů je nezbytné pro jejich použití v ochraně proti škůdcům. Problém dlouhodobého skladování je poměrně často řešenou otázkou. Konidie

skladované v suchém prášku mají kratší životnost než konidie zbavené vlhkosti skladované v olejových formulacích, zvláště při skladování v nižších teplotách (Moore et al. 1996).

Consolo et al. (2003) testovali skladování v různých olejích (rostlinné i minerální) v teplotách 4, 17 a 26°C a neshledali žádné statisticky průkazné rozdíly v průběhu 28 dnů. V průběhu skladování v hermeticky uzavřeném prostředí nesnižovala olejová formulace životnost spor houby *B. bassiana* a při vyšších vlhkostech dokonce prodlužovala délku přežívání (Hong et al. 2005).

K důležitému objevu došli vědci v roce 1970, když oznámili, že levné jílové nosiče, běžně používané do formulací insekticidů zvyšují stabilitu blastospor houby *B. bassiana* uložených v půdě v širokém rozmezí teplot (Reisinger et al. 1977; Wraight, Carruthers 1999).

3. CÍLE PRÁCE

Cíle práce byly formulovány na základě strategie, kterou je charakterizována biointenzivní integrovaná ochrana a jejíž hlavní důraz je kladen na záměrné využívání a podporu lokálních populací přirozených nepřátel, v tomto případě kmenů entomopatogenních hub (EH), které jsou lépe vybaveny pro adaptaci na klimatické podmínky regionu, ze kterého byly izolovány. Vzhledem k tomu, že dosud není přesně definována metodika zahrnující jednotlivé kroky potřebné pro manipulaci s EH v podmínkách *in vitro*, bylo hlavním cílem předkládané práce nastínit možnosti rychlé, levné a jednoduché manipulace se spory lokálních kmenů, které vedou k podpoře kvalitativních vlastností reintrodukovaného organismu do prostředí jeho původního výskytu. Jako modelový organismus byla používána entomopatogenní houba *B. bassiana* (zejména její lokální kmen Bba I101), která tvoří nedílnou součást přirozeného prostředí a výraznou měrou se podílí na jeho supresivitě. Při respektování podmínek prostředí původního výskytu, lze do určité míry ovlivnit potenciál EH. Při produkci spor je zřetelné do jaké míry jsou EH schopny kolonizovat substrát a tvořit rozmnožovací struktury, které následně přispívají ke stabilizaci organismu v prostředí. Spory mitosporických hub jsou schopné vydržet po určitou část svého života v dormantním stavu, s čímž souvisí snaha postihnout a využít rozmezí podmínek, které jsou spory schopny snášet bez viditelné změny vlastností. Spory navrácené do původního prostředí musí být schopné nejen klíčit a růst, ale zároveň vyvolat nákazu hostitelského organismu. Kombinace jednoduché formulace a vhodné skladovací teploty přispívá k udržení spor lokálních kmenů EH ve velmi vitálním a virulentním stavu. V experimentální části práce je provedeno porovnání houby *B. bassiana* kmen Bba I101 s dalšími kmeny téhož druhu a jinými druhy EH. Práce byla v souvislosti se stanovenými hypotézami rozdělena na následující části:

- Optimalizace produkce spor entomopatogenních hub pro využití v biointenzivní integrované ochraně rostlin
- Hodnocení formulací na základě uchování vitality a virulence houby *B. bassiana* v průběhu skladování
- Předaplikační příprava postřikové jichy z práškové formulace spor houby *B. bassiana*
- Sledování kvalitativních a kvantitativních parametrů v souvislosti s produkční teplotou inokula houby *B. bassiana*

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Organismy používané v testech

B. bassiana kmen I101

Kmen houby *B. bassiana* označený jako Bba I101 byl izolován v roce 2004 v Národním parku Šumava v oblasti Prameny Vltavy. Patogen byl nalezen na dospělci lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*), ze kterého byl odizolován pomocí selektivního živného média na bázi fungicidní látky dodine. Poté, co byl kmen odizolován přímo z dospělého, byl pasážován přes umělou živnou půdu PDA (Potato Dextrose Agar). Po úplném přečištění byly spory imobilizovány do formy alginátových pelet, které jsou uchovávány v mykologické sbírce na KRV ZF JU v Českých Budějovicích.

Ostatní houby a kmeny používané v biotestech

Houba	Kmen	Zdroj	Původ	Rok
<i>B. bassiana</i>	NP 0004	<i>I. typographus</i>	NP Šumava (Styková lesní cesta)	2008
	NP 0005	<i>I. typographus</i>	NP Šumava (Jelení cesta)	2008
	NP 0007	<i>I. typographus</i>	NP Šumava (Zlatý stoleček)	2008
	NP 0028	<i>I. typographus</i>	NP Šumava (Smrčina)	2008
	Bba USA 01	půda	Florida	2003
<i>I. fumosorosea</i>	PRF 97	<i>Phenacoccus</i> sp.	Florida (Apopka)	1987
<i>M. anisopliae</i>	F-52	<i>Cydia</i>	Rakousko	1971
		<i>pomonella</i>		

Ostatní kmeny houby *B. bassiana*

Všechny používané kmeny houby *B. bassiana* byly izolovány pracovníky sekce rostlinolékařství přímo v terénu z dospělců *I. typographus*. V současné době jsou uloženy ve formě alginátových pelet v mykologické sbírce na KRV ZF JU v Českých Budějovicích.

I. fumosorosea kmen PFR 97

Kmen PFR 97 je účinnou složkou přípravku PreFeRal[®]. V roce 1993 byl poskytnut oddělení rostlinolékařství KRV ZF JU firmou Certis USA (dříve Thermo Trilog), kde je uložen ve formě alginátových pelet v mykologické sbírce. Referenční typový kmen je uložen v americké sbírce mikroorganismů pod označením ATCC 20874.

M. anisopliae kmen F-52

Kmen F-52 (původní označení M-43) je účinnou složkou přípravku Bio 1020[®]. Pro experimentální účely byl na KRV ZF JU izolován v roce 2009 přímo z uvedeného preparátu. Referenční typový kmen je uložen v americké sbírce mikroorganismů pod označením ATCC 90448.

Potemník moučný (*Tenebrio molitor* Linnaeus)

Pro účely biotestů jsou larvy nakupované ve specializovaných obchodech. Jsou běžně známy jako žlutí mouční červi, mají částečně sklerotizovanou kutikulu a jsou vhodným hostitelským organismem pro biotesty prováděné s entomopatogenními houbami. Do testů byly vybírány larvy stejné velikosti, které nejevily žádné známky poškození

4.2. Uložení kmenů v mykologické sbírce

Uložení hub do mykologické sbírky

Pro účely dlouhodobého uložení entomopatogenních hub je velmi výhodné uchovávání ve formě alginátových pelet. Cílem tvorby alginátových pelet je imobilizace biomasy a její udržování v rozmezí teplot -20 až -22°C . Do alginátových pelet lze imobilizovat konidie, blastospory, mycelium, atd.. V našem případě se jednalo o konidie uvedených kmenů houby *B. bassiana*. Jako základ pro přípravu pelet slouží suspenze konidií hub, 2% alginát sodný (Na^+ sůl kyseliny alginové) a jemně mleté přesáté pšeničné otruby. Směs otrub a alginátu sodného se smíchá a steriluje v tlakovém hrnci. Do vychladlé směsi se přidá suspenze spor v poměru 1:1 (v/v). Poslední nezbytnou složkou pro přípravu pelet je sterilní roztok chloridu vápenatého ($0,25\text{M CaCl}_2$). Do tohoto roztoku se pomocí nálevky kape připravená směs a chemická reakce zaručí vznik pravidelných kuliček, jejichž velikost lze regulovat velikostí použité nálevky. V roztoku chloridu sodného se ponechají kuličky po dobu minimálně 60 minut, aby došlo k jejich dokonalému vytvrzení. Po uplynutí potřebné doby je přebytečný roztok odstraněn a samotné kuličky jsou sušeny v aktivním proudě vzduchu po dobu několika hodin při nižších teplotách, aby nedošlo k poškození imobilizované biomasy. Po úplném vyschnutí jsou pelety ukládány do plastových kontejnerů, pečlivě označeny a skladovány v uvedených teplotách. Takto formulované spory je možno uchovávat po řadu let bez jakýchkoli kvalitativních změn. Pro každý formulovaný kmen se připravují dvě opakování pro případ, že by došlo k poškození v průběhu skladování.

Aktivace uložených kmenů z mykologické sbírky

K oživení kmenů určených pro pokusy se používalo živné médium PDA (Potato dextrose agar). Na povrch Petriho misky s médiem byly rozmístěny pelety (5-10 ks). Ty se po povrchu rozmístily tak, aby se vzájemně nedotýkaly a inkubovaly se po dobu 3-5 dnů při teplotě $23\pm 2^{\circ}\text{C}$. Zhruba 2-3 dny po zahájení inkubace se na povrchu pelet začne objevovat růst mycelia, které 4.-5. den začíná sporulovat. V době, kdy je na peletách již sporulující mycelium, je možné nově vytvořené spory přeočkovat na sterilní živnou půdu. Spory zde vytvoří novou kulturu, která se stává základem pro testy a hodnocení.



Nově vytvořené alginátové pelety



Obrůstající peleta na vodním agaru

4.3. Standardní biotesty používané v pokusech








*Test virulence na larvách *Tenebrio molitor**

Do testu byly vybírány larvy stejné velikosti, vzhledem k tomu, že larvy se kupují ve specializovaných obchodech a není známo jejich vývojové stádium, je jediným výběrovým kritériem právě velikost. Larvy byly po výběru povrchově sterilované v 0,05% NaClO (tzn. 1% roztok přípravku SAVO, který obsahuje 5% účinné látky NaClO). Následovalo důkladné promytí ve sterilní destilované vodě, které se opakovalo třikrát. Takto připravené larvy byly ponechány na filtračním papíře v uzavřené krabici až do úplného oschnutí. Pomocí smáčedla TW 80 byla připravena suspenze spor o koncentraci $1,0 \times 10^7$ spor/ml. Pokus byl koncipován na základě tzv. dip testu. Suspenze byla nalita do kádinky a larvy do ní byly jednotlivě namáčeny. Přebytná suspenze byla ihned odsáta filtračním papírem (Goettel, Inglis, 1997). Larvy ošetřené tímto způsobem byly inkubovány jednotlivě ve vlhkých komůrkách, kterými byly Petriho misky o průměru 60mm vyložené filtračním papírem navlhčeným 0,3ml sterilní destilované vody. Neošetřená kontrola se připravovala namáčením larev do 0,05% roztoku TW 80.

Pro test virulence se připravovalo 20-30 opakování v souvislosti s prováděným biotestem (30 opakování při hodnocení produkčního média a formulací v průběhu skladování, 20 opakování při testech vlivu teploty na následné vlastnosti spor). Vlhké komůrky ze stejné varianty byly ukládány do plastových sáčků, které zajišťovaly udržení dostatečné vlhkosti (zabraňovaly vysychání vody v komůrce). Celková délka hodnocení se lišila v závislosti na pokusu. Základní hodnocení probíhalo v intervalech 4, 6 a 8 dnů, u teplotní charakteristiky kmenů pak ve dvoudenních intervalech až 20 dnů. Hodnoty FDI (Fungus Development Index) byly stanovovány individuálně u každého jedince na základě hodnocení pod binokulárem podle stupnice, která byla upravena pro účely hodnocení na larvách *T. molitor* (viz. Obr. 1) podle původní stupnice popsané v práci Horňáka (2004), kde byly jako cílový organismus používány larvy *Galleria mellonella*. Mortalita se hodnotila jako kumulovaná, tzn. počítali se všechny mrtvé a infikované larvy, u kterých se zjevně projevila infekce houbou, dosáhly tedy hodnoty FDI 1,5.

V případě hodnocení formulací v inertním nosiči č.1 uvedeném v kapitole 6.2.7 nebyl pro test virulence použit dip test, ale virulence spor zde byla testována po ošetření larev suchým práškem. Pro hodnocení bylo použito 20 larev, které byly v uzavřeném plastovém kontejneru promíchány s 0,1g preparátu a přesným vážením byla stanovena hmotnost prášku ulpělého na larvách. Na základě testu CFU, který byl připraven ze stejného preparátu bylo ze zjištěné hmotnosti spočítáno množství konidií, které ulpěly na povrchu larev. Ošetřené larvy, jako v případě metody dip test, uloženy do vlhkých komůrek, plastových sáčků a umístěny do teploty $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Hodnocení FDI probíhalo stejným způsobem jako v předchozím případě.

Obr. 1 Stupnice používaná pro hodnocení virulence entomopatogenních hub na larvách *T. molitor* (Fungus development index, FDI).

Index	Popis	Fotodokumentace
0	Larva je živá a prostá jakýchkoli projevů infekce	
0,5	Na larvě se objevují drobné melanizační skvrny, larva je stále živá	
1	Melanizační skvrny po celém povrchu těla, larva je mrtvá	
1,5	Počátek růstu mycelia na měkkých částech těla larvy	
2	Kompaktní mycelium zhruba na 1/3 povrchu těla larvy	
2,5	Na myceliu na povrchu larvy se začínají objevovat spory	
3	Plně vysporulované mycelium na povrchu larvy	

Standardní test vitality

Hodnocení vitality probíhalo na základě standardního biotestu dle Landy et al. (1994). Test zahrnoval hodnocení klíčivosti a vývoje houbových spor, tzv. GI (Growth index). Jako médium se v biotestu používal 2% vodní agar, který neobsahuje žádné živiny. Příprava testu začínala rozlitím sterilního agaru na podložní mikroskopická sklička v dostatečně silné vrstvě, aby nedošlo k jeho vyschnutí v průběhu testu. Skličko bylo následně uloženo do vlhké komůrky, kterou byla v tomto případě Petriho miska o průměru 90mm, ve které byl filtrační papír navlhčený 0,5ml sterilní destilované vody. Po zaschnutí agaru na skličku byla na jeho povrch nanášena suspenze spor houby tak, že se v řadě probíhající středem sklička nanaslo inokulační klíčkovou deset kapek suspenze, která se nechala důkladně zaschnout a následně se připravené skličko uložilo do vlhké komůrky, která se kultivovala uzavřená v plastovém sáčku zabraňujícím ztrátě vlhkosti v teplotě 25°C. Hodnocení klíčivosti a GI probíhalo ve 24 hodinových intervalech. Prohlíželo se pod optickým mikroskopem a hodnotilo se nejméně 100 náhodně vybraných konidií. Konidie se považovala za klíčivou pokud nabobtnala a na jejím konci se začal objevovat počátek klíčící hyfy. Z poměru neklíčivých konidií k celkovému počtu hodnocených konidií se stanovila procentická klíčivost. GI index se hodnotil pomocí indexové stupnice od 0 do 3 (viz. Tab. 1).

Indexová stupnice používaná pro hodnocení vývoje spor houby entomopatogenních hub (Growth index, GI).

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

Radiální růst a výtěžnost

Pro hodnocení radiálního růstu byly připravovány středové kultury. V Petriho misce s průměrem 90mm byla umělá živná půda PDA bez přítomnosti vysrážené vody, která by mohla ovlivňovat růst a tvar středové kultury. Díky šabloně umístěné pod Petriho misku byla přesně do středu média pomocí inokulační klíčky nanasena kapka suspenze o koncentraci $1,0 \times 10^7$ spor/ml. Aby nedošlo k rozlití kapky po povrchu média, byly misky ponechány do úplného zaschnutí ve flow boxu. Poté byly misky vloženy do plastových sáčků a uloženy do předem definovaných teplot určených pro průběh testu. V případě hodnocení výtěžností na umělých živných půdách byla teplota kultivace 25°C, při hodnocení vlivu teploty produkce na kvalitativní vlastnosti spor byly středové kultury inkubovány v pěti teplotách (10, 15, 20, 25 a 30°C). Délka kultivace byla standardně 21 dnů bez přístupu světla.

Hodnocení radiálního růstu probíhalo na základě měření dvou na sebe kolmých průměrů získané středové kultury. Ze zjištěných rozměrů se vypočítala plocha kultury. Po změření a vyfotografování kultur následovala jejich homogenizace. Ze živného média se vyřízla pouze porostlá část, která se vložila do mixéru. Ke kulturám se přidalo adekvátní množství 0,05% TW 80, které bylo závislé na velikosti kultury a stupni sporulace tak, aby bylo možné uvolněné spory počítat. Homogenizace probíhala po dobu 3 minut v mixéru s výkonem 500W. Počítání spor se provádělo v kalibrované počítací komůrce pod optickým mikroskopem. Počítalo se vždy ve dvou opakováních a výsledná hodnota je jejich průměrem. Zjištěné hodnoty byly upraveny podle velikosti kultury na hodnoty reprezentující množství spor na kulturu, resp. na 1mm^2 . V případě hodnocení vhodnosti jednotlivých umělých živných médií pro produkci spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 bylo hodnoceno 6 kultur, homogenizovaly se 3+3 současně. Při hodnocení vlivu produkční teploty na vývoj spor se hodnotily 4+4 kultury současně.

Stanovení množství CFU (Colony Forming Units)

Pro hodnocení CFU byl používán standardizovaný test. Jako základ sloužila suspenze naředěná na koncentraci $1,0 \times 10^2$ spor/ml, která se nanášela na povrch Petriho misky obsahující živnou půdu PDA. 0,5 ml připravené naředěné suspenze se pomocí spatuly důkladně rozetřelo po povrchu misky s dostatečně vyschlým agarem a miska se ponechala ve flow boxu do druhého dne, aby se suspenze rovnoměrně vpila do agaru. Pro jednu variantu se připravovalo standardně 8 misek. Připravené misky se ukládali do plastových sáčků do teploty 25°C na dobu 3-5 dnů, v závislosti na hodnoceném druhu entomopatogenní houby. Po této době byly na agaru zřetelně viditelné vytvořené kolonie, které se spočítaly a přepočety na hodnotu odpovídající původní suspenzi.

4.4. Produkce spor

Konidiová suspenze

Pro kultivace matečných kultur se používalo živné médium PDA v 90mm Petriho miskách. Po oživení kmene z alginátových pelet byla suspenze nanesena na živné médium ve formě separačních čar a misky byly kultivovány v řízené teplotě (25°C) bez přístupu světla po dobu 14 dnů. Základní suspenze byla získána pomocí 0,05% roztoku smácedla TW 80, které se přelilo přes povrch misky a spory se jemně seškrabaly spatulou. Suspenze byla homogenizována na magnetickém míchadle a v případě potřeby přefiltrována přes sterilní gázu, aby byly odděleny nerozmíchané shluky spor. Pomocí počítací komůrky (Neubauer improved chambre) byla spočítána koncentrace spor v 1ml základní suspenze a s použitím přesného ředění byla adjustována na koncentraci spor používanou v pokusech. Pro většinu pokusů se používala koncentrace spor $1,0 \times 10^7$ /ml, v testech hodnotících klíčivost a vývoj houby GI byla používána koncentrace $1,0 \times 10^6$ spor/ml, která umožňovala snazší hodnocení vývoje jednotlivých spor.

Kultivace a výtěžnost spor na přirozených substrátech

Pro založení pokusů hodnotících produkci a kvalitu spor na přirozených substrátech bylo použito 5 obilnin (kroupy, rýže, pšenice, ječmen a pluchatý oves) a jedna olejnína (řepka).

- kroupy kroupy ječné o velikosti č.10
- rýže loupaná dlouhozrná
- pšenice potravinářská pšenice vypěstovaná v konvenčním zemědělství
- ječmen ozimý ječmen vypěstovaný v konvenčním zemědělství
- oves pluchatý oves pěstovaný v konvenčním zemědělství
- řepka olejnína získaná z běžného konvenčního zemědělství

Produkce spor probíhala v Erlenmayerových baňkách o objemu 100ml, kam bylo naváženo 10 g substrátu, baňka byla uzavřena alobalem a sterilována při teplotě 121°C po dobu 150 min. Po vysterilování byla provedena inokulace 5ml suspenze adjustované na finální koncentraci $1,0 \times 10^7$ spor/ml. Současně byl založen i test vitality pro ověření kvality spor vstupujících do pokusu. Po inokulaci a znovuuzavření, byla baňka v průběhu 6 hodin průběžně protřepávána, aby došlo k rovnoměrnému promísení obsahu a nasáknutí suspenze do substrátu. Následně byly všechny baňky uloženy do teploty 25°C, kde probíhala kultivace bez přístupu světla. Pro každou variantu bylo připraveno 5 opakování. První hodnocení proběhlo po 7 dnech, druhé následovalo po 14 dnech.

Hodnocení výtěžnosti spor bylo založeno na vymývání spor pomocí 0,05% TW 80. Substrát byl důkladně rozdělen a rozmělněn pomocí sterilní špachtle, následně byla baňka umístěna na magnetické míchadlo po dobu zhruba 10 minut při rychlosti 500ot./min. a po důkladném uvolnění spor byla suspenze připravena k počítání. Počítání proběhlo v kalibrované počítací komůrce a zjištěná hodnota byla přepočtena na 1g substrátu. Vitalita získaných spor byla posuzována na základě klíčivosti, indexu vývoje (GI) a virulence spor vůči cílovému organismu *T. molitor*. Test virulence byl založen pouze ze spor získaných po 7denní kultivaci.

Vliv produkční teploty na výtěžnost spor byl hodnocen ve třech teplotách v rozsahu odpovídajícím růstu houby *B. bassiana* kmene Bba I101. Jednalo se o teploty 10, 20 a 30°C. Pokusy byly zakládány již pouze se třemi substráty (kroupy, rýže a řepka), které vykázaly nejlepší výsledky v předchozí části a příprava a průběh pokusu odpovídaly výše popsané metodice. Růst byl ukončen po 14 denní kultivaci a následovalo zhodnocení kvantity spor vytvořené na jednotlivých substrátech v různých teplotách.

V poslední části byl na kroupách sledován trend vývoje výnosové křivky v průběhu 14 dnů. Hodnocení výtěžnosti zde probíhalo ve 24 hodinových intervalech a účelem bylo stanovit optimální čas ukončení produkce a sklizně spor z povrchu substrátu. Současně s hodnocením výtěžnosti byl z každého hodnocení zakládán test vitality, který ukazoval změny v kvalitě spor v průběhu kultivace na přirozeném substrátu.

Kultivace spor na agarizovaných živných půdách

Při hodnocení vlivu umělých živných půd na vitalitu, výtěžnost a virulenci spor na živných půdách PDA, SDA, CMA, CZ a V8A.

- PDA (Potato Dextrose Agar) Izolace a počítání kvasinek a plísní z mléka a dalších potravinářských produktů. Složení: bramborová infuze 200g/l, dextróza 20g/l, agar 15g/l; pH (25°C) 5,6±0,2; používané množství 39g/l
- SDA (Sabouraud Dextrose Agar) Pro kultivaci kvasinek, plísní a acidotolerantních bakterií. Složení: mykologický pepton 10g/l, dextróza 40g/l, agar 15g/l; pH (25°C) 5,6±0,2; používané množství 65g/l
- CMA (Corn Meal Agar) Pro kultivaci *Candida albicans* vzhledem k tvorbě chlamydspor a pro uchovávání kultur kvasinek a plísní. Složení: obilná infuze 50g/l, agar 15g/l; pH(25°C) 6,0±0,2; používané množství 17g/l
- CZ (Czapek Agar) Univerzální semisyntetické médium pro kultivaci kvasinek a plísní. Složení: sacharóza 30g/l, NaNO₃ 3g/l, K₂HPO₃ 1g/l, MgSO₄ 0,5g/l, KCl 0,5g/l, FeSO₄ 0,01g/l; pH(25°C) 7,3±0,2; používané množství 35g/l
- V8A (V8 juice agar) Pro kultivaci kvasinek a plísní. Složení: V8J 8,3g/l, L-asparagin 10g/l, kvasničný extrakt 2g/l, CaCO₃ 2g/l, glukóza 2g/l, agar 20g/l; pH(25°C) 5,7±0,2; používané množství 44,3 g/l

Agarizované živné půdy byly po sterilaci v tlakovém hrnci po dobu 40 minut rozlity na Petriho misky o průměru 90mm. Důkladně vyschnuté misky byly použity na přípravu středových kultur podle standardní metodiky popsané pro hodnocení radiálního růstu kultur. Pro každé médium bylo připraveno sedm opakování. 6 misek bylo homogenizováno pro vyhodnocení výtěžnosti, 7. miska byla použita pro standardní test klíčivosti.

Produkce spor v různých teplotách

Projevy vlivu teploty produkce na následnou kultivaci a vývoj houby *B. bassiana* kmen Bba I101 a Bba USA 01 byly hodnoceny v pěti teplotách (10, 15, 20, 25 a 30°C). Celý pokus byl koncipován tak, že matečná kultura byla vyprodukována standardně podle výše popsané metodiky na PDA, jedinou odlišností byla teplota, při které produkce probíhala. Kultury byly získány postupně ze všech pěti zmiňovaných teplot. Z matečné kultury narostlé v jedné teplotě byly připraveny všechny hodnocené testy (test vitality, virulence a radiálního růstu) probíhající současně v definovaných pěti teplotách. Tímto sledem produkce a následné kultivace byly otestovány všechny teploty.

4.5. Formulace a skladování spor

Produkce spor pro formulace

Pro produkci většího množství spor byly využívány plastové boxy, které po uzavření vytvářely vhodné mikroklima pro růst houby. Jako substrát se používalo 200g krup, které se inokulovaly 100ml standardní suspenze o koncentraci $1,0 \times 10^7$ spor/ml. Kultivace probíhala sedm dnů v uzavřeném prostředí v laboratorní teplotě bez přístupu světla, dalších sedm dnů byl substrát dosoušen na vzduchu. Po odpaření přebytečné vody byly spory sklizeny buď samostatně nebo přímo do práškových nosičů, pomocí nichž se spory separovaly. U všech získaných spor se provedlo hodnocení vitality testem klíčivosti a GI.

Práškové formulace

Pro vytvoření práškových formulací byly použity 3 nosiče. Prvním z nich byl nutritivní nosič (dále NN), což je homogenní prášek získaný vysušením substrátu bohatého na živiny. Další dva nosiče byly inertní, které se vzájemně odlišovaly velikostí svých částic. Inertní nosič označovaný č.1 (dále IN1) měl velikost částic v rozmezí 10-35 μ m, byl tedy jemnější. Inertní nosič č.2 (dále IN2) měl velikost částic 20-50 μ m. V rámci hodnocení práškových formulací byly současně hodnoceny i neformulované konidie, které byly sklizené samostatně a sloužily rovněž i jako kontrola.

Formulace byla uskutečněna již při sklizení spor přímo do jednotlivých práškových nosičů. Přesné množství nosiče bylo přidáno k plně vysporulované kultuře na přirozeném substrátu a pomocí separátoru proběhlo jejich oddělení od produkčního média do nosiče. Koncentrace spor v jednotlivých formulacích byla zjišťována po vytvoření homogenní suspenze pomocí 0,05% TW 80. Ve vytvořené suspenzi bylo pod optickým mikroskopem stanoveno ve dvou počítáních množství spor. Vzhledem k tomu, že formulace se ukládaly do skladovacích nádob v konkrétní koncentraci, byl preparát v případě potřeby „doředěn“ adekvátním množstvím nosiče. Množství spor obsažených ve formulaci bylo zaznamenáno na každý plastový kontejner. Z kontejnerů byly v průběhu skladování formulací v řízených teplotách odebírány poměrné vzorky, které se následně používaly pro hodnocení vlivu skladovací teploty a formulace na změny v kvalitě spor.

Olejové formulace

Olejové formulace byly vytvářeny z důvodu možnosti dlouhodobého uložení spor v laboratorní teplotě (22°C). Pro vytvoření formulací byly použity dva rostlinné oleje a jeden minerální olej. V případě rostlinných olejů se jednalo o jedlé rostlinné oleje – řepkový (dále ŘO) a sójový (dále SO), minerální olej reprezentoval tekutý parafin (dále TP). Kdykoli se tedy bude mluvit o těchto dvou olejích jako o koncentrátech, rozumí se neředěný jedlý rostlinný olej o uváděném složení.

Řepkový olej	Rostlinný olej jedlý jednodruhový nízkoerukový
Sójový olej	Rostlinný olej jedlý vyrobený z geneticky modifikované sóji MON-04032-6
Tekutý parafin	Čištěná směs tekutých nasycených uhlovodíků získávaných z ropy. Bezbarvá olejovitá kapalina nerozpustná ve vodě

Spory byly uloženy do koncentrovaných olejů bez použití dalších přídavných látek. Před formulací byla u suchých spor stanovena jejich koncentrace v 1g na základě počítání v kalibrované komůrce. Na základě této informace bylo do olejů přidáno množství spor zajišťujících finální koncentraci $5,0 \times 10^8$ spor/ml. Tato konkrétní koncentrace byla zvolena z toho důvodu, že pro testy virulence se používá koncentrace spor $1,0 \times 10^7$ spor/ml a zároveň se hodnotí čisté oleje bez spor ve 2% koncentraci. Aby tudíž byly výsledky standardní a vzájemně srovnatelné, byla zvolena tato koncentrace spor ve formulaci. Navíc toto množství odpovídá standardnímu množství spor obsažených v komerčně dostupných biopreparátech.

Při hodnocení spor uložených v tekutých formulacích byly odebrány vždy 2ml koncentráty, které byly důkladně homogenizovány v 98ml 0,05% TW 80. Homogenizace byla provedena na vyhřívaném magnetickém míchadle.

Skladování a hodnocení preparátů

Všechny typy finalizovaných preparátů byly skladovány v uzavřených plastových kontejnerech ve třech různých řízených teplotách. V pokojové teplotě $22 \pm 2^\circ\text{C}$, ve snížené teplotě $4 \pm 2^\circ\text{C}$ a zmrazené v teplotě $-20 \pm 2^\circ\text{C}$, všechny varianty byly uloženy ve tmě. U práškových formulací bylo hodnocení vitality prováděno ve 30 denních intervalech po dobu 4 měsíců a poslední hodnocení bylo provedeno po uplynutí jednoho roku. U virulence bylo provedeno první hodnocení ihned po formulaci, další následovalo po 60 dnech od uskladnění, následné kontroly probíhaly současně s testy vitality. Poslední hodnocení pak proběhlo 365 dnů po formulaci spor a jejich uložení do řízené teploty. V případě olejových formulací proběhlo hodnocení ihned po formulaci v čase 0, 24 hodin po formulaci tzn. v čase 1, 7 dnů po formulaci a poslední hodnocení bylo provedeno po 365 dnech od uložení do olejů. Jako kontrolní varianta sloužila u olejových formulací suspenze spor v 0,05% TW 80. Základem všech hodnotících pokusů byla homogenní suspenze formulovaných spor o koncentraci $1,0 \times 10^6$ spor/ml pro testy vitality a $1,0 \times 10^7$ spor/ml pro testy virulence.

4.6. Smáčedla a rozpustnost

Použitá smáčedla

V první části hodnocení smáčedel vstupovalo do testů celkem 6 komerčně dostupných a registrovaných přípravků od různých firem

Mero	(Bayer CropScience AG): a.i. methylester řepkového oleje (750 g l^{-1}), dávkování se liší podle ošetřované plodiny (1-2 l /300l); použitá dávka 2ml/300ml
Istroekol	(Agrofert) : a.i. řepkový olej 80%, dávkování se liší podle ošetřované plodiny (1-3,3 l /300l); použitá dávka 1,5ml/300ml
Adigor	(Syngenta Crop Protection AG): a.i. methylester řepkového oleje, dávkování podle ošetřované plodiny (0,45-9,3l/300l); použitá dávka 0,45ml/300ml
AT Plus	(Syngenta Crop Protection AG): a.i. parafinový olej 60%-POE sorbitololeát 40%, dávkování podle ošetřované plodiny (1-1,5l/300l); použitá dávka (1,5ml/300ml)
Agrovital	(Agroprotec): a.i. pinolene, dávkování 0,25l/300l; dávka 1,5ml/300ml
Tween 80	a.i. polyethylen glykol sorbitan, v biotestech používaný v 1% koncentraci

Hodnocení rozpustnosti a vitality

V první části byla smáčedla v předepsaných dávkách rozmíchána ve sterilní destilované vodě. Do epruvet bylo naváženo 0,5g preparátu formulovaného v nutritivním nosiči a odpovídající množství neformulovaných konidií. K preparátu bylo přidáno naředěné smáčedlo a směs byla důkladně promíchána. Vzorky byly takto ponechány 2 hodiny. Po uplynutí uvedeného času byla vizuálně hodnocena rozpustnost v jednotlivých suspenzích a byl připraven test vitality. V další části byla hodnocena již jen 3 smáčedla, která vykázala nejlepší vlastnosti. Jednalo se o Istroekol, AT Plus a TW 80. Byly připraveny 3 koncentrace smáčedel – 1, 3 a 5% (0,1; 0,3 a 0,5 ml/10ml sterilní destilované vody). Do falkonky byl odvážen vždy 1g preparátu, který byl důkladně protřepán s 10 ml připraveného smáčedla. 1ml takto připravené suspenze byl naředěn v poměru 1:100, čímž byla získána suspenze o koncentraci $1,0 \times 10^7$ spor/ml. Po dodatečném naředění byla hodnocena rozpustnost preparátu a vitalita na základě testu klíčivosti a GI.

4.7. Statistické analýzy

Uváděné hodnoty shrnuté v tabulkách jsou vyjádřeny jako průměry zjištěných výsledků \pm SEM. V případě výtěžností byly pokusy, u kterých byl velký rozptyl naměřených hodnot, vyhodnoceny pomocí logaritmické transformace. V případě mortality se zjištěnými vysokými rozptyly hodnot byla použita arcsin transformace dat ($\arcsin \sqrt{(\text{počet všech mrtvých resp. infikovaných larev} / \text{celkový počet všech resp. mrtvých larev})}$). Statistické vyhodnocování dat probíhalo v programu Statistica™ verze 8 (StatSoft, Inc. 2001). Základní používanou metodou byla jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA), prokazatelnost rozdílů byla stanovována na základě Tukey HSD testu, $\alpha \leq 0,05$. V případě neparametrických testů byl pro statistické vyhodnocení použit neparametrický Kruskal-Wallisův test, mnohonásobné porovnání, pro porovnávání mezi dvěma nezávislými proměnnými byl použit Mann-Whitneyho U test.

Pro vyhodnocení doby potřebné pro dosažení hodnoty FDI 1,5 byla použita polynomická regrese a na základě vygenerované rovnice byla dopočítána konkrétní hodnota. Vyhodnocení bylo prováděno v programu Microsoft Excell 2000.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. Optimalizace produkce spor entomopatogenních hub pro využití v biointenzivní integrované ochraně rostlin

Produkce spor je základem pro vytvoření biomasy využitelné v biointenzivní integrované ochraně proti škodlivým organismům. Hlavním předpokladem je vitální spora schopná růst a napadat hostitelský organismus v dostatečné míře. Vzhledem k tomu, že mezi jednotlivými používanými médii, více či méně vhodnými pro produkci spor, mohou existovat výrazné rozdíly, bylo cílem následující studie nalézt médium resp. substrát vhodný nejen pro zajištění výše zmíněných kvalitativních charakteristik, ale rovněž pro zajištění dostatečného množství získaných spor, které by byly aplikovány zpět do oblasti původního výskytu a aby jejich kultivace byla výhodná z hlediska ekonomického.

5.1.1. Kultivace spor na přirozených substrátech

Co se týká použití přirozených substrátů, nabízí se celá řada možností. Do pokusů byly vybrány obiloviny a jedna olejnina. Hodnocení probíhalo na základě výtěžnosti spor, která byla přepočtena na 1g substrátu a kvality spor, které zahrnovalo klíčivost spor a jejich vývoj v průběhu 24 hodin na 2% agaru. Poslední částí bylo zjištění virulence nově vzniklých spor vůči cílovému organismu *T. molitor*. Do hodnocení virulence byly zahrnuty pouze varianty, které prokázaly dostatečnou kvantitu produkce a připadaly by tudíž v úvahu pro možné použití v dalších částech práce.

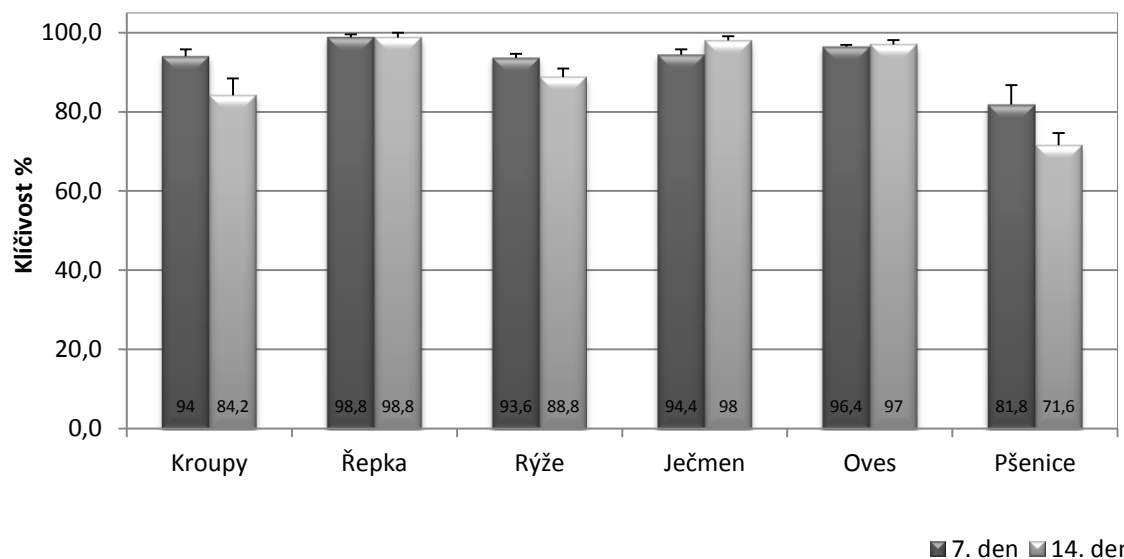
Tabulka 1 Výtěžnost spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na přirozeném substrátu v teplotě 24°C.

Substrát	Výtěžnost spor/g substrátu			
	7		14	
Kroupy	2,27±0,99x10 ⁹	ab	2,84±0,26x10 ⁹	b
Rýže	3,89±1,48x10 ⁹	a	5,42±1,19x10 ⁹	a
Řepka	1,68±0,37x10 ⁹	bc	3,36±0,18x10 ⁹	b
Ječmen	1,56±0,53x10 ⁸	c	2,65±0,11x10 ⁸	c
Pšenice	1,62±0,47x10 ⁸	c	4,41±0,76x10 ⁸	c
Oves	5,91±1,80x10 ⁸	c	4,27±0,47x10 ⁸	c

a,b,c - hodnoty v jednom sloupci označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

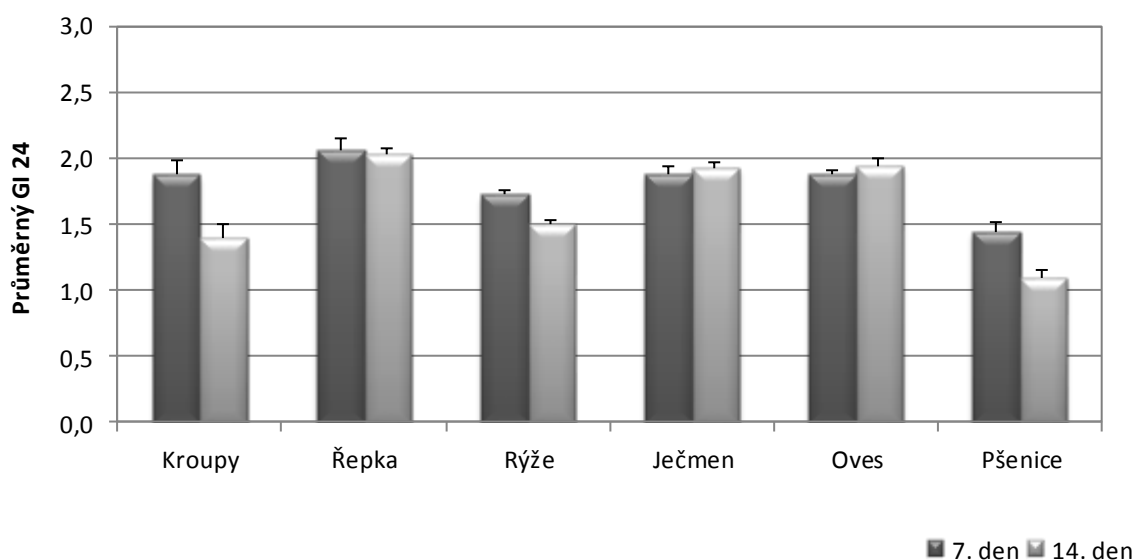
Výtěžnost spor získaná z jednotlivých kultivací se hodnotila po 7 a 14 dnech. Po 7 denní kultivaci bylo nejvyšších hodnot vyprodukovaných spor dosaženo na kroupách a rýži, mezi nimiž byl pouze částečný statistický rozdíl, ostatní varianty se od těchto dvou odlišovaly velmi výrazně, ne však mezi sebou ($F_{(5, 24)}=15,335$; $p=0,0000$). V průběhu dalších 7 dnů došlo k nárůstu množství spor na jednotlivých substrátech a nejvyššího množství dosáhly spory *B. bassiana* kmen Bba I101 (dále pouze Bba I101) získané z rýže ($F_{(5, 24)}=69,521$; $p=0,0000$).

Graf 1 Klíčivost spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 získaných z jednotlivých substrátů po 7 a 14 dnech kultivace (24 hod).



Po 7 dnech kultivace byla klíčivost spor získaných z jednotlivých substrátů poměrně vyrovnaná, nejvíce se odlišovaly hodnoty klíčivosti u spor získaných z pšenice, kde byl zjištěn nejnižší počet klíčivých spor (81,8%) ($F_{(5, 24)}=26,533$; $p=0,0000$). Po 14 dnech se hodnoty více odlišily ($F_{(5, 24)}=76,169$; $p=0,0000$). Vývoj na 2% agaru (GI) byl rovněž více vyrovnaný po 7 dnech kultivace, kdy se průkazně odlišovala pouze rychlost vývoje kmene Bba I101 kultivovaného na řepce od spor získaných z rýže a pšenice ($H_{(5, N=30)}=23,62767$; $p=0,0003$). Po 14 dnech byly rozdíly v rychlosti vývoje o něco vyšší, vývoj houby *B. bassiana* sklizené z pšenice byl nejpomalejší a odlišoval se téměř od všech ostatních variant. Vzrostl i rozdíl mezi hodnotami zjištěnými u variant sklizených z řepky a krup ($H_{(5, N=30)}=26,31632$; $p=,0001$).

Graf 2 Vliv přirozeného substrátu na index vývoje houby *B. bassiana* kmen Bba I101 (GI 24).

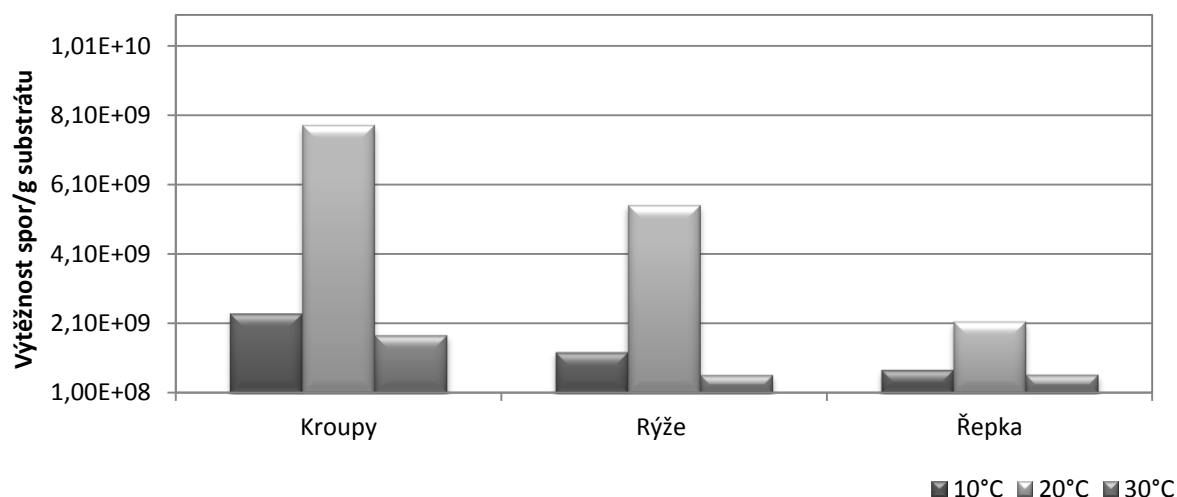


Tabulka 2 Výťažnost spor *B. bassiana* kmen Bba I101 získaná na přirozených substrátech po 14 dnech kultivace v různých teplotách (množství spor/g substrátu).

Substrát	Teplota kultivace (°C)					
	10		20		30	
Kroupy	2,39±0,34x10 ⁹	a	7,81±0,47x10 ⁹	a	1,77±0,39x10 ⁹	a
Rýže	1,27±0,11x10 ⁹	b	5,51±0,46x10 ⁹	b	6,25±1,25x10 ⁸	b
Řepka	7,73±1,08x10 ⁸	b	2,16±0,42x10 ⁹	c	6,28±0,44x10 ⁸	b

a,b,c - hodnoty v jednom sloupci označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

V rámci tohoto testu probíhajícího po dobu 14 dnů dosáhly prokazatelně nejvyšších hodnot ve všech teplotách výtěžnosti spor získaných na kroupách. Rozdíl v teplotě 10°C představoval snížení hodnot výtěžnosti na zhruba 1/3 – 1/4 výtěžnosti naměřené ve 20°C. Ve 30°C pak bylo množství spor 4-8krát nižší než ve 20°C v závislosti na použitém substrátu. Rozdíly mezi substráty jsou statisticky prokazatelné ve všech testovaných teplotách ($F_{(2, 6)}=28,912$; $p=0,0008$ v 10°C, $F_{(2, 6)}=79,506$; $p=0,0001$ ve 20°C a $F_{(2, 5)}=12,502$; $p=0,0113$ ve 30°C).

Graf 3 Výťažnost spor *B. bassiana* kmen Bba I101 získaná kultivací na přirozeném substrátu v různých teplotách.Tabulka 3 Mortalita larev *T. molitor* vyvolaná sporami *B. bassiana* kmen Bba I101 získanými z různých přirozených substrátů.

Substrát	Mortalita ^z					
	4. den		6. den		8. den	
Kontrola	10,52±8,69 (3,33)	b	18,43±0,00 (9,98)	c	18,43±0,00 (9,98)	b
Kroupy	71,57±11,11 (89,95)	a	90,00 (100)	a	90,00 (100)	a
Rýže	63,43±15,66 (79,93)	a	68,58±3,83 (86,60)	b	75,04±8,69 (93,29)	a
Řepka	79,48±8,69 (96,63)	a	90,00 (100)	a	90,00 (100)	a

a,b,c - hodnoty v jednom sloupci označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

^z Průměr dat ($x \pm SE$) vyjádřených jako úhlové hodnoty [$\arcsin \sqrt{(\text{počet všech mrtvých a infikovaných larev} / \text{celkový počet všech larev})}$]. Mortalita (%) je uvedena v závorkách.

Biotest hodnotící virulenci Bba I101 na larvách *T. molitor* zahrnoval spory získané kultivací na 3 přirozených substrátech. Mezi jednotlivými variantami byly statisticky průkazné rozdíly pouze po 6 dnech biotestu, kdy byla mortalita vyvolaná spory Bba I101 vyprodukovanými na rýži nejnižší ($F_{(3, 8)}=620,87$; $p=0,00000$), po 4 a 8 dnech dosáhla statistické odlišnosti pouze kontrola ($F_{(3, 8)}=19,210$; $p=0,0005$; $F_{(3, 8)}=124,10$; $p=0,0000$).

Tabulka 4 Vývoj houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvách *T. molitor*, spory získané z různých přirozených substrátů (FDI±SE).

Substrát	Délka biotestu (dny)		
	4	6	8
Kroupy	2,28 ± 0,63	2,63 ± 0,57	2,82 ± 0,34
Rýže	2,15 ± 0,95	2,61 ± 0,64	2,77 ± 0,47
Řepka	2,22 ± 0,55	2,87 ± 0,31	2,92 ± 0,24

Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

Součástí testu virulence bylo rovněž i hodnocení vývoje houby *B. bassiana* na larvách *T. molitor*. V rychlosti vývoje se ze statistického hlediska neprojevily rozdíly mezi jednotlivými variantami ($H_{(2, N=90)}=1,2514$; $p=0,5349$; $H_{(2, N=90)}=1,7353$; $p=0,4199$; $H_{(2, N=90)}=0,7101$; $p=0,7011$). Nejnižší hodnoty v průběhu celého biotestu dosahovala varianta získaná kultivací na rýži. Přesto byly hodnoty vyrovnané a průběh infekce byl velmi rychlý. Již po 8 dnech biotestu bylo možné pozorovat na povrchu larev sporující mycelium, v některých případech byla sporulace na úrovni FDI 3,0.

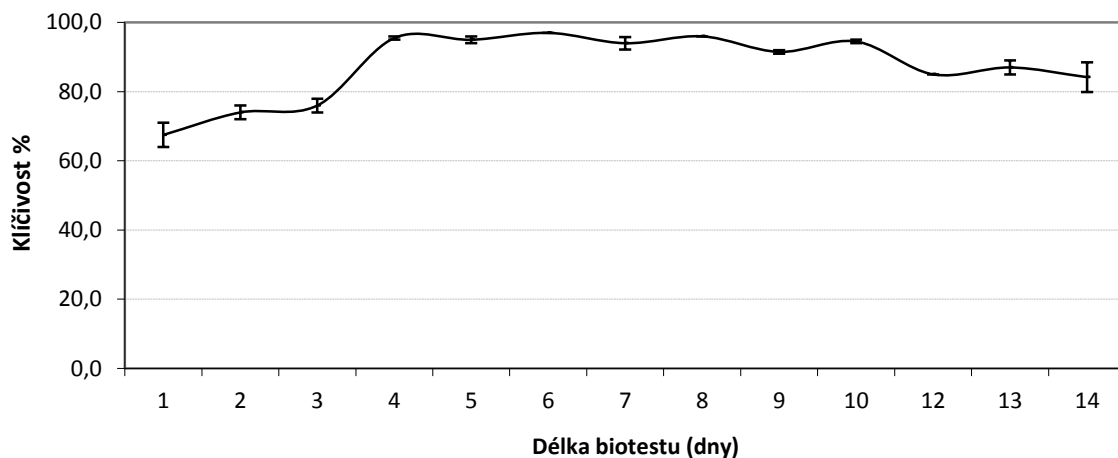
Tabulka 5 Vliv délky kultivace na rychlost vývoje houby *B. bassiana* kmen Bba I101 získané na kroupách (14 denní kultivace).

Den	GI (24)
1	0,98±0,86
2	0,81±0,72
3	0,94±0,78
4	1,95±0,55
5	1,98±0,61
6	1,82±0,45
7	1,87±0,79
8	1,86±0,53
9	1,72±0,79
10	1,71±0,54
12	1,43±0,60
13	1,37±0,72
14	1,40±0,76

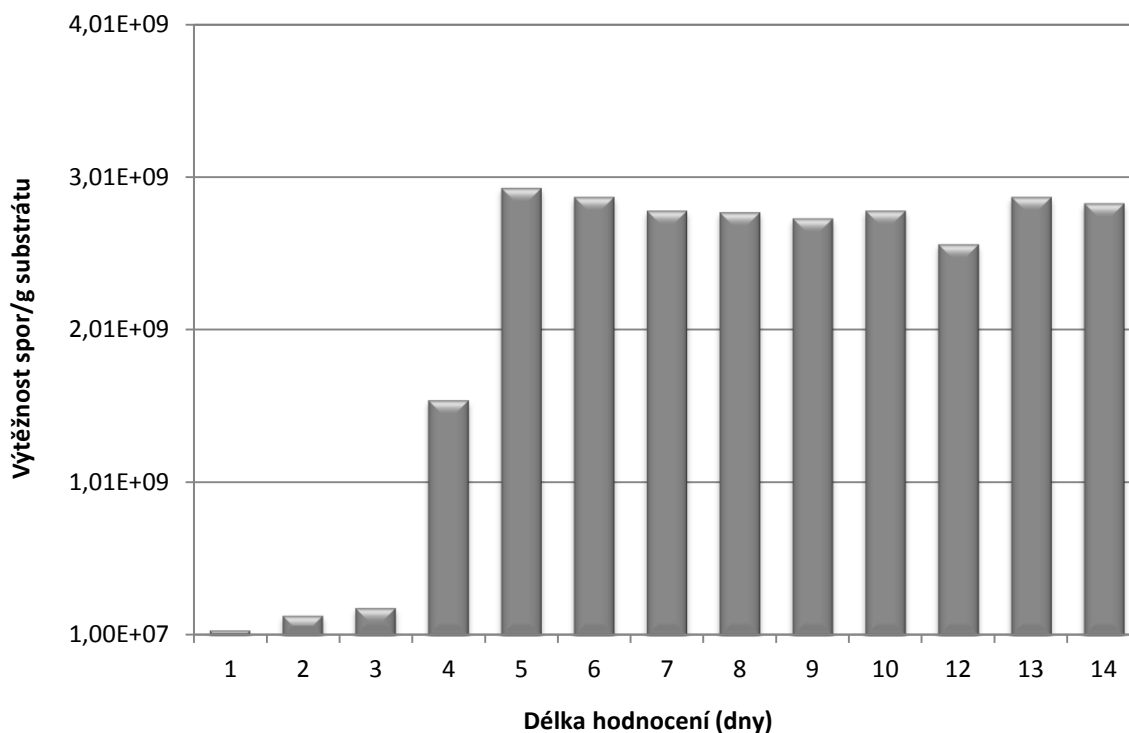
Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

Po kultivaci na kroupách nebyly zjištěny statistické rozdíly mezi vývojem houby ve standardním testu vitality ($H_{(12, N=26)}=24,20513$; $p=0,0191$). Přesto byly nejvyšší hodnoty dosaženy v rozmezí 3. a 8. dne. Na začátku hodnocení byl vývoj spor velmi pomalý a od 9. dne začaly hodnoty opět postupně klesat.

Graf 4 Průběh klíčivosti spor *B. bassiana* kmen Bba I101 hodnocené v průběhu 14 denní kultivace na kroupách (24 hod).



Graf 5 Výtěžnost spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 získaná v průběhu 14denní kultivace na kroupách.



Z grafu 5 je zřejmý průběh výtěžností spor v průběhu 14 denní kultivace. Hodnoty získané v rozmezí 5. a 14. dne byly prakticky vyrovnané, pohybovaly se mezi $2,94 \times 10^9$ (5.den) a $2,57 \times 10^9$ (12. den) spor/g substrátu. Výtěžnost a kvalita spor získaných v průběhu všech dílčích hodnocení byly ovlivněny nejen použitým substrátem, ale rovněž i teplotou kultivace. V případě spor získaných z rýže nastaly problémy při sklizení spor spojené s degradací obilok. V průběhu 14 denní kultivace na kroupách nedocházelo od pátého dne k dalšímu nárůstu množství spor.

5.1.1.1. Porovnání produkčnosti vybraného substrátu u různých druhů a kmenů hub

Vzhledem k tomu, že cílem práce bylo zhodnotit možnosti produkce spor co nejefektivnějším možným způsobem, byly do dalšího hodnocení zahrnuty i další kmeny houby *B. bassiana* a 2 další druhy entomopatogenních hub. Na základě předchozích testů byla snaha nalézt substrát s co nejširším způsobem použití pro produkci mitosporických hub využitelných v Bio-IOR.

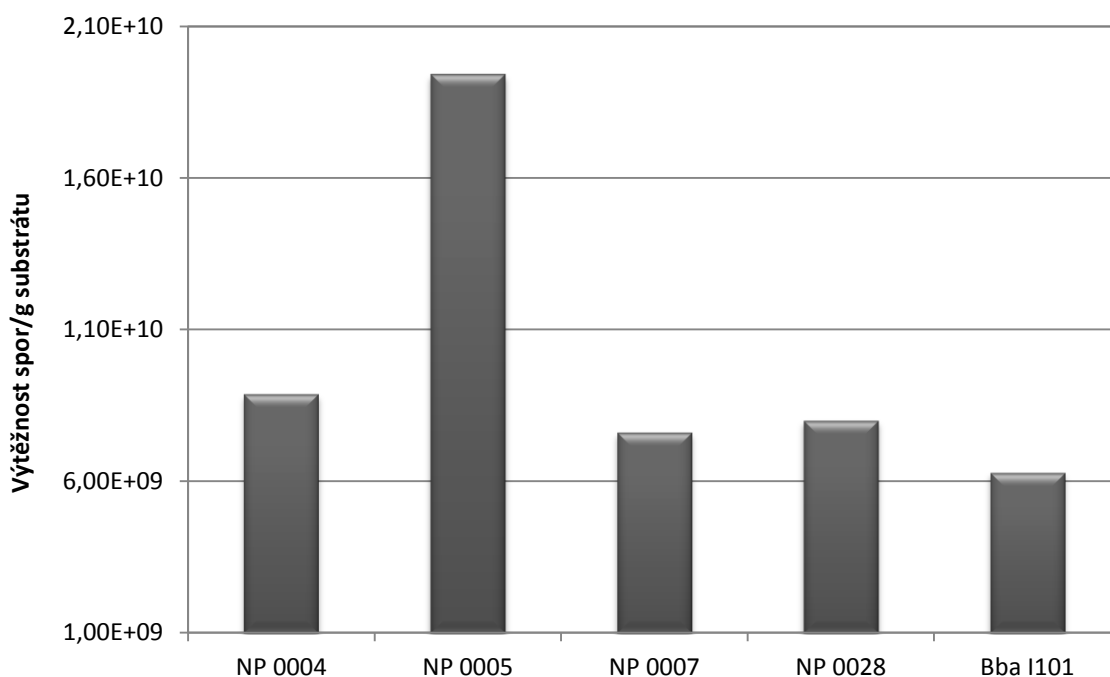
Tabulka 6 Porovnání výtěžností jednotlivých kmenů a druhů hub na přirozeném substrátu (kroupy).

Druh houby	Kmen	Původ	Spor/g substrátu	
<i>B. bassiana</i>	NP 0004	NP Šumava	8,87E+09	b
	NP 0005	NP Šumava	1,94E+10	a
	NP 0007	NP Šumava	7,60E+09	b
	NP 0028	NP Šumava	8,00E+09	b
	Bba I101	NP Šumava	6,28E+09	b
<i>I. fumosorosea</i>	PFR 97	Florida, USA	8,02E+09	b
<i>M. anisopliae</i>	F-52	Rakousko	9,61E+08	c

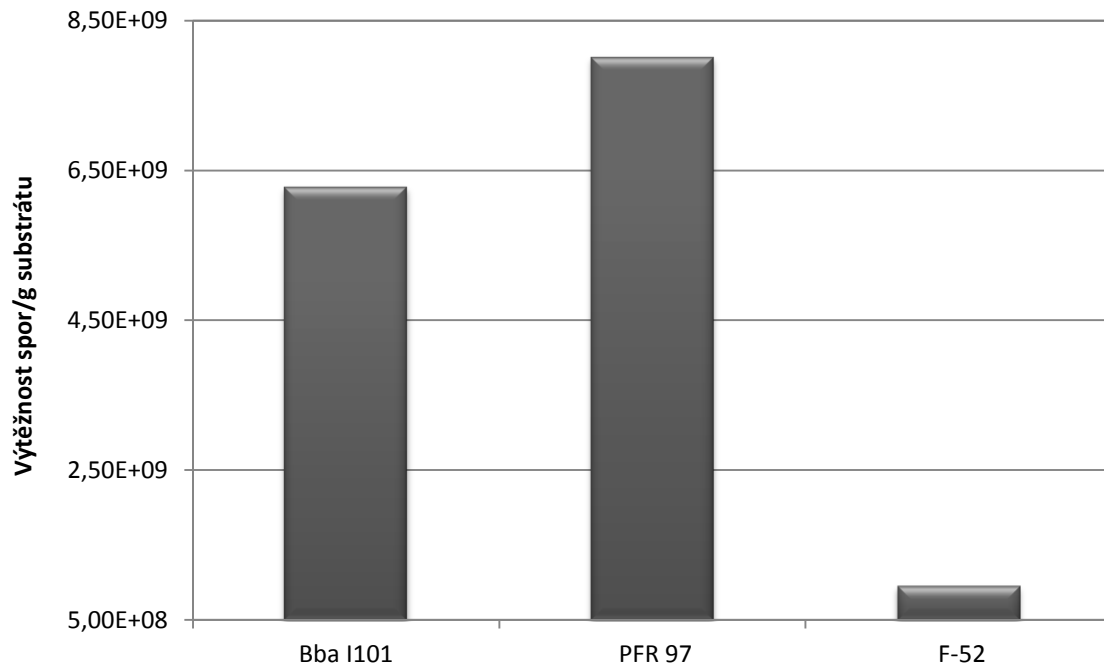
a,b,c - hodnoty v jednom sloupci označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

Odlišnosti ve výtěžnostech spor na kroupách byly u jednotlivých použitých kmenů statisticky prokazatelné $F_{(6,7)} = 136,56$; $p = 0,0000$. Nejvyššího množství spor bylo dosaženo u houby *B. bassiana* kmen NP 0005, nejnižší naopak u houby *M. anisopliae* u kmene F-52. Ostatní kmeny se mezi sebou nelišily, hodnoty byly velmi vyrovnané.

Graf 6 Porovnání výtěžnosti spor různých kmenů houby *B. bassiana*.



Graf 7 Výtěžnost spor hub *B. bassiana* *I. fumosorosea* a *M. anisopliae* (kmeny Bba I101, PFR 97 a F-52).



Jak je patrné z uvedené tabulky a grafů, lze detekovat rozdíly v množství vyprodukovaných konidií nejen mezi různými druhy hub, ale rovněž v rámci jednoho druhu mezi různými kmeny, které se lišily celkovou produkcí spor. Odlišovaly se i v dalších ukazatelích, které souvisely převážně s fenotypovým projevem. Co se týká rozdílů ve výtěžnosti spor na 1g přirozeného substrátu u třech hodnocených druhů hub bylo absolutně nejnižších hodnot dosaženo u druhu *M. anisopliae* u kmene označeného F-52, který vykázal výtěžnost téměř o řád nižší než tomu bylo u houby *I. fumosorosea* kmen PFR 97. Kmen PFR 97 zaznamenal nejvyšší výtěžnost při porovnání s kmeny F-52 a Bba I101.

5.1.2. Produkce spor na umělých živných půdách

Spory mitosporických hub je možné produkovat rovněž na umělých živných půdách. Jedná se o techniku, která je výhodná pro kultivace malého množství spor využitelného pro laboratorní účely a lze na ní demonstrovat závislost kolonizace prostředí na množství přítomných živin. V běžné laboratorní praxi je používáno několik standardních agarizovaných živných půd. U získaných spor byla hodnocena kvantita produkce, radiální růst, vzhled kultur na jednotlivých médiích a vitalita spor. V testu bylo hodnoceno celkem 5 živných médií.

Tabulka 7 Ukazatele vitality houby *B. bassiana* kmen Bba I101 získané kultivací na umělých živných půdách.

Živné médium	Klíčivost %		GI 24*
PDA	90,00±1,00	ab	1,36 ± 0,72
SDA	87,50±1,50	a	1,43 ± 0,69
CMA	96,50±1,50	b	1,68 ± 0,55
V8A	29,00±2,00	c	0,30 ± 0,56
CZ	92,50±0,50	ab	1,45 ± 0,67

a,b,c - hodnoty v jednom sloupci označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

*srovnání provedeno na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

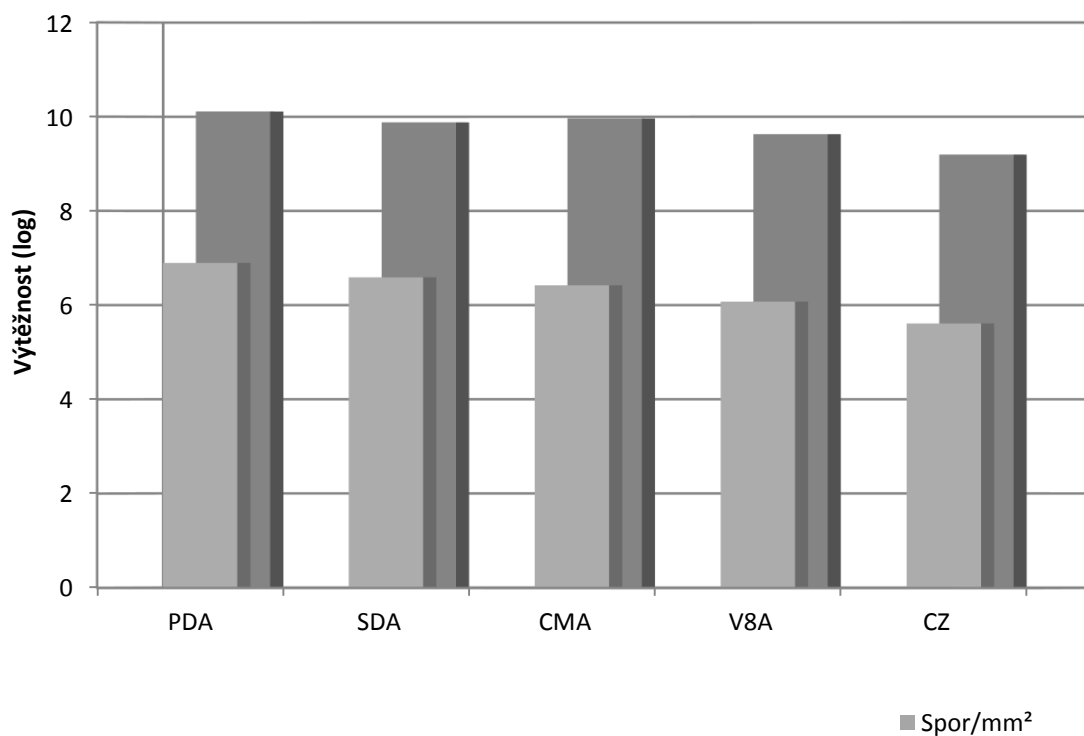
Vitalita spor vyhodnocovaná po 24 hodinách testu klíčivosti byla odlišná u jednotlivých použitých médií. Nejnižší hodnoty bylo dosaženo u živné půdy V8A, kde bylo zjištěno pouze 29% klíčivých spor. U ostatních variant se hodnoty pohybovaly v rozmezí 87,50-96,50% ($F_{(4, 5)}=407,91$; $p=0,0000$). Nejvyšší klíčivost byla u spor pocházejících z CMA. Při hodnocení vývoje houby se statisticky prokazatelně odlišovaly hodnoty zjištěné u spor kultivovaných na živných médiích CMA a V8A ($H_{(4, N=1000)}=306,4014$; $p=0,000$). Houba *B. bassiana* vyprodukovaná na CMA prokázala nejrychlejší vývoj, naopak varianta získaná z V8A měla nejpomalejší vývoj.

Tabulka 8 Parametry získané z kultivace středových kultur houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na různých umělých živných půdách.

Živná půda	Průměr kultury (mm)	Plocha (mm ²)	Spor/kulturu	Spor/mm ²
PDA	45,67±1,65	c 1637,99±23,91	b 1,29±0,37×10 ¹⁰	a 7,84±2,14×10 ⁶
SDA	49,75±3,37	b 1944,83±84,66	b 7,58±1,12×10 ⁹	ab 3,88±0,41×10 ⁶
CMA	66,92±2,29	a 3517,55±96,35	a 9,20±1,10×10 ⁹	ab 2,63±0,39×10 ⁶
V8A	67,58±2,22	a 3587,45±44,23	a 4,25±0,15×10 ⁹	ab 1,18±0,03×10 ⁶
CZ	69,92±1,71	a 3839,34±27,45	a 1,57±0,14×10 ⁹	b 4,07±0,32×10 ⁵

a,b,c - hodnoty v jednom sloupci označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

Velikost středových kultur se mezi jednotlivými médii velmi výrazně odlišovala. Nejmenší kultury byly vytvořeny na půdě PDA, naopak největší na půdě CZ ($F_{(4, 5)}=272,22$; $p=0,0000$). Rozdíl mezi největší a nejmenší kulturou byl 24,25mm. Od průměru kultury se samozřejmě odvíjela plocha celé kultury. Pro plochy kultur byly statistické parametry $F_{(4, 5)}=268,66$; $p=0,0000$.

Graf 8 Výtěžnost spor *B. bassiana* kmen Bba I101 na agarizovaných živných médiích po 21 dnech kultivace.

Co se týká výtěžnosti spor, tak v případě výtěžností na kulturu a na 1mm^2 byla drobná odlišnost v případě půdy V8A. Statistická odlišnost byla prokázána mezi jednotlivými médii u obou ukazatelů, jak u výtěžnosti na kulturu, tak na 1mm^2 . Nejvyšších hodnot bylo v obou případech dosaženo na živném médiu PDA ($F_{(4, 5)}=5,9462$; $p=0,0386$; $F_{(4, 5)}=8,7056$; $p=0,0178$).



Živná půda PDA



Živná půda SDA



Živná půda V8A



Živná půda CMA



Živná půda CZ

Vzhled středových kultur na jednotlivých umělých živných médiích. Kultury se mezi sebou odlišovaly nejen vzhledem, ale i svou velikostí a stupněm sporulace, resp. výtěžností spor.

5.2. Hodnocení formulací na základě uchování vitality a virulence houby *B. bassiana* v průběhu skladování

Následující část práce byla zaměřena na porovnávání různých formulací a podmínek skladování využitelných pro uchování spor houby *B. bassiana* lokálního kmene Bba I101. V rámci hodnocení byly používány neformulované spory (NK) a 3 práškové formulace ve 3 skladovacích teplotách (-20, 4 a 22°C) a 3 olejové formulace uložené ve 22°C. Práškové formulace zahrnovaly 1 finalizaci na základě nutritivního nosiče (NN) a 2 inertních nosičů (IN1, IN2). Tekuté formulace představovaly spory imobilizované v koncentrátech 2 rostlinných olejů (řepkový-ŘO a sójový-SO) a tekutého parafínu (TP).

5.2.1. Ovlivnění vitality a virulence houby *B. bassiana* v průběhu skladování v -20°C

Pokusy probíhaly po dobu jednoho roku. První hodnocení bylo provedeno bezprostředně po založení testu, další následovala ve 30 denních intervalech po dobu 4 měsíců, poslední pokusy byly provedeny po uplynutí 1 roku od uložení spor.

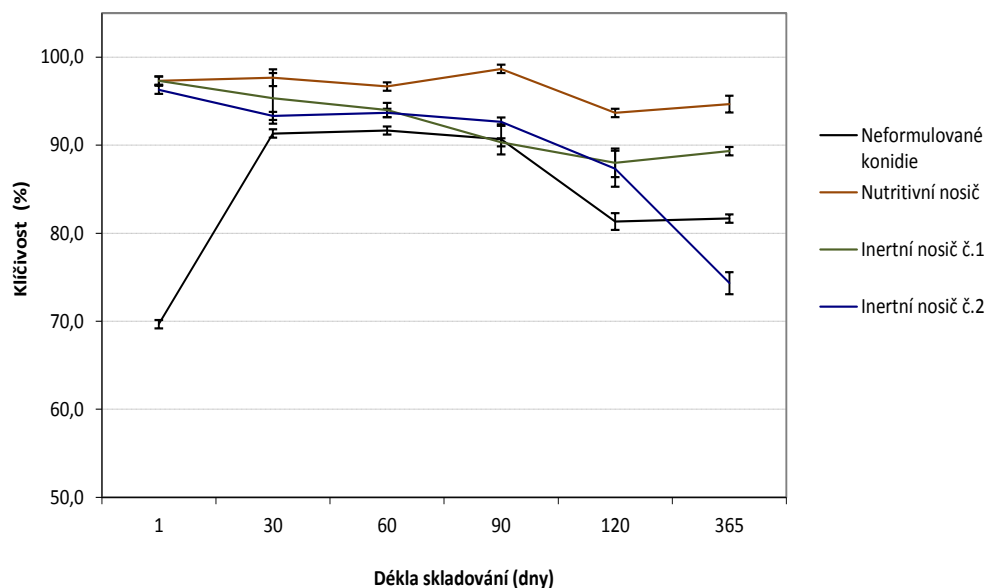
V jednotlivých hodnocených úsecích byla sledována vitalita spor hodnocená na základě klíčivosti a vývoje na 2% agaru. Vliv skladování na virulenci spor byl hodnocen na cílovém organismu *T. molitor*. Parametry statistického hodnocení pro klíčivost byly odlišné v průběhu sledování. Po 1 dnu nebyly nalezeny rozdíly mezi jednotlivými formulacemi ($F_{(3,8)}=2,2500$; $p=0,1598$). Po uplynutí 30 dnů už byly prokazatelné rozdíly ve všech hodnocených intervalech ($F_{(3,8)}=6,1628$; $p=0,0178$; $F_{(3,8)}=25,333$; $p=0,0002$; $F_{(3,8)}=33,563$; $p=0,0001$; $F_{(3,8)}=25,435$; $p=0,0002$ a $F_{(3,8)}=218,87$; $p=0,0000$ v pořadí hodnocení). Při porovnání vlivu délky skladování na klíčivost v rámci jedné formulace byly prokazatelné rozdíly mezi všemi hodnocenými termíny. Ve všech variantách došlo v průběhu 1 roku k poklesu klíčivosti, největší byl zaznamenán u spor formulovaných v IN2. Statistické rozdíly v rámci NK $F_{(5,12)}=95,962$; $p=0,0000$; NN $F_{(5,12)}=16,333$; $p=0,0001$; IN1 $F_{(5,12)}=13,458$; $p=0,0001$ a IN2 $F_{(5,12)}=116,43$; $p=0,0000$. Mezi všemi formulacemi za celou dobu sledování $F_{(3,68)}=7,6804$; $p=0,0002$. Nejvyšší procento klíčivých spor bylo zjištěno ve formulaci v NN.

Tabulka 9 Vitalita spor *B. bassiana* kmen Bba I101 v průběhu skladování v teplotě -20°C (24 hod).

Délka skladování (dny)	Klíčivost (%)							
	Neformulované konidie		Nutritivní nosič		Inertní nosič č.1		Inertní nosič č.2	
1	96,67±0,47	Aa	97,33±0,47	ABa	97,33±0,47	Aa	96,33±0,47	Aa
30	91,33±0,47	Bb	97,67±0,94	ABa	95,33±2,87	Aab	93,33±0,47	ABab
60	91,67±0,47	Bc	96,67±0,47	ABa	94,00±0,82	ABb	93,67±0,47	ABb
90	90,67±1,70	Bb	98,67±0,47	Aa	90,33±0,47	BCb	92,67±0,47	Bb
120	81,33±0,94	Cc	93,67±0,47	Ca	88,00±1,63	Cb	87,33±2,06	Cb
365	81,67±0,47	Cc	94,67±0,94	BCa	89,33±0,47	BCb	74,33±1,25	Dd

A,B,C – hodnoty v jednom sloupci označené stejným velkým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha<0,05$

a, b,c - hodnoty v jednom řádku označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha<0,05$

Graf 9 Klíčivost spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v průběhu skladování v různých nosičích (-20°C).Tabulka 10 Rychlost vývoje houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v průběhu skladování v teplotě -20°C (GI 24).

Délka skladování (dny)	Index vývoje (GI 24)			
	Neformulované konidie	Nutritivní nosič	Inertní nosič č.1	Inertní nosič č.2
1	1,73±0,58	1,78±0,48	1,74±0,50	1,74±0,52
30	1,45±0,70	1,89±0,40	1,76±0,59	1,84±0,51
60	1,77±0,78	2,10±0,47	1,82±0,53	1,87±0,49
90	1,80±0,65	2,05±0,57	1,63±0,70	1,76±0,59
120	1,52±0,80	2,21±0,66	1,45±0,72	1,55±0,72
365	1,68±0,72	1,86±0,47	1,79±0,62	1,41±0,87

Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

V jednotlivých etapách kontroly v průběhu skladování byly zjištěny průkazné rozdíly i v případě rychlosti vývoje houby. U každého použitého nosiče byly rozdíly prokazatelné v jiné délce skladování. Zatímco u NK to bylo mezi 30. a 90. dnem skladování ($H_{(5,N=18)}=15,8468$; $p=0,0073$), v případě NN byly při hodnocení nalezeny rozdíly mezi počáteční hodnotou v čase 1 a hodnotou zjištěnou po 120 dnech skladování ($H_{(5,N=18)}=16,0614$; $p=0,0067$), kde po delším skladování byl vývoj houby dokonce rychlejší než na počátku hodnocení. U IN1 byly odlišnosti zjištěny mezi hodnotami dosaženými po 60 a 120 dnech ($H_{(5,N=18)}=16,0809$; $p=0,0066$), v tomto případě GI 24 v pozdějším čase skladování naopak pokleslo. V případě posledního použitého nosiče IN2 pak byly hodnoty průkazně odlišné mezi 60 a 365 dny ($H_{(5,N=18)}=15,9240$; $p=0,0071$). V průběhu času nevykázal vývoj GI přímou tendenci, u každé formulace bylo nejvyšší rychlosti dosaženo v jiném čase.

Při hodnocení rozdílů ve vývoji houby mezi formulacemi v jednom čase skladování lze uvést, že všechny zjištěné odlišnosti byly mezi NN, kde byly zjištěny vždy vyšší hodnoty a některým z dalších nosičů. Jedinou výjimkou byl čas 1, kdy nebyly nalezeny žádné statisticky průkazné rozdíly. V čase 30 a 60 pak byly rozdíly v rychlosti vývoje houby imobilizované v NN a NK ($H_{(3,N=12)}=10,4211$; $p=0,153$; $H_{(3,N=12)}=9,8421$; $p=0,0200$). Po 90 a 120 dnech byly odlišnosti mezi variantami formulovanými v NN a IN1 ($H_{(3,N=12)}=9,8421$; $p=0,0200$; $H_{(3,N=12)}=8,1053$; $p=0,0439$) a při závěrečném hodnocení po 365 dnech byl prokazatelný rozdíl mezi variantami v NN a IN2 ($H_{(3,N=12)}=10,4578$; $p=0,0151$).

Tabulka 11 Virulence houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvách *T. molitor* v průběhu skladování formulací v teplotě -20°C .

Délka skladování (dny)	Délka biotestu (dny)	FDI na larvách <i>T. molitor</i>			
		Neformulované konidie	Nutritivní nosič	Inertní nosič č.1	Inertní nosič č.2
1	4	2,60±0,55	1,53±0,91	2,68±0,35	1,78±1,08
	6	2,85±0,37	1,90±0,87	2,98±0,05	2,63±0,76
	8	3,00	2,67±0,48	3,00	2,65±0,62
60	4	1,63±0,71	1,60±0,92	1,83±0,77	1,50±0,96
	6	1,55±0,78	1,88±0,93	2,38±0,59	1,58±0,95
	8	2,38±0,49	2,65±0,52	2,68±0,49	1,90±0,92
90	4	0,58±0,45	0,80±0,66	0,53±0,40	0,60±0,44
	6	0,98±0,71	1,62±0,99	1,22±0,83	1,32±0,97
	8	2,27±0,93	2,37±0,87	2,46±0,86	2,10±1,11
120	4	1,57±0,44	1,70±0,54	1,33±0,78	1,35±0,54
	6	1,83±0,47	1,90±0,40	1,73±0,73	1,68±0,71
	8	2,85±0,45	2,52±0,48	2,30±0,80	2,03±0,74
365	4	2,08±0,36	2,02±0,29	1,72±0,40	1,38±0,65
	6	2,20±0,29	2,28±0,38	1,98±0,50	1,90±0,43
	8	3,00	3,00	3,00	2,98±0,05

Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

Při hodnocení vývoje houby na larvách *T. molitor* byly zjištěny statisticky průkazné rozdíly mezi více formulacemi a časy najednou. Na počátku skladování byl nejrychlejší vývoj a tedy nejvyšší hodnoty FDI zjišťovány mezi NK a Bba I101 imobilizované v IN1. Po 60 dnech skladování se hodnota indexu vývoje Bba I101 na larvách o něco snížila, hodnoty zjištěné u variant formulovaných v IN1 a NN byly statisticky srovnatelné. Po 90 dnech skladování nebyly v rámci vývoje na hostitelském organismu mezi jednotlivými formulacemi statisticky prokazatelné rozdíly. Po 120 dnech skladování dosáhly na počátku biotestu nejvyšších hodnot spory Bba I101 formulované v NN, srovnatelného vývoje dosáhly i NK. Po uplynutí 365 dnů skladování byla rozdílná rychlost vývoje houby na počátku biotestu, kdy nejvyšší hodnoty FDI byly zjištěné u variant ošetřených sporami uloženými v NN a neformulovanými konidiami. V průběhu testu došlo k postupnému vyrovnání hodnot a při jeho ukončení po 8 dnech nebyl mezi jednotlivými variantami nalezen statisticky prokazatelný rozdíl. Z důvodu vyšší přehlednosti je statistické vyhodnocení shrnuto v následujících tabulkách.

Tabulka 12 Statistické vyjádření rozdílů ve vývoji houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvách *T. molitor* v průběhu skladování formulací v teplotě -20°C.

Den skladování (dny)	Délka biotestu (dny)		
	4	6	8
1	Konidie/Nutritivní n.; Inertní n.č.2 (p=0,0001; p=0,0146) Inertní n.č.1/ Nutritivní n.; Inertní n.č.2 (p=0,0000); (p=0,0084) $H_{(3, N=120)}=32,93988$; p=0,0000	Konidie/Nutritivní n.; Inertní n.č.2 (p=0,0002; 0,0262) Inertní n.č.1/ Nutritivní n.; Inertní n.č.2 (p=0,0000); (p=0,0016) $H_{(3, N=120)}=43,38434$; p=0,0000	Konidie; Inertní n.č.1/Inertní n.č.2; (p=0,0019) $H_{(3, N=120)}=34,39099$; p=0,0000
60	^y	Inertní n.č.1/Konidie; Inertní n.č.2 (p=0,0038); (p=0,0016) $H_{(3, N=120)}=19,60587$; p=0,0002	Nutritivní n./Inertní n.č.2 (p=0,0049) Inertní n.č.1/Inertní n.č.2 (p=0,0016) $H_{(3, N=120)}=19,60587$; p=0,0002
90	^y	^y	^y
120	Nutritivní n./Inertní n.č.1 (p=0,0336) $H_{(3, N=120)}=10,60320$; p=0,0141	^y	Konidie/Nutritivní n.; Inertní n.č.1; Inertní n.č.2 (p=0,0396); (p=0,0092); (p=0,0000) $H_{(3, N=120)}=25,74106$; p=0,0000
365	Konidie/Inertní n.č.2 (p=0,0003) Nutritivní n./Inertní n.č.2 (p=0,0022) $H_{(3, N=120)}=24,57937$; p=0,0000	Nutritivní n./Inertní n.č.2 (p=0,0450) $H_{(3, N=120)}=12,65107$; p=0,0055	^y

Pozn. Formulace uvedené před lomítkem dosáhly v biotestu vyšších hodnot než varianty uvedené za lomítkem. Hodnoty byly posouzeny na základě Kruskal – Wallisova testu.

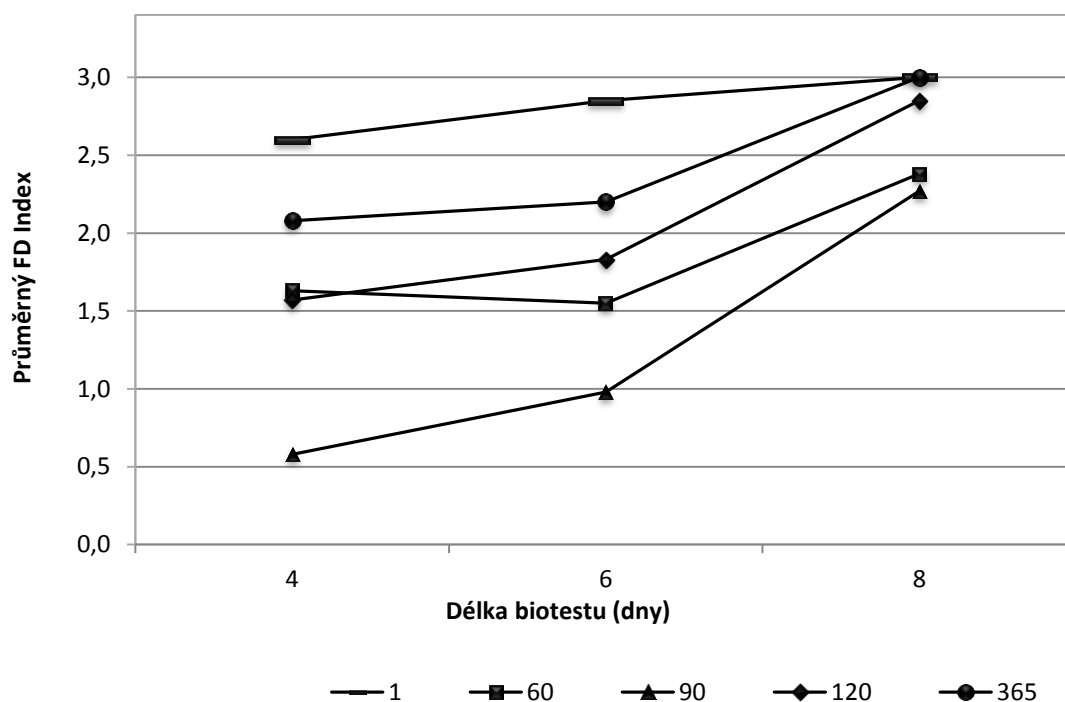
^y Mezi jednotlivými variantami nebyly nalezeny statisticky průkazné rozdíly.

Tabulka 13 Vyjádření statisticky průkazných rozdílů ve vývoji houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvách *T. molitor* v jednotlivých intervalech hodnocení (-20°C).

Den skladování (dny)	Délka biotestu (dny)		
	4	6	8
Neformulované konidie	1/60; 120 (p=0,0002; p=0,0001) Ostatní/ 90 (p=0,0000-0,0007) $H_{(4, N=150)}=82,11309$; p=0,0000	1/Ostatní (p=0,0000-0,0079) 120; 365/90 (p=0,0174; p=0,0000) $H_{(4, N=150)}=75,92976$; p=0,0000	1/60; 90 (p=0,0003; p=0,0095) 120; 365/60 (p=0,0025; p=0,0003) 365/90 (p=0,0095) $H_{(4, N=150)}=56,76532$; p=0,0000
Nutritivní nosič	Ostatní/ 90 (p=0,0000-0,0019) $H_{(4, N=150)}=36,16316$; p=0,0000	^y	365/90; 120 (p=0,0161; p=0,0032) $H_{(4, N=150)}=21,58374$; p=0,0002
Inertní nosič č.1	1/Ostatní (p=0,0000-0,0055) Ostatní/90 (p=0,0000-0,0144) $H_{(4, N=150)}=84,23303$; p=0,0000	1/Ostatní (p=0,0000-0,0112) 60/90; 120 (p=0,0000; p=0,0376) $H_{(4, N=150)}=76,03498$; p=0,0000	1; 365/120 (p=0,0013) $H_{(4, N=150)}=38,10463$; p=0,0000
Inertní nosič č.2	Ostatní/ 90 (p=0,0000-0,0043) $H_{(4, N=150)}=25,98793$; p=0,0000	1/90 (p=0,0010) $H_{(4, N=150)}=17,66364$ p=0,0014	365/1; 60; 120 (p=0,0000-0,0442) $H_{(4, N=150)}=36,96067$; p=0,0000

Pozn. Časy uvedené před lomítkem dosáhly v biotestu vyšších hodnot než varianty uvedené za lomítkem. Hodnoty byly posouzeny na základě Kruskal – Wallisova testu.

^y Mezi jednotlivými variantami nebyly nalezeny statisticky průkazné rozdíly.

Graf 10 Vliv délky skladování neformulovaných konidií houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na virulenci (skladování v teplotě -20°C, biotest FDI).

Tabulka 14 Kumulovaná mortalita larev *T. molitor* vyvolaná sporami *B. bassiana* kmen Bba I101 skladovanými v teplotě -20°C.

Délka skladování (dny)	Kumulovaná mortalita ^z									
	Neošetřená kontrola		Neformulované konidie		Nutritivní nosič		Inertní nosič č.1		Inertní nosič č.2	
4. den biotestu										
1	10,52±8,69 (3,33)	Ab	79,48±8,69 (96,63)	Aa	65,91±16,03 (83,27)	ABa	90,00±0,00 (100)	Aa	58,91±11,11 (73,27)	Aa
60	0,00 (0,00)	Ab	65,91±3,83 (83,27)	Aa	58,91±3,13 (73,27)	ABa	65,91±3,83 (83,27)	Aa	54,74±5,97 (66,61)	Aa
90	0,00 (0,00)	Ab	37,27±2,84 (36,62)	Ba	43,09±11,41 (46,61)	Ba	33,21±0,00 (29,96)	Ba	43,09±7,31 (36,62)	Aa
120	0,00 (0,00)	Ab	75,04±8,69 (93,29)	Aa	79,48±8,69 (96,63)	Aa	65,91±16,03 (83,27)	Aa	65,91±14,35 (83,27)	Aa
365	0,00 (0,00)	Ac	79,48±8,69 (96,63)	Aab	90,00±0,00 (100)	Aa	68,58±12,52 (86,60)	Aab	61,12±8,56 (76,60)	Ab
6. den biotestu										
1	21,42±3,83 (13,32)	Ab	79,48±6,60 (96,63)	ABa	75,04±12,52 (93,29)	ABa	90,00±0,00 (100)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa
60	14,96±8,69 (6,65)	Ab	65,91±6,97 (83,27)	Ba	65,91±3,83 (83,27)	ABa	79,48±8,69 (96,63)	Aa	65,91±14,35 (83,27)	ABa
90	10,52±8,69 (3,33)	Ab	48,83±2,72 (56,60)	Ca	61,12±8,56 (76,60)	Ba	56,79±5,17 (69,92)	Ba	52,73±2,84 (63,26)	Ba
120	0,00 (0,00)	Ab	79,48±8,69 (96,63)	ABa	79,48±8,69 (96,63)	ABa	71,57±11,11 (89,95)	ABa	65,91±14,35 (83,27)	ABa
365	10,52±8,69 (3,33)	Ab	90,00±0,00 (100)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa	79,48±8,69 (96,63)	Aa	75,04±12,52 (93,29)	Aa
8. den biotestu										
1	21,42±3,82 (13,32)	Ab	90,00±0,00 (100)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa
60	14,96±8,69 (6,65)	Ab	90,00±0,00 (100)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa	79,48±8,69 (96,63)	Aa	68,58±13,59 (86,60)	Aa
90	10,52±8,69 (3,33)	Ab	71,57±0,00 (89,95)	Ba	79,48±8,69 (96,63)	Aa	71,57±0,00 (89,95)	Aa	68,58±12,52 (86,60)	Aa
120	10,52±8,69 (3,33)	Ab	79,48±8,69 (96,63)	ABa	90,00±0,00 (100)	Aa	75,04±12,52 (93,29)	Aa	79,48±8,69 (96,63)	Aa
365	10,52±8,69 (3,33)	Ab	90,00±0,00 (100)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa

A,B,C – hodnoty v jednom sloupci označené stejným velkým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

a,b,c - hodnoty v jednom řádku označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

^z Průměr dat ($x \pm SE$) vyjádřených jako úhlové hodnoty [$\arcsin \sqrt{(\text{počet všech mrtvých a infikovaných larev} / \text{celkový počet všech larev})}$]. Mortalita (%) je uvedena v závorkách

Tabulka 15 Statistické parametry vyhodnocení mortality larev *T. molitor* vyvolané houbou *B. bassiana* kmen Bba I101 skladovanou v teplotě -20°C.

Den	Délka skladování					Formulace				
	1	60	90	120	365	rola	NK	NN	IN1	IN2
	df = 4, 10					df = 5, 12				
4	F=20,994 p=0,0001	F=104,37 p=0,0000	F=16,766 p=0,0002	F=19,142 p=0,0001	F=42,632 p=0,0000	F=1,0000 p=0,4516	F=15,364 p=0,0003	F=7,7065 p=0,0042	F=9,9942 p=0,0016	F=2,0311 p=0,1657
6	F=34,92 p=0,0000	F=18,021 p=0,0001	F=26,376 p=0,0000	F=26,185 p=0,0000	F=42,172 p=0,0000	F=2,6479 p=0,0965	F=13,712 p=0,0005	F=4,5087 p=0,0244	F=5,4979 p=0,0132	F=3,3875 p=0,0535
8	F=645,54 p=0,0000	F=32,254 p=0,0000	F=31,524 p=0,0000	F=32,478 p=0,0000	F=186,22 p=0,0000	F=1,3680 p=0,3122	F=8,5000 p=0,0030	F=1,0000 p=0,4516	F=2,5010 p=0,1093	F=1,8614 p=0,1939

Vyhodnocení provedeno na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

Spory skladované v teplotě -20°C , ať už se jednalo o NK nebo konidie uchovávané s použitím některého z nosičů, si udržely vysokou vitalitu i po 365 dnech. V některých ukazatelích došlo dokonce k nárůstu zjištěných hodnot oproti původní kontrole. Takovým ukazatelem je kumulovaná mortalita larev *T. molitor* vyvolaná skladovanými spory a index vývoje Bba I101 na těle larev. Ve formulaci, kde byl použit NN vykazovaly spory velmi stabilní klíčivost, která se po celý rok pohybovala nad 93% a rovněž GI bylo nejvyšší ze všech variant. Co se týká virulence a způsobené mortality larev *T. molitor*, není možné jednoznačně říci, která varianta vykazovala nejlepší výsledky. Mezi formulacemi byly prokazatelné rozdíly zejména na počátku biotestu, nicméně mortalita dosahovala po 8 dnech biotestu 100% a nejnižší zjištěná hodnota FDI po 8 dnech biotestu byla 1,9 v případě použití IN2 po 60 dnech skladování. Všechny ostatní hodnoty byly nad hranicí FDI 2,0.

5.2.2. Ovlivnění vitality a virulence houby *B. bassiana* v průběhu skladování ve 4°C

Klíčivost vyhodnocovaná po 24 hodinách byla u spor Bba I101 uložených ve všech formulacích více než 83%, v případě použití formulace v NN dokonce téměř 97%, a to i po 365 dnech skladování. Výjimkou byly spory imobilizované v IN2, kde po 90 dnech klesla klíčivost na hodnotu 41,67%. Jednalo se o nejméně výraznější pokles v rámci všech formulací ($F_{(5,12)}=1048,4$; $p=0,0000$). Co se týká spor skladovaných v NN, uchovaly si finalizované spory vysokou klíčivost i po 365 dnech skladování a mezi hodnotami tak nebyly zjištěny průkazné odlišnosti. V případě hodnocení neformulovaných konidií došlo k mírnému poklesu klíčivosti ($F_{(5,12)}=62,089$; $p=0,0000$) a stejný trend byl sledován i při použití IN1 ($F_{(5,12)}=63,600$; $p=0,0000$). Při hodnocení vlivu formulace na klíčivost spor v jednotlivých časových úsecích, nebyly zjištěny prokazatelné odlišnosti na počátku hodnocení. Od 30.dne se pak jednotlivé formulace odlišovaly ve vlivu na uchování kvality spor v jednotlivých hodnocených úsecích. Prokazatelné rozdíly byly na úrovni $p=0,0000$ ($F_{(3,8)}=80,667$, $F_{(3,8)}=56,563$, $F_{(3,8)}=5884,3$, $F_{(3,8)}=584,63$, $F_{(3,8)}=1421,4$ ve vzestupném pořadí).

Tabulka 16 Klíčivost spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v průběhu skladování ve 4°C .

Délka skladování (dny)	Klíčivost (%)							
	Neformulované konidie		Nutritivní nosič		Inertní nosič č.1		Inertní nosič č.2	
1	96,67±0,47	Aa	97,33±0,47	Aa	97,33±0,47	Aa	96,33±0,47	Aa
30	88,33±0,47	BCc	97,00±0,00	Aa	94,33±0,47	Bb	94,33±0,94	ABb
60	85,67±1,25	CDc	97,67±0,47	Aa	93,67±1,25	Bb	91,33±0,47	Bb
90	89,67±0,47	Bb	97,67±0,47	Aa	89,33±0,47	Cb	41,67±0,47	Dc
120	87,67±1,25	BCb	96,67±0,47	Aa	88,67±1,25	Cb	40,67±2,36	Dc
365	83,33±0,47	Db	96,67±0,47	Aa	84,67±0,47	Db	50,33±1,25	Cc

A,B,C – hodnoty v jednom sloupci označené stejným velkým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha<0,05$

a,b,c - hodnoty v jednom řádku označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha<0,05$

Při hodnocení rozdílů v rychlosti vývoje houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na 2% agaru byly nalezeny prokazatelné odlišnosti v různých časech hodnocení. V případě formulace v NK byl rozdíl mezi dny 60 a 90 ($H_{(5,N=18)}=15,8304$; $p=0,0073$), v případě formulace v NN se lišily hodnoty zjištěné v čase 1 a 60 ($H_{(5,N=18)}=12,9298$; $p=0,0240$). V obou případech byla vyšší rychlost vývoje houby zjištěna po delší době skladování. Co se týká inertních nosičů, byl rozdíl u obou variant po 30 dnech, kdy dosažená hodnota GI byla nejvyšší v průběhu celého hodnocení. Naopak nejnižší zjištěná hodnota byla zjištěna po 90 dnech u spor skladovaných v IN1 a po 120 dnech při použití formulace spor v IN2 ($H_{(5,N=18)}=16,3261$; $p=0,0060$; $H_{(5,N=18)}=15,4253$; $p=0,0087$). V rámci hodnocení odlišností

v jednom čase se z hlediska zachování vitality projevila jako nejlepší formulace spor Bba I101 v NN. Index vývoje houby zjištěný při hodnocení této formulace byl nejvyšší a hodnoty se průkazně odlišovaly od ostatních variant. S výjimkou času 1, kde nebyly zjištěny rozdíly. V intervalu 30 a 60 byl zjištěn nejpomalejší vývoj Bba I101 při skladování neformulovaných konidií ($H_{(3,N=12)}=10,3846$; $p=0,0156$; $H_{(3,N=12)}=10,4211$; $p=0,0153$). Od 90.dne skladování pak došlo k rychlému poklesu vitality spor skladovaných v IN2 a dosažené hodnoty GI byly v případě použití tohoto nosiče jednoznačně nejnižší ($H_{(3,N=12)}=10,3846$; $p=0,0156$; $H_{(3,N=12)}=9,4615$; $p=0,0237$; $H_{(3,N=12)}=10,4211$; $p=0,0153$).

Tabulka 17 Vývoj houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v průběhu skladování ve 4°C.

Délka skladování (dny)	Index vývoje (GI 24)			
	Neformulované konidie	Nutritivní nosič	Inertní nosič č.1	Inertní nosič č.2
1	1,73±0,58	1,78±0,48	1,74±0,50	1,74±0,52
30	1,60±0,72	1,89±0,39	1,84±0,51	1,76±0,57
60	1,44±0,77	2,06±0,41	1,79±0,54	1,71±0,63
90	1,74±0,65	1,92±0,40	1,44±0,73	0,90±0,87
120	1,52±0,77	1,87±0,54	1,47±0,72	0,71±0,89
365	1,65± 0,75	1,91±0,38	1,69±0,72	0,98±0,98

Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

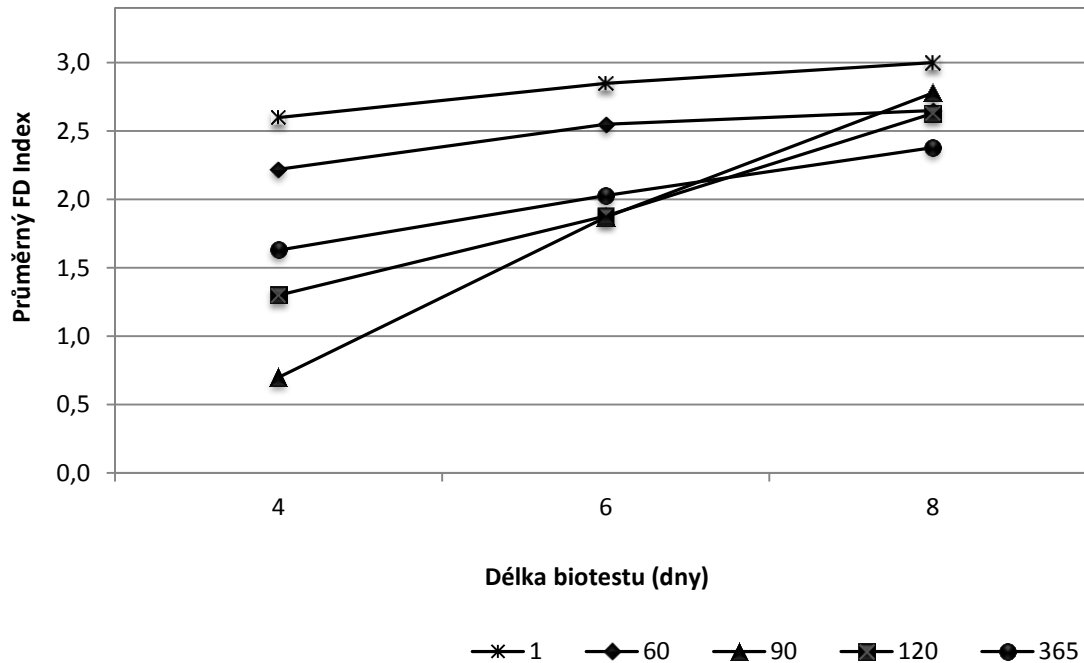
Vliv skladování spor Bba I101 se projevil i v případě virulence, ačkoli rozdíly nebyly příliš výrazné. Vývoj houby na larvách *T. molitor* byl hodnocen ve dnech 4, 6 a 8 od založení biotestu. V této době dosáhly plné sporulace mycelia na povrchu larev pouze dvě varianty na počátku skladování. U naprosté většiny variant však byla zahájena tvorba konidií. Po 90 dnech skladování došlo k poklesu rychlosti vývoje houby, což se projevilo zejména v počáteční fázi biotestu. Statistické rozdíly mezi jednotlivými variantami jsou shrnuty v následujících tabulkách

Tabulka 18 Vývoj houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na těle larev *T. molitor* při hodnocení virulence v průběhu skladování ve 4°C.

Délka skladování (dny)	Délka biotestu (dny)	FDI na larvách <i>T. molitor</i>			
		Neformulované konidie	Nutritivní nosič	Inertní nosič č.1	Inertní nosič č.2
1	4	2,60±0,55	1,53±0,91	2,68±0,35	1,78±1,08
	6	2,85±0,37	1,90±0,87	2,98±0,05	2,63±0,76
	8	3,00	2,67±0,48	3,00	2,65±0,62
60	4	2,22±0,68	1,62±0,13	2,03±0,56	1,78±1,03
	6	2,55±0,70	1,90±0,15	2,63±0,53	1,98±0,89
	8	2,65±0,58	2,53±0,15	2,87±0,28	2,32±0,69
90	4	0,70±0,60	1,05±0,72	0,68±0,58	0,77±0,40
	6	1,87±0,69	1,60±0,96	1,58±0,88	1,33±0,91
	8	2,78±0,40	2,73±0,61	2,55±0,83	2,75±0,04
120	4	1,30±0,70	1,47±0,50	1,30±0,54	0,53±0,48
	6	1,88±0,61	1,78±0,38	1,57±0,72	1,45±0,45
	8	2,63±0,47	2,27±0,37	2,27±0,87	1,83±0,55
365	4	1,63±0,62	1,82±0,62	1,78±0,29	1,75±0,38
	6	2,03±0,33	2,12±0,39	2,23±0,32	2,02±0,40
	8	2,38±0,42	2,58±0,40	2,47±0,42	2,38±0,44

Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

Graf 11 Vývoj houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvách *T. molitor* v průběhu skladování v teplotě 4°C (neformulované konidie).



Tabulka 19 Statistické vyjádření rozdílů ve vývoji houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvách *T. molitor* mezi formulacemi skladovanými ve 4°C.

Den skladování (dny)	Délka biotestu (dny)		
	4	6	8
1	Konidie/Nutritivní n.; Inertní n.č.2 (p=0,0001; p=0,0146) Inertní n.č.1/Nutritivní n.; Inertní n.č.2 (p=0,0000); (p=0,0084) $H_{(3, N=120)}=32,93988$; p=0,0000	Konidie/Nutritivní n.; Inertní n.č.2 (p=0,0002; p=0,0262) Inertní n.č.1/Nutritivní n.; Inertní n.č.2 (p=0,0000); (p=0,0016) $H_{(3, N=120)}=43,38434$; p=0,0000	Konidie; Inertní n.č.1/ Inertní n.č.2 (p=0,0019) $H_{(3, N=120)}=34,39099$; p=0,0000
60	Konidie/Nutritivní n. (p=0,0326) $H_{(3, N=120)}=8,596665$; p=0,0352	Konidie; Inertní n.č.1/ Nutritivní n (p=0,0218; p=0,0086) $H_{(3, N=120)}=18,05103$; p=0,0004	Inertní n.č.1/Inertní n.č.2 (p=0,0226) $H_{(3, N=120)}=12,36971$; p=0,0062
90	y	y	y
120	Ostatní /Inertní n.č.2 (p=0,0000-0,0004) $H_{(3, N=120)}=36,02845$; p=0,0000	y	Konidie /Inertní n.č.2; (p=0,0000) $H_{(3, N=120)}=25,21053$; p=0,0000
365	y	y	y

Formulace uvedené před lomítkem dosáhly v biotestu vyšších hodnot než varianty uvedené za lomítkem. Hodnoty byly posouzeny na základě Kruskal – Wallisova testu.

^y Mezi jednotlivými variantami nebyly nalezeny statisticky průkazné rozdíly.

Tabulka 20 Statistické vyjádření rozdílů ve vývoji houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvách *T. molitor* (skladování ve 4°C, rozdíly mezi intervaly hodnocení).

Den skladování (dny)	Délka biotestu (dny)		
	4	6	8
Neformulované konidie	1/90; 120; 365 (p=0,0000-0,0010) 60/90; 120 (p=0,0000; p=0,0037) 365/90 (p=0,0054) $H_{(4, N=150)}=69,03261$; p=0,0000	1/90; 120; 365 (p=0,0000-0,0001) 60/90; 120; 365 (p=0,0069-0,0262) $H_{(4, N=150)}=47,41708$; p=0,0000	1; 60; 90/365 (p=0,0000-0,0357) $H_{(4, N=150)}=38,66952$; p=0,0000
Nutritivní nosič	60; 365/90 (p=0,0302; p=0,0014) $H_{(4, N=150)}=17,39819$; p=0,0016	^y	1; 60; 90/120 (p=0,0001-0,0137) $H_{(4, N=150)}=27,48673$; p=0,0000
Inertní nosič č.1	1/Ostatní (p=0,0000-0,0351) 60/90; 120 (p=0,0000; p=0,0044) 365/90 (p=0,0000) $H_{(4, N=150)}=89,87815$; p=0,0000	1/90; 120; 365 (p=0,0000) 60/90; 120; 365 (p=0,0001; p=0,0000) $H_{(4, N=150)}=73,30608$; p=0,0000	1/120; 365 (p=0,0067; p=0,0003) 365/60 (p=0,0288) $H_{(4, N=150)}=32,70640$; p=0,0000
Inertní nosič č.2	1; 60; 365/90 (p=0,0002-0,0022) 1; 60; 365/120 (p=0,0000) $H_{(4, N=150)}=52,41681$; p=0,0000	1; 60; 365/90 (p=0,0004-0,0050) 1; 365/120 (p=0,0024; p=0,0228) $H_{(4, N=150)}=28,77560$; p=0,0000	1; 60; 90/120 (p=0,0000-0,0444) $H_{(4, N=150)}=34,70395$; p=0,0000

Časy uvedené před lomítkem dosáhly v biotestu vyšších hodnot než varianty uvedené za lomítkem.

^y Mezi jednotlivými variantami nebyly nalezeny statisticky průkazné rozdíly, Kruskal-Wallisův test.

Z výsledků je patrné, že nejpomalejší průběh infekce byl po 8 dnech biotestu zjištěn u pokusů založených se sporami imobilizovanými v IN2 prakticky ve všech hodnoceních. Co se týká vlivu délky skladování na virulenci spor, byly nejnižší hodnoty FDI dosažené po 8 dnech biotestu po 120 dnech skladování, s výjimkou neformulovaných konidií, kde byla nejnižší hodnota zjištěna po 365 dnech skladování. Přesto byly hodnoty vysoké a spory si zachovaly vysokou virulenci po celou dobu skladování. Schopnost spor Bba I101 udržet si virulenci v průběhu 1 roku skladování je zjevná i z hodnot mortality vyvolané u larev *T. molitor*, která byla hodnocena v rámci testů virulence. Stejně jako v předchozích hodnoceních, došlo ke zpomalení nástupu infekce při hodnocení 90 dnů po uskladnění. Mortalita vyvolaná u larev 4 dny po zahájení biotestu se pohybovala v rozmezí 33,28% (NK) až 59,8% (NN). Jednalo se zhruba o 1/3 až 1/2 hodnot mortality zjištěné na počátku skladování. I přesto se hodnoty mortality po ukončení biotestu nacházely v intervalu 93,29-100%. Znamená to, že ačkoli počáteční fáze infekce byla pozvolnější, v krátkém čase došlo k progresivnímu vývoji.

V rámci hodnocených parametrů byl u některých prokázán vliv použité formulace na uchování vlastností spor *B. bassiana* kmen Bba I101 v průběhu skladování ve 4°C. Jednalo se o klíčivost a vývoj spor na 2% agaru, které byly pozitivně ovlivněny použitím NN. U ostatních hodnocených parametrů nebyl zaznamenán prokazatelný vliv na schopnost spor Bba I101 uchovat si kvalitativní vlastnosti na stejné úrovni jako na počátku skladování. K poklesu hodnot zkoumaných parametrů došlo výrazně pouze u spor imobilizovaných v IN2 při hodnocení vývoje houby na 2% agaru.

Tabulka 21 Kumulovaná mortalita larev *T. molitor* vyvolaná houbou *B. bassiana* kmen Bba I101 skladovanou v teplotě 4°C.

Délka skladování (dny)	Kumulovaná mortalita ^z									
	Neošetřená Kontrola		Neformulované Konidie		Nutritivní nosič		Inertní nosič č.1		Inertní nosič č.2	
4. den biotestu										
1	10,52±8,69 (3,33)	Ab	79,48±8,69 (96,63)	Aa	65,91±16,03 (83,27)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa	56,79±13,73 (69,93)	ABa
60	0,00 (0,00)	Ac	68,58±13,59 (86,60)	Aab	65,91±6,97 (83,27)	Aab	90,00±0,00 (100)	Aa	58,91±5,97 (73,27)	ABb
90	0,00 (0,00)	Ab	35,26±11,41 (33,28)	Bab	48,83±2,72 (56,60)	Aa	50,77±18,73 (59,94)	Ba	46,91±12,44 (53,27)	ABa
120	0,00 (0,00)	Ad	63,43±0,00 (79,93)	ABab	71,57±0,00 (89,95)	Aa	61,12±3,13 (76,60)	ABb	33,21±5,17 (29,96)	Bc
365	0,00 (0,00)	Ab	68,58±3,83 (86,60)	Aa	71,57±11,11 (89,95)	Aa	79,48±8,69 (96,63)	Aa	75,04±8,69 (93,29)	Aa
6. den biotestu										
1	21,42±3,83 (13,32)	Ab	79,48±8,69 (96,63)	Aa	75,04±12,52 (93,29)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa
60	14,96±8,69 (6,65)	Ab	79,48±8,69 (96,63)	Aa	75,04±8,69 (93,29)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa	75,04±8,69 (93,29)	Aa
90	10,52±8,69 (3,33)	Ab	63,43±18,47 (79,93)	Aa	68,58±3,83 (86,60)	Aa	65,91±6,97 (83,27)	Ba	58,91±3,13 (73,27)	Ba
120	0,00 (0,00)	Ac	90,00±0,00 (100)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa	65,91±3,83 (83,27)	Bb	79,48±8,69 (96,63)	Aa
365	10,52±8,69 (3,33)	Ab	90,00±0,00 (100)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa
8. den biotestu										
1	21,42±3,89 (13,32)	Ab	90,00±0,00 (100)	a	90,00±0,00 (100)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa
60	14,96±8,69 (6,65)	Ab	90,00±0,00 (100)	a	79,48±8,9 (96,63)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa	79,48±8,69 (96,63)	Aa
90	10,52±8,69 (3,33)	Ab	90,00±0,00 (100)	a	79,48±8,69 (96,63)	Aa	75,04±8,69 (93,29)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa
120	10,52±8,69 (3,33)	Ab	90,00±0,00 (100)	a	90,00±0,00 (100)	Aa	79,48±8,69 (96,63)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa
365	10,52±8,69 (3,33)	Ab	90,00±0,00 (100)	a	90,00±0,00 (100)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa

A,B,C – hodnoty v jednom sloupci označené stejným velkým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

a,b,c - hodnoty v jednom řádku označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

^z Průměr dat ($\bar{x} \pm SE$) vyjádřených jako úhlové hodnoty [$\arcsin \sqrt{(\text{počet všech mrtvých a infikovaných larev} / \text{celkový počet všech larev})}$]. Mortalita (%) je uvedena v závorkách

Tabulka 22 Statistické vyhodnocení mortality larev *T. molitor* vyvolané houbou *B. bassiana* kmen Bba I101 (spory skladované ve 4°C).

Der	Délka skladování (dny)					Formulace				
	1	60	90	120	365	rola	NK	NN	IN1	IN2
	df = 4, 10									
4	F=18,75p =0,0001	F=43,558 p=0,0000	F=7,1297 p=0,0056	F=237,45 p=0,0000	F=41,316 p=0,0000	F=1,000 p=0,4516	F=8,5198 p=0,0029	F=2,4520 p=0,1140	F=7,2428 p=0,0053	F=5,6492 p=0,0121
6	F=34,923 p=0,0000	F=33,327 p=0,0000	F=14,88 p=0,0003	F=161,48 p=0,0000	F=186,22 p=0,0000	F=2,6479 p=0,0965	F=1,5189 p=0,2692	F=3,227 p=0,0605	F=26,457 p=0,0000	F=10,271 p=0,0014
8	F=645,54 p=0,0000	F=49,593p =0,0000	F=56,582 p=0,0000	F=90,196 p=0,0000	F=186,22 p=0,0000	F=1,3680 p=0,3122	---	F=,75000 p=0,5801	F=2,0000 p=0,1705	F=1,000 p=0,4516

Vyhodnocení provedeno na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

5.2.3. Ovlivnění vitality a virulence houby *B. bassiana* v průběhu skladování ve 22°C

Hodnocení jednotlivých formulací v průběhu skladování ve 22°C mělo poněkud širší charakter, protože zahrnovalo nejen formulace práškové, ale rovněž olejové. V případě práškových formulací probíhaly biotesty stejným způsobem jako u předchozích dvou teplot. U formulací v olejích byla hodnocena kvalita uchovávaných spor po naředění na 2% koncentraci. Vzhledem k tomu, že tekuté formulace byly určeny pro dlouhodobější skladování spor, bylo hodnocení provedeno na počátku skladování a následně až po uplynutí jednoho roku.

5.2.3.1. Hodnocení práškových nosičů

Při hodnocení práškových nosičů byly použity stejné postupy ve všech skladovacích teplotách. I v teplotě 22°C byla hodnocení zahájena testem vitality a následně byl proveden test virulence na larvách *T. molitor*.

Tabulka 23 Klíčivost spor *B. bassiana* kmen Bba I101 formulovaných v práškových nosičích v průběhu skladování ve 22°C.

Délka skladování (dny)	Klíčivost (%)							
	Neformulované konidie		Nutritivní nosič		Inertní nosič č.1		Inertní nosič č.2	
1	96,67±0,47	Aa	97,33±0,47	Aa	97,33±0,47	Aa	96,33±0,47	Aa
30	58,67±1,70	Bc	96,33±0,47	Aa	93,00±0,82	Aa	73,67±1,25	Bb
60	36,33±2,05	Cc	87,33±0,94	Ba	45,33±2,63	Bb	43,33±1,89	Cb
90	12,33±0,47	Dc	56,00±2,16	Ca	44,33±1,70	Bb	15,00±1,41	Dc
120	10,00±4,32	Dc	12,33±1,70	Dc	44,67±1,25	Ba	22,33±0,94	Db
365	5,33±0,47	Db	9,33±0,94	Da	8,00±1,41	Cab	1,33±0,47	Ec

A,B,C – hodnoty v jednom sloupci označené stejným velkým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

a,b,c - hodnoty v jednom řádku označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

Při hodnocení klíčivosti bezprostředně po formulaci spor do jednotlivých nosičů, nebyly zaznamenány žádné rozdíly. Odlišnosti mezi klíčivostí spor uchovávaných v různých nosičích se začaly výrazněji projevovat po 30 dnech skladování. Ještě po 60 dnech byly vysoké hodnoty klíčivosti zjištěné u spor imobilizovaných v NN (87,33%), v ostatních variantách byla klíčivost již zhruba poloviční. Rozdíly mezi jednotlivými variantami v jednom čase skladování byly prokazatelné na hladině $p < 0,0001$ ($F_{(3, 8)} = 465,15$; $F_{(3, 8)} = 275,79$; $F_{(3, 8)} = 334,87$; $F_{(3, 8)} = 83,432$ a $F_{(3, 8)} = 29,867$, řazeno vzestupně v průběhu skladování). V rámci každého z nosičů, na rozdíl od předchozích skladovacích teplot měly hodnoty ve všech variantách klesající tendenci, k nejrychlejší ztrátě vitality došlo u neformulovaných spor a téměř shodně i u spor finalizovaných v IN2. I v rámci jedné formulace byly prokazatelné rozdíly na hladině $p < 0,0000$ ($F_{(5, 12)} = 578,01$ u NK; $F_{(5, 12)} = 2041,2$ u NN; $F_{(5, 12)} = 971,65$ u IN1 a $F_{(5, 12)} = 1828,1$ u IN2).

Tabulka 24 Vývoj houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v průběhu skladování v práškových formulacích v teplotě 22°C.

Délka skladování (dny)	Index vývoje (GI 24)			
	Neformulované konidie	Nutritivní nosič	Inertní nosič č.1	Inertní nosič č.2
1	1,73±0,58	1,78±0,48	1,74±0,50	1,74±0,52
30	0,65±0,73	1,84±0,45	1,23±0,71	1,11±0,86
60	0,52±0,79	1,55±0,73	0,66±0,81	0,55±0,74
90	0,14±0,44	0,59±0,70	0,57±0,73	0,19±0,42
120	0,10±0,33	0,12±0,36	0,55±0,73	0,22±0,49
365	0,03±0,11	0,09±0,35	0,06±0,21	0,01±0,06

Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

Porovnáme-li data získaná při hodnocení GI 24 v rámci jedné použité formulace, pak nejvyšší hodnoty byly zjištěny na počátku pokusu. Pouze při použití formulace v NN byla nejvyšší rychlost vývoje Bba I101 zjištěna po 30 dnech skladování. Z toho důvodu i statistické odlišnosti jsou prokazatelné mezi časy 1 a 365 dnů v případě formulací v NK, IN1 a IN2 ($H_{(5,N=18)}=16,1746$; $p=0,0064$; $H_{(5,N=18)}=16,2683$; $p=0,0061$; $H_{(5,N=18)}=16,5307$; $p=0,0055$), v případě NN pak mezi časy 30 a 365 ($H_{(5,N=18)}=16,5790$; $p=0,0054$).

Podíváme-li se na hodnoty GI 24 zjištěné v jednom intervalu hodnocení při použití různých formulací, jsou ve většině případů nejvyšší hodnoty dosažené ve variantách používajících NN. V čase 1 nebyl mezi vývojem houby *B. bassiana* kmen Bba I101 uchovávané v jednotlivých formulacích prokazatelný rozdíl, ale po 30, 60 a 90 byly nejvyšší hodnoty dosažené s formulacemi spor Bba I101 v NN ($H_{(3,N=12)}=10,4211$; $p=0,0153$; $H_{(3,N=12)}=9,5848$; $p=0,0224$; $H_{(3,N=12)}=9,9743$; $p=0,018$). Po 120 dnech skladování byla rychlost vývoje houby vyšší při použití IN1, avšak pouze v tomto termínu hodnocení. Nejnižší zjištěná hodnota byla u neformulovaných spor ($H_{(3,N=12)}=9,4947$; $p=0,0234$). Při posledním hodnocení po 365 dnech byla opět nejvyšší hodnota zjištěná při použití NN, nejnižší pak při použití IN2 ($H_{(3,N=12)}=10,4578$. $p=0,0151$). Hodnoty vývoje houby po 365 dnech skladování značily velmi nízkou vitalitu.

Tabulka 25 Vývoj houby *B. bassiana* kmen BbaI101 na larvách *T. molitor* v průběhu skladování v práškových formulacích v teplotě 22°C.

Délka skladování (dny)	Délka biotestu (dny)	FDI na larvách <i>T. molitor</i>			
		Neformulované konidie	Nutritivní nosič	Inertní nosič č.1	Inertní nosič č.2
1	4	2,60±0,55	1,53±0,91	2,68±0,35	1,78±1,08
	6	2,85±0,37	1,90±0,87	2,98±0,05	2,63±0,76
	8	3,00	2,67±0,48	3,00	2,65±0,62
60	4	0,52±0,45	0,80±0,09	0,78±0,47	0,47±0,46
	6	0,58±0,56	0,83±0,16	1,62±0,53	1,37±0,79
	8	0,85±0,76	1,87±0,10	2,52±0,56	1,83±0,96
90	4	0,15±0,31	0,33±0,36	0,12±0,25	0,22±0,33
	6	0,15±0,31	0,42±0,47	0,15±0,23	0,38±0,50
	8	0,53±0,65	0,82±0,99	0,45±0,42	0,80±1,04
120	4	0,10±0,19	0,30±0,44	0,18±0,27	0,22±0,29
	6	0,13±0,24	0,45±0,49	0,25±0,36	0,32±0,34
	8	0,20±0,23	0,80±0,97	0,35±0,45	0,58±0,53
365	4	0,10±0,19	0,22±0,26	0,18±0,29	0,12±0,20
	6	0,17±0,29	0,43±0,46	0,32±0,47	0,35±0,35
	8	0,25±0,36	0,55±0,44	0,45±0,57	0,47±0,47

Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

Tabulka 26 Statistické vyjádření odlišností ve vývoji houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvách *T. molitor* u formulací skladovaných v teplotě 22°C.

Den skladování (dny)	Délka biotestu (dny)		
	4	6	8
1	Konidie/Nutritivní n.; Inertní n.č.2 (p=0,0001; p=0,0146) Inertní n.č.1/Nutritivní n.; Inertní n.č.2 (p=0,0000); (p=0,0084) $H_{(3, N=120)} = 32,93988$; p = 0,0000	Konidie/Nutritivní n.; Inertní n.č.2 (p=0,0002; p=0,0262) Inertní n.č.1/Nutritivní n.; Inertní n.č.2 (p=0,0000); (p=0,0016) $H_{(3, N=120)} = 43,38434$; p = 0,0000	Konidie; Inertní n.č.1/Inertní n.č.2 (p=0,0019) $H_{(3, N=120)} = 34,39099$; p = 0,0000
60	^y	Inertní n.č.1; Inertní n.č.2/Konidie (p=0,0000; p=0,0033) Inertní n.č.1/Nutritivní n. (p=0,0016) $H_{(3, N=120)} = 29,19320$; p = 0,0000	Ostatní /Konidie (p=0,0000-0,0034) Inertní n.č.1/Ostatní (p=0,0000-0,0475) $H_{(3, N=120)} = 39,41975$; p = 0,0000

Formulace uvedené před lomítkem dosáhly v biotestu vyšších hodnot než varianty uvedené za lomítkem. Hodnoty byly posouzeny na základě Kruskal – Wallisova testu.

^y Mezi jednotlivými variantami nebyly nalezeny statisticky průkazné rozdíly

Pozn. V rámci hodnocení v čase 90, 120 a 365 nebyly nalezeny statisticky průkazné rozdíly, z toho důvodu nejsou časy uvedeny v tabulce

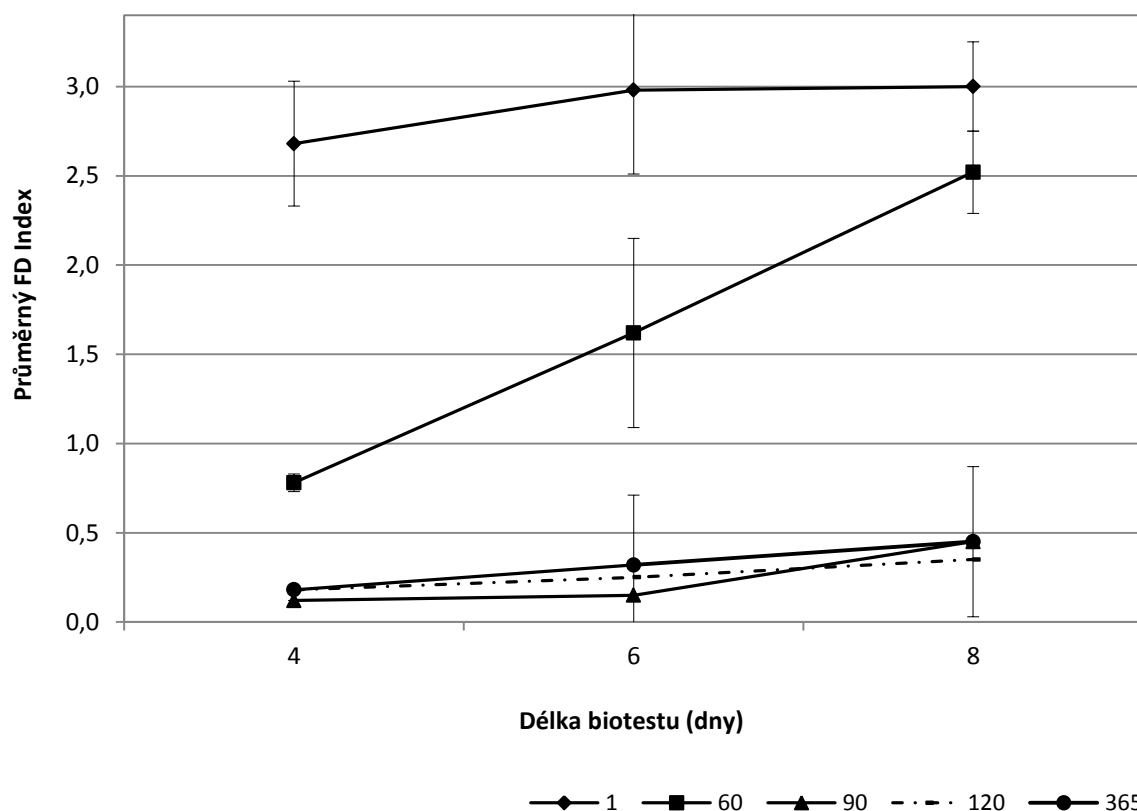
Tabulka 27 Vyjádření statistických odlišností ve vývoji houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvách *T. molitor* v různých časech hodnocení v průběhu skladování ve 22°C.

Den skladování (dny)	Délka biotestu (dny)		
	4	6	8
Neformulované konidie	1/Ostatní (p=0,0000) $H_{(4, N=150)} = 94,16590$; p = 0,0000	1/Ostatní (p=0,0000) $H_{(4, N=150)} = 91,41399$; p = 0,0000	1/Ostatní (p=0,0000) $H_{(4, N=150)} = 87,16000$; p = 0,0000
Nutritivní nosič	1/90; 120; 365 (p=0,0000) 60/90; 120; 365 (p=0,0009-0,0092) $H_{(4, N=150)} = 68,98932$; p = 0,0000	1/Ostatní (p=0,0000-0,0016) $H_{(4, N=150)} = 51,49680$; p = 0,0000	1/90; 120; 365 (p=0,0000) 60/90; 120; 365 (p=0,0008-0,0083) $H_{(4, N=150)} = 65,25759$; p = 0,0000
Inertní nosič č.1	1/Ostatní (p=0,0000-0,0008) 60/Ostatní (p=0,0005-0,0080) $H_{(4, N=150)} = 103,2809$; p = 0,0000	1/Ostatní (p=0,0000-0,0198) 60/Ostatní (p=0,0001-0,0198) $H_{(4, N=150)} = 110,4463$; p = 0,0000	1/90; 120; 365 (p=0,0000) 60/90; 120; 365 (p=0,0000) $H_{(4, N=150)} = 105,4530$; p = 0,0000
Inertní nosič č.2	1/Ostatní (p=0,0000-0,0017) $H_{(4, N=150)} = 61,28998$; p = 0,0000	1/90; 120; 365 (p=0,0000) 60/90; 120; 365 (p=0,0004-0,0011) $H_{(4, N=150)} = 79,20863$; p = 0,0000	1/90; 120; 365 (p=0,0000) 60/90; 120; 365 (p=0,0004-0,0042) $H_{(4, N=150)} = 63,52554$; p = 0,0000

Časy uvedené před lomítkem dosáhly v biotestu vyšších hodnot než varianty uvedené za lomítkem. Hodnoty byly posouzeny na základě Kruskal – Wallisova testu.

Při hodnocení vývoje Bba I101 na larvách *T. molitor* došlo ke snížení dosaženého FDI pod hodnotu 1,0 u všech variant již po 90 dnech skladování v laboratorní teplotě. V rámci hodnocených formulací byla nejvyšší virulence spor Bba I101 zachována při použití NN. Rychlost vývoje houby na hostiteli byla v této variantě nejrychlejší, ovšem po 365 dnech skladování byla nejvyšší zjištěná hodnota v této variantě po 8 dnech biotestu pouze 0,55. U neformulovaných konidií byla zjištěná nejnižší hodnota FDI po 365 dnech, a to pouhých 0,25. Mezi hodnotami zjištěnými v průběhu skladování v rámci jedné hodnocené etapy, nebyl v časech 90-365 nalezen statisticky prokazatelný rozdíl. V rámci jedné formulace byly odlišné hodnoty zjištěné v čase 1 a 60. Při skladování v teplotě 22°C tedy došlo k výraznému poklesu vitality spor a s tím spojené virulence a schopnosti vyvolat mortalitu na larvách *T. molitor*.

Graf 12 Vliv doby skladování neformulovaných konidií *B. bassiana* kmen Bba I101 na jejich virulenci (22°C, FDI biotest).



Mortalita vyvolaná houbou *B. bassiana* Bba I101, jejíž spory byly skladovány v různých teplotách měla stejný vývoj jako všechny předchozí ukazatele. Na počátku hodnocení byla na úrovni 100% u všech hodnocených variant a postupně se snižovala. Ještě po 60 dnech byla mortality poměrně vysoká, po 8 dnech biotestu se u formulovaných spor pohybovala v rozmezí 79,93-86,60%. Po uplynutí 90 dnů však došlo k výraznému poklesu minimálně o polovinu. Poslední zjištěné hodnoty po 365 dnech skladování se pohybovaly na úrovni 13,32% u neformulovaných konidií a 19,98% u spor imobilizovaných v NN a IN1 a mezi jednotlivými variantami již nebyly nalezeny statisticky prokazatelné odlišnosti.

Tabulka 28 Kumulovaná mortalita larev *T. molitor* vyvolaná houbou *B. bassiana* kmen Bba I101 (spory skladované v teplotě 22°C).

Délka skladování (dny)	Kumulovaná mortalita ^z									
	Kontrola		Neformulované konidie		Nutritivní nosič		Inertní nosič č.1		Inertní nosič č.2	
4. den biotestu										
1	10,52±8,69 (3,33)	Ab	79,48±8,69 (96,63)	Aa	65,91±16,03 (83,27)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa	58,91±11,11 (73,27)	Aa
60	0,00 (0,00)	Ac	35,26±7,62 (33,28)	B ab	45,00±4,71 (49,94)	AB a	48,83±11,11 (56,60)	Ba	21,42±3,83 (13,32)	B bc
90	0,00 (0,00)	Aa	10,52±8,69 (3,33)	Ca	18,43±11,11 (9,98)	Ba	10,52±8,69 (3,33)	Ca	21,42±12,52 (13,32)	Ba
120	0,00 (0,00)	Aa	0,00 (0,00)	Ca	14,96±8,69 (6,65)	Ba	10,52±8,69 (3,33)	Ca	14,96±8,69 (6,65)	Ba
365	0,00 (0,00)	Aa	0,00 (0,00)	Ca	21,42±13,59 (13,32)	Ba	14,96±8,69 (6,64)	Ca	0,00 (0,00)	Ba
6. den biotestu										
1	21,42±3,83 (13,32)	Ab	79,48±8,69 (96,63)	Aa	75,04±12,52 (93,29)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa
60	14,96±8,69 (6,65)	Ac	45,00±13,06 (49,94)	Bb	45,00±4,71 (49,94)	Bb	79,48±8,69 (96,63)	Aa	61,12±6,97 (76,60)	B ab
90	10,52±8,69 (3,33)	Ab	10,52±8,69 (3,33)	Cb	28,88±3,13 (23,29)	B ab	14,96±8,69 (6,65)	Bab	31,09±3,13 (26,63)	Ca
120	0,00 (0,00)	Aa	10,52±8,69 (3,33)	Ca	26,57±6,04 (19,98)	Ba	21,42±13,59 (13,32)	Ba	18,43±11,11 (9,98)	Ca
365	10,52±8,69 (3,33)	Aa	14,96±8,69 (6,65)	Ca	26,57±6,04 (19,98)	Ba	21,42±3,83 (13,32)	Ba	18,43±11,11 (9,98)	Ca
8. den biotestu										
1	21,42±3,83 (13,32)	Ab	90,00±0,00 (100)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa	90,00±0,00 (100)	Aa
60	14,96±8,69 (6,65)	Ac	46,91±12,44 (53,27)	Bb	68,58±3,83 (86,60)	B ab	79,48±8,69 (96,63)	Aa	63,43±6,04 (79,93)	B ab
90	10,52±8,69 (3,33)	Ab	24,09±3,83 (16,64)	BC ab	39,23±4,81 (39,95)	Ca	37,27±10,21 (36,62)	Ba	35,26±7,62 (33,28)	Ca
120	10,52±8,69 (3,33)	Ab	10,52±8,69 (3,33)	BC b	39,23±4,81 (39,95)	Ca	35,26±11,41 (33,28)	Ba	35,26±2,84 (33,28)	Ca
365	10,52±8,69 (3,33)	Aa	21,42±13,59 (13,32)	Ca	26,57±6,04 (19,98)	Ca	26,57±9,80 (19,98)	Ba	24,09±3,83 (16,64)	Ca

A,B,C – hodnoty v jednom sloupci označené stejným velkým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

a,b,c - hodnoty v jednom řádku označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

^z Průměr dat ($x \pm SE$) vyjádřených jako úhlové hodnoty [$\arcsin \sqrt{(\text{počet všech mrtvých a infikovaných larev} / \text{celkový počet všech larev})}$]. Mortalita (%) je uvedena v závorkách

Tabulka 29 Statistické vyhodnocení mortality larev *T. molitor* vyvolané houbou *B. bassiana* kmen Bba I101 (práškové nosiče, skladování ve 22°C).

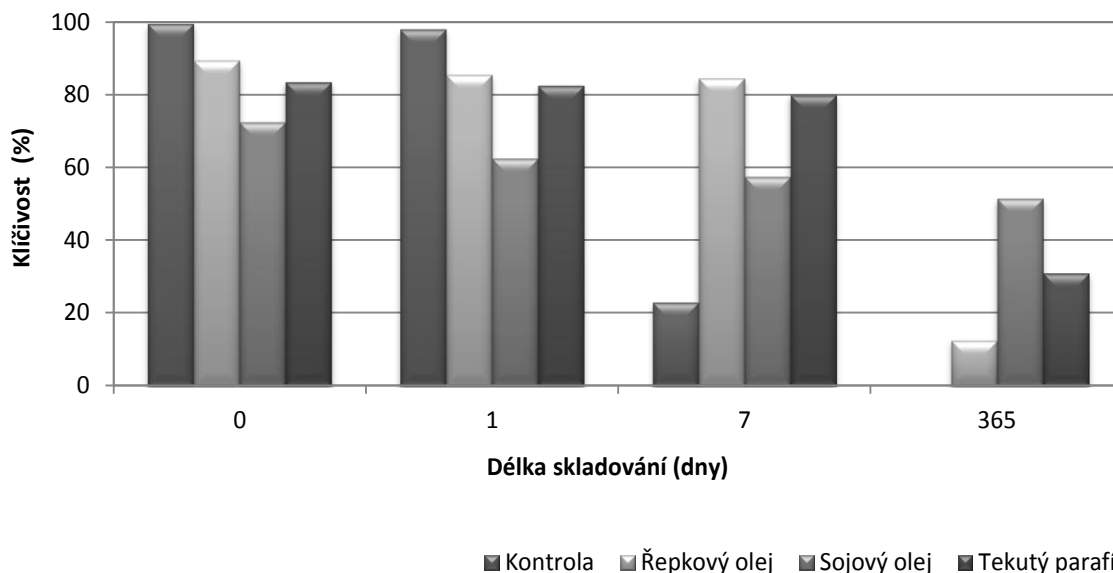
De l	Délka skladování				Formulace					
	60	90	120	365	rola	NK	NN	IN1	IN2	
n	df = 4, 10				df = 5, 12					
4	F=20,994 p=0,0001	F=18,145 p=0,0001	F=1,2122 p=0,3647	F=1,6667 p=0,2333	F=2,6269 p=0,0982	F=1,0000 p=0,4516	F=61,772 p=0,0000	F=9,6917 p=0,0018	F=38,371 p=0,0000	F=13,771 p=0,0005
6	F=34,923 p=0,0000	F=17,534 p=0,0002	F=6,0157 p=0,0099	F=2,4310 p=0,1161	F=1,8394 p=0,1980	F=2,6479 p=0,0965	F=24,239 p=0,0000	F=21,214 p=0,0001	F=42,432 p=0,0000	F=34,960 p=0,0001
8	F=645,54 p=0,0000	F=20,933 p=0,0001	F=6,7561 p=0,0067	F=8,7798 p=0,0026	F=1,7174 p=0,2222	F=1,3680 p=0,3122	F=25,784 p=0,0000	F=69,944 p=0,0000	F=22,735 p=0,0001	F=62,252 p=0,0000

Vyhodnocení provedeno na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

5.2.3.2. Hodnocení tekutých formulací spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101

Stejným způsobem jako byly hodnoceny práškové formulace proběhlo i hodnocení olejových formulací. Konidie Bba I101 byly uloženy v olejovém koncentrátu (tekutý parafín, řepkový a sójový olej), jako kontrola sloužily konidie suspendované v 0,05% TW 80.

Graf 13 Klíčivost spor *B. bassiana* kmen Bba I101 skladovaných v teplotě 22°C v olejových formulacích.



Statistické vyhodnocení klíčivosti ukazuje prokazatelné rozdíly mezi jednotlivými variantami v čase 0 $F_{(3, 4)}=170,11$; $p=0,0001$ a v čase 1 $F_{(3, 4)}=98,848$; $p=0,0003$, kde nejvyšších hodnot dosahovaly spory v kontrole a spory imobilizované v ŘO. V čase 7 bylo nejvyšší procento klíčivých spor zaznamenáno v rámci formulace v ŘO a TP ($F_{(3, 4)}=61,120$; $p=0,0009$). Po ukončení pokusu po uplynutí 365 dnů došlo k poklesu obou zmiňovaných variant a nejvyšší hodnoty klíčivosti spor Bba I101 byly zjištěny u formulace v SO ($F_{(2, 3)}=763,17$; $p=0,0001$). Ačkoli na počátku pokusu se zdálo, že formulace v sójovém oleji nebude vhodná pro dlouhodobé uložení spor, po ukončení hodnocení byly zjištěné hodnoty klíčivosti v této variantě nejvyšší. Při hodnocení klíčivosti spor v rámci jednotlivých formulací byla v případě TP statistická odlišnost $F_{(3, 4)}=602,81$; $p=0,0000$; u ŘO $F_{(3, 4)}=784,95$; $p=0,0000$ a u SO $F_{(3, 4)}=105,33$; $p=0,0003$. U TP a ŘO byl statisticky prokazatelně odlišný průběh klíčivosti spor Bba I101 po 365 od ostatních hodnocených intervalů, v případě SO byly odlišnosti mezi všemi hodnocenými časy.

Tabulka 30 Vývoj houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v průběhu skladování v olejových formulacích v teplotě 22°C.

Délka skladování (dny)	Vývoj spor (GI 24)			
	Kontrola	Tekutý parafín	Řepkový olej	Sójový olej
0	2,00±0,00	1,30±0,77	1,57±0,69	1,30±0,88
1	1,90±0,35	1,61±0,76	1,60±0,72	0,98±0,92
7	0,46±0,84	1,43±0,81	1,51±0,75	0,93±0,89
365	-	0,38±0,66	0,07±0,19	0,95±0,97

Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

Při hodnocení GI v čase 0 byly patrné odlišnosti mezi jednotlivými variantami, kromě formulací používajících TP a SO, u kterých byla dosažena stejná hodnota GI 1,3 ($H_{(3, N=800)}=144,2977$; $p=0,000$). Po 24 hodinách skladování došlo u SO k poklesu vitality, TP se naopak

dostal na úroveň ŘO ($H_{(3, N=800)}=130,9439$; $p=0,000$). Po uplynutí 7 dnů, po které byly spory uložené v jednotlivých olejích byla situace téměř stejná jako po 1. dnu ($H_{(3, N=800)}=157,3490$; $p=0,000$). Po 365 dnech došlo k výraznému poklesu vitality. Největší snížení bylo zaznamenáno u konidií Bba I101 formulovaných v ŘO, rozdíl byl prokazatelný mezi všemi hodnoceními ($H_{(2, N=600)}=98,33577$; $p=0,000$). Při hodnocení ŘO a TP se odlišovaly výrazně hodnoty zjištěné v čase 365 od všech předchozích ($H_{(3, N=800)}=378,0823$; $p=0,000$; $H_{(3, N=800)}=229,4993$; $p=0,000$). U SO byl průběh nejvyrovnanější, prokazatelně odlišné byly pouze hodnoty zjištěné na počátku pokusu ($H_{(3, N=800)}=19,31132$; $p=0,0002$).

Tabulka 31 Kumulovaná mortalita larev *T. molitor* vyvolaná houbou *B. bassiana* kmen Bba I101 a samotnými oleji (olejové formulace, skladování v teplotě 22°C).

Formulace	Kumulovaná mortalita ^z											
	Skladování 1 den						Skladování 365 dnů					
	4. den		6. den		8. den		4. den		6. den	8. den		
Kontrola	10,52±8,69 (3,33)	C	14,96±8,69 (6,65)	C	14,96±8,69 (6,65)	D	10,52±8,69 (3,33)	B	10,52±8,69 (3,33)	D	14,96±8,69 (6,65)	D
Tekutý parafin	50,77±4,81 (59,94)	B	54,74±2,84 (66,61)	B	54,74±2,84 (66,61)	C	50,77±4,81 (59,94)	A	54,74±2,84 (66,61)	C	54,74±2,84 (66,61)	C
Tekutý par.+spory	90,00 (100)	Aa	90,00 (100)	Aa	90,00 (100)	A	52,73±2,84 (63,26)	Ab	79,48±8,69 (96,63)	AB a	90,00 (100)	A
Řepkový olej	54,74±7,62 (66,61)	B	56,79±5,17 (69,93)	B	58,91±3,13 (73,27)	BC	54,74±7,62 (66,61)	A	56,79±5,17 (69,93)	C	58,91±3,13 (73,27)	C
Řepkový olej+spory	90,00 (100)	Aa	90,00 (100)	A	90,00 (100)	A	50,77±8,69 (59,94)	Ab	90,00 (100)	Ä	90,00 (100)	A
Sójový olej	65,91±6,97 (83,27)	B	68,58±3,83 (86,60)	B	68,58±3,83 (86,60)	B	65,91±6,97 (83,27)	A	68,58±3,83 (86,60)	BC	68,58±3,83 (86,60)	BC
Sójový olej+spory	90,00 (100)	Aa	90,00 (100)	A	90,00 (100)	Aa	52,73±7,70 (63,26)	Ab	71,57±0,00 (89,95)	BC	75,04±8,69 (93,29)	AB a

A,B,C – hodnoty v jednom sloupci označené stejným velkým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha<0,05$

a,b,c - hodnoty v jednom řádku označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha<0,05$

^z Průměr dat ($x \pm SE$) vyjádřených jako úhlové hodnoty [$\arcsin \sqrt{(\text{počet všech mrtvých a infikovaných larev} / \text{celkový počet všech larev})}$]. Mortalita (%) je uvedena v závorkách

Statisticky průkazné rozdíly v mortalitě larev *T. molitor* iniciované spory Bba I101 formulovanými v olejích po 1 a 365 dnech skladování byly pouze po 4 dnech biotestu. Nejvyšší rozdíl byl u ŘO obsahujícího spory Bba I101 ($F_{(1, 4)}=39,981$; $p=0,00320$), mezi zbylými dvěma olejovými formulacemi byly rozdíly v průměru stejné, lišily se pouze směrodatnou odchylkou ($F_{(1, 4)}=344,05$; $p=0,0000$ u formulace spor v TP a $F_{(1, 4)}=46,015$; $p=0,00247$ u formulace spor v SO). V čase 1 nebyly mezi jednotlivými oleji obsahujícími spory shledány průkazné odlišnosti, rozdíly byly zaznamenány mezi mortalitou způsobenou samotnými oleji a olejovými formulacemi spor Bba I101. V průběhu skladování byly odlišnosti v mortalitě vyvolané spory imobilizovanými v olejích na úrovni $p=0,0000$ ($F_{(6, 14)}=64,035$; $F_{(6, 14)}=90,097$; $F_{(6, 14)}=103,51$ ve vzestupném pořadí). Po 365 dnech skladování byly hodnoty mortality zjištěné po 4 dnech biotestu nejnižší u ŘO obsahujícího spory ($F_{(6, 14)}=14,850$; $p=0,00002$), po 6 dnech byla mortalita nejnižší u SO obsahujícího spory ($F_{(6, 14)}=53,480$, $p=0,00000$), při ukončení biotestu byla mortalita ve variantách

ošetřených TP a ŘO obsahujícími spory 100%, u SO se sporami 93,29% ($F_{(6, 14)}=55,210$; $p=0,00000$). Samotné oleje vyvolaly u larev *T. molitor* mortalitu v rozmezí 66,61-86,60%.

Tabulka 32 Vliv skladovacích podmínek na vývoj houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvách *T. molitor*.

Délka skladování (dny)	Délka biotestu (dny)	FDI na larvách <i>T. molitor</i>		
		Tekutý parafín + spory	Řepkový olej + spory	Sójový olej + spory
1	4	2,65±0,42	2,65±0,46	2,20±0,55
	6	2,85±0,30	2,87±0,26	2,40±0,55
	8	3,00	2,92±0,23	2,50±0,51
365	4	1,25±0,73	1,20±0,65	1,10±0,78
	6	2,25±0,61	2,37±0,52	2,05±0,69
	8	2,58±0,53	2,77±0,31	2,42±0,80

Statistické vyhodnocení provedeno na základě neparametrického Mann-Whitneyho U testu a Kruskal-Wallisova testu

Tabulka 33 Statistické vyhodnocení vývoje spor *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvách *T. molitor* v průběhu skladování v olejových formulacích v teplotě 22°C.

Délka skladování (dny)	Kruskal-Wallisův test		
	4. den	6. den	8. den
1	Tekutý parafín/Sójový olej ($p=0,0085$) Řepkový olej/Sójový olej ($p=0,0069$) $H_{(2, N=90)}=13,72243$; $p=0,0010$	Tekutý parafín/Sójový olej ($p=0,0051$) Řepkový olej/Sójový olej ($p=0,0040$) $H_{(2, N=90)}=18,26215$; $p=0,0001$	Tekutý parafín/Sójový olej ($p=0,0015$) Řepkový olej/Sójový olej ($p=0,0039$) $H_{(2, N=90)}=32,38761$; $p=0,0000$
365	^y	^y	^y

Formulace uvedené před lomítkem dosáhly v biotestu vyšších hodnot než varianty uvedené za lomítkem. Hodnoty byly posouzeny na základě Kruskal – Wallisova testu.

^y Mezi jednotlivými variantami nebyly nalezeny statisticky prokazatelné rozdíly

Rozdíly ve vývoji Bba I101 na larvách *T. molitor* v rámci jedné formulace byly u SO po 4 dnech biotestu detekovatelné na úrovni $p<0,0000$, u ŘO po 4 a 6 dnech na téže úrovni. U TP byly rozdíly mezi každým hodnocením, po 4 dnech na úrovni $p=0,0000$, po 6 dnech na $p=0,0001$ a po 8 dnech $p=0,0009$.

Spory Bba I101 formulované v koncentrovaných olejích byly schopné zachovat si určitou úroveň vitality i po 365 dnech skladování bez nutnosti snižování teploty. Při uchovávání těchto formulací v teplotě 22°C došlo sice ke snížení vitality, ale spory i přesto byly schopné klíčit a vyvolávat infekci hostitele.

5.2.3.3. Porovnání vitality a virulence spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 uložených v práškových a olejových formulacích skladovaných ve 22°CTabulka 34 Vliv formulace na vývoj houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v průběhu skladování v teplotě 22°C.

Formulace spor	Délka skladování (dny)	
	1	365
Kontrola	2,00±0,00	---
Tekutý parafin	1,30±0,77	0,38±0,66
Řepkový olej	1,57±0,69	0,07±0,19
Sójový olej	1,30±0,88	0,95±0,97
Neformulované konidie	1,73±0,58	0,03±0,11
Nutritivní nosič	1,78±0,48	0,09±0,35
Inertní nosič č.1	1,74±0,50	0,06±0,21
Inertní nosič č.2	1,74±0,52	0,01±0,06

Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

Pozn. Jako kontrola sloužila suspenze spor v roztoku 0,05% TW 80, kterou nelze uchovat po celý rok.

Tabulka 35 Klíčivost spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v průběhu skladování v tekutých a práškových formulacích ve 22°C.

Formulace spor	Délka skladování (dny)	
	1	365
Kontrola	99,50±0,50	---
Tekutý parafin	83,50±0,50	31,00±0,00
Řepkový olej	89,50±0,50	12,50±0,50
Sójový olej	72,50±1,50	51,50±0,50
Neformulované konidie	96,67±0,47	5,33±0,47
Nutritivní nosič	97,33±0,47	9,33±0,94
Inertní nosič č.1	97,33±0,47	8,00±1,41
Inertní nosič č.2	96,33±0,47	1,33±0,47

Statistické vyhodnocení na základě parametrického hodnocení ANOVA, Tukey HSD test, $\alpha < 0,05$

Pozn. Jako kontrola sloužila suspenze spor v roztoku 0,05% TW 80, kterou nelze uchovat po celý rok.

Při statistickém vyhodnocení GI 24 na počátku skladování vykazala statistickou odlišnost především kontrola a spory formulované v TP a SO, které dosáhly nižších hodnot ($H_{(7, N=2000)}=206,7250$; $p=0,000$). Po uplynutí 365 dnů skladování se prokazatelně odlišovaly olejové formulace spor Bba I101 na bázi SO a TP, ve kterých si spory uchovaly nejvyšší vitalitu ($H_{(6, N=1800)}=383,5355$; $p=0,000$).

Statistické hodnocení klíčivosti svými výsledky prakticky rozdělilo nosiče na skupinu práškových nosičů a olejových plnidel ($F_{(7, 12)}=259,89$; $p=0,0000$). Po 365 dnech skladování byly odlišnosti mezi všemi variantami ($F_{(6, 11)}=593,08$; $p=0,0000$). Zatímco v rámci spor imobilizovaných v olejích zůstala až polovina spor Bba I101 vitálních v průběhu 1 roku, při použití práškových nosičů došlo k velmi výraznému poklesu jak ve vitalitě, tak ve virulenci., vitalita na konci testování nedosahovala ani 10%, v případě IN2 dokonce ani 2%.

Co se týká mortality vyvolané formulovanými spory Bba I101 na larvách *T. molitor*, byly zjištěny prokazatelné rozdíly mezi jednotlivými variantami. V hodnocení na počátku skladování byl zjištěn prokazatelný rozdíl po 4 dnech biotestu ($F_{(6, 14)}=4,4496$; $p=0,0101$), kdy spory v některých práškových nosičích bylo vyvolaly nižší kumulovanou mortalitu. Po 365 dnech skladování byla situace velmi výrazně ve prospěch spor Bba I101 uložených v olejích ve všech dnech hodnocení biotestu ($F_{(6, 14)}=21,403$; $p=0,0000$; $F_{(6, 14)}=51,101$; $p=0,0000$; $F_{(6, 14)}=39,551$; $p=0,0000$).

Tabulka 36 Dosažená kumulovaná mortalita při použití samotných olejů a olejových formulací spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v průběhu skladování ve 22°C.

Délka skladování (dny)	Kumulovaná mortalita ^z													
	Tekutý par +spory		Řepkový olej +spory		Sójový olej +spory		Neformulované konidie		Nutritivní nosič		Inertní nosič č.1		Inertní nosič č.2	
4. den														
1	90 (100)	Aa	90 (100)	Aa	90 (100)	Aa	79,48±8,69 (96,63)	Aab	65,91±16,03 (83,27)	Aab	90 (100)	Aa	58,91±11,11 (73,27)	Ab
365	52,73±2,84 (63,26)	Ba	50,77±8,69 (59,94)	Ba	52,73±7,70 (63,26)	Ba	0 (0)	Cb	21,42±13,59 (13,32)	Bb	14,96±8,69 (6,64)	Cb	0 (0)	Bb
6. den														
1	90 (100)	Aa	90 (100)	a	90 (100)	a	79,48±8,69 (96,63)	Aa	75,04±12,52 (93,29)	Aa	90 (100)	Aa	90 (100)	Aa
365	79,48±8,69 (96,63)	Aa	90 (100)	a	71,57±0,00 (89,95)	a	14,96±8,69 (6,65)	Cb	26,57±6,04 (19,98)	Bb	21,42±3,83 (13,32)	Bb	18,43±11,11 (9,98)	Cb
8. den														
1	90 (100)		90 (100)		90 (100)	A	90 (100)	A	90 (100)	A	90 (100)	A	90 (100)	A
365	90 (100)	a	90 (100)	a	75,04±8,69 (93,29)	Aa	21,42±13,59 (13,32)	Cb	26,57±6,04 (19,98)	Cb	26,57±9,80 (19,98)	Bb	24,09±3,83 (16,64)	Cb

A,B,C – hodnoty v jednom sloupci označené stejným velkým písmenem nejsou statisticky rozdílné, což bylo zjištěno na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

a,b,c - hodnoty v jednom řádku označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné, což bylo zjištěno na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

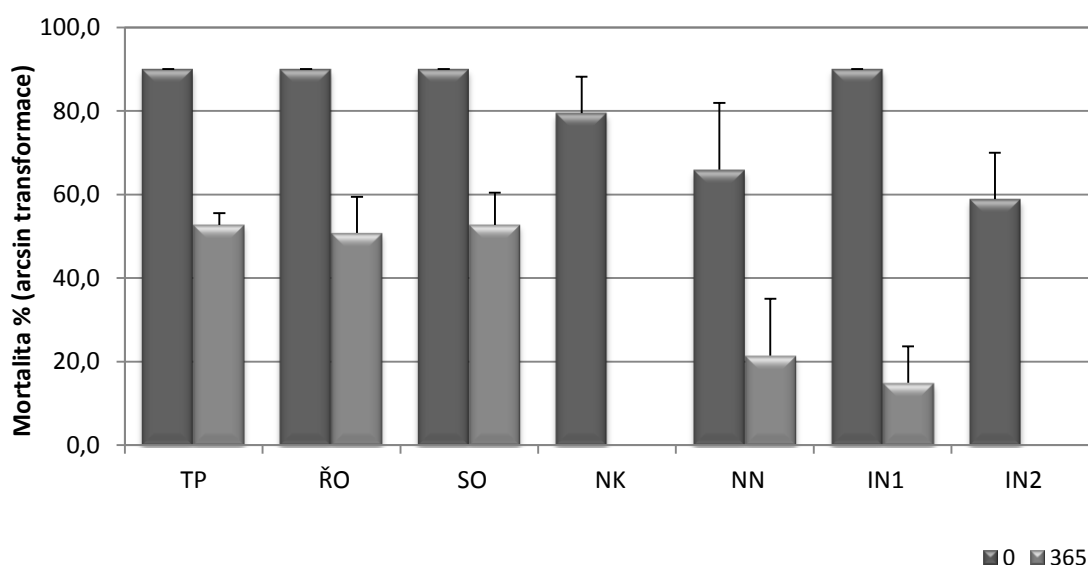
^z Průměr dat ($x \pm SE$) vyjádřených jako úhlové hodnoty [$\arcsin \sqrt{(\text{počet všech mrtvých a infikovaných larev} / \text{celkový počet všech larev})}$]. Mortalita (%) je uvedena v závorkách

Pozn. U variant, které nejsou označeny žádným písmenem nebyl dostatečný rozptyl dat umožňující statistickou analýzu

Tabulka 37 Vývoj houby *B. bassiana* Bba I101 na larvách *T. molitor*, spory uložené v tekutých a práškových formulacích ve 22°C (biotest hodnocený 8 dnů).

Formulace	FDI na larvách <i>T. molitor</i>					
	Skladování 1 den			Skladování 365 dnů		
	4. den	6.den	8. den	4. den	6. den	8. den
Tekutý parafin + spory	2,65±0,42	2,85±0,30	3,00±0,00	1,25±0,73	2,25±0,61	2,58±0,53
Řepkový olej + spory	2,65±0,46	2,87±0,26	2,92±0,23	1,20±0,65	2,37±0,52	2,77±0,31
Sójový olej + spory	2,20±0,55	2,40±0,55	2,50±0,51	1,10±0,78	2,05±0,69	2,42±0,80
Neformulované konidie	2,60±0,55	2,85±0,37	3,00±0,00	0,10±0,19	0,17±0,29	0,25±0,36
Nutritivní nosič	1,53±0,91	1,90±0,87	2,67±0,48	0,22±0,26	0,43±0,46	0,55±0,44
Inertní nosič č.1	2,68±0,35	2,98±0,05	3,00±0,00	0,18±0,29	0,32±0,47	0,45±0,57
Inertní nosič č.2	1,78±1,08	2,63±0,76	2,65±0,62	0,12±0,20	0,35±0,35	0,47±0,47

Statistické vyhodnocení provedeno na základě Kruskal-Wallisova testu

Graf 14 Srovnání účinnosti houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvy *T. molitor*, formulace skladované ve 22°C (hodnoty po 4 dnech biotestu).

Při porovnání vývoje houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v rámci hodnocení virulence, byly nalezeny prokazatelné rozdíly mezi jednotlivými použitými formulacemi. Zatímco na počátku skladování byly rozdíly prakticky mezi všemi formulacemi, po 365 dnech skladování se jednoznačně oddělily varianty používající olejové formulace od variant používajících práškové formulace. Na počátku skladování byly po 4 dnech biotestu prokazatelně nejvyšší hodnoty zjištěny u spor uložených v TP a ŘO, neformulovaných spor a spor v IN2 a mezi těmito variantami nebyly rozdíly. Stejný stav byl i po 6 dnech biotestu ($H_{(6, N=210)}=51,19974$; $p=0,0000$; $H_{(6, N=210)}=65,78160$; $p=0,0000$). Na konci biotestu byly prokazatelně nejnižší hodnoty zjištěny v případě použití imobilizace spor Bba I101 v SO a IN2 ($H_{(6, N=210)}=66,94554$; $p=0,0000$). Po 1 roce skladování došlo k výraznému poklesu virulence spor finalizovaných v práškových nosičích, nejvyšší hodnota FDI zjištěná s variantou uloženou v NN byla 0,55 oproti nejvyšší hodnotě zjištěné u spor uložených v ŘO a to 2,77 ($H_{(6, N=210)}=111,8928$; $p=0,0000$; $H_{(6, N=210)}=152,5433$; $p=0,0000$; $H_{(6, N=210)}=147,5567$; $p=0,0000$).

5.2.4. Porovnání vitality a virulence neformulovaných konidií v průběhu skladování v různých teplotách

V následující části je uvedeno pouze krátké shrnutí vlivu skladovací teploty v rámci jedné formulace, aby bylo možné udělat si komplexní představu o tom, jak se vitalita a virulence skladovaných spor měnila v závislosti na formulaci.

Tabulka 38 Klíčivosti spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v průběhu skladování (neformulované konidie, 24 hodin).

Délka skladování (dny)	Skladovací teplota (°C)					
	-20		4		22	
1	96,67±0,47	Aa	96,67±0,47	Aa	96,67±0,47	Aa
30	91,33±0,47	Ba	88,33±0,47	BCa	58,67±1,70	Bb
60	91,67±0,47	Ba	85,67±1,25	CDb	36,33±2,05	Cc
90	90,67±1,70	Ba	89,67±0,47	Ba	12,33±0,47	Db
120	81,33±0,94	Ca	87,67±1,25	BCa	10,00±4,32	Db
365	81,67±0,47	Cb	83,33±0,47	Da	5,33±0,47	Dc

A,B,C – hodnoty v jednom sloupci označené stejným velkým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

a,b,c - hodnoty v jednom řádku označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

Mezi klíčivostmi NK nebyl na počátku skladování statisticky prokazatelný rozdíl. Nejvýraznější odlišnost byla zjištěna u NK Bba I101 uložených v teplotě 22°C, které dosáhly nejnižších hodnot klíčivosti po 30, 90 a 120 dnech skladování ($F_{(2, 6)}=586,87$; $p=0,0000$; $F_{(2, 6)}=3635,3$; $p=0,0000$; $F_{(2, 6)}=528,66$; $p=0,00000$). Po 60 a 365 dnech skladování se od sebe lišily všechny zjištěné hodnoty, nejvyšší množství klíčivých konidií bylo ve většině hodnocení zjištěno ve variantách skladovaných v teplotě -20°C ($F_{(2, 6)}=921,93$; $p=0,00000$; $F_{(2, 6)}=17870$; $p=0,0000$).

Tabulka 39 Vliv teploty skladování na vývoj houby *B. bassiana* kmen Bba I101 (neformulované konidie, GI 24±SE).

Délka skladování (dny)	Teplota skladování (°C)		
	-20	4	22
1	1,73±0,58	1,73±0,58	1,73±0,58
30	1,45±0,70	1,60±0,72	0,65±0,73
60	1,77±0,78	1,44±0,77	0,52±0,79
90	1,80±0,65	1,74±0,65	0,14±0,44
120	1,52±0,80	1,52±0,77	0,10±0,33
365	1,68±0,72	1,65±0,75	0,03±0,11

Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

Na počátku skladování nebyly prokazatelné rozdíly mezi GI u konidií vstupujících do testu. Po 30, 90, 120 a 365 dnech se výrazně odlišovala rychlost vývoje houby u varianty skladované v teplotě 22°C ($H_{(2, N=900)}=224,5941$, $p=0,000$; $H_{(2, N=900)}=521,4367$; $p=0,000$; $H_{(2, N=900)}=454,3057$; $p=0,000$; $H_{(2, N=900)}=517,2788$; $p=0,000$). Jedinou výjimkou byl čas 60, kde se vzájemně lišily všechny varianty, nejvyšší hodnoty GI byly zjištěny po aktivaci spor uložených v teplotě 4°C a nejnižší opět ve variantě uložené v teplotě 22°C ($H_{(2, N=900)}=302,1936$, $p=0,000$).

Tabulka 40 Vliv teploty skladování na virulenci houby *B. bassiana* kmen Bba I101 proti larvám *T. molitor* (neformulované spory, FDI±SE).

Délka skladování (dny)	Délka biotestu (dny)	Teplota skladování (°C)		
		-20	4	22
1	4	2,60±0,55	2,60±0,55	2,60±0,55
	6	2,85±0,37	2,85±0,37	2,85±0,37
	8	3,00	3,00	3,00
60	4	1,63±0,71	2,22±0,68	0,52±0,45
	6	1,55±0,78	2,55±0,70	0,58±0,56
	8	2,38±0,49	2,65±0,58	0,85±0,76
90	4	0,58±0,45	0,70±0,60	0,15±0,31
	6	0,98±0,71	1,87±0,69	0,15±0,31
	8	2,27±0,93	2,78±0,40	0,53±0,65
120	4	1,57±0,44	1,30±0,70	0,10±0,19
	6	1,83±0,47	1,88±0,61	0,13±0,24
	8	2,85±0,45	2,63±0,47	0,20±0,23
365	4	2,08±0,36	1,63±0,62	0,10±0,19
	6	2,20±0,29	2,03±0,33	0,17±0,29
	8	3,00	2,38±0,42	0,25±0,36

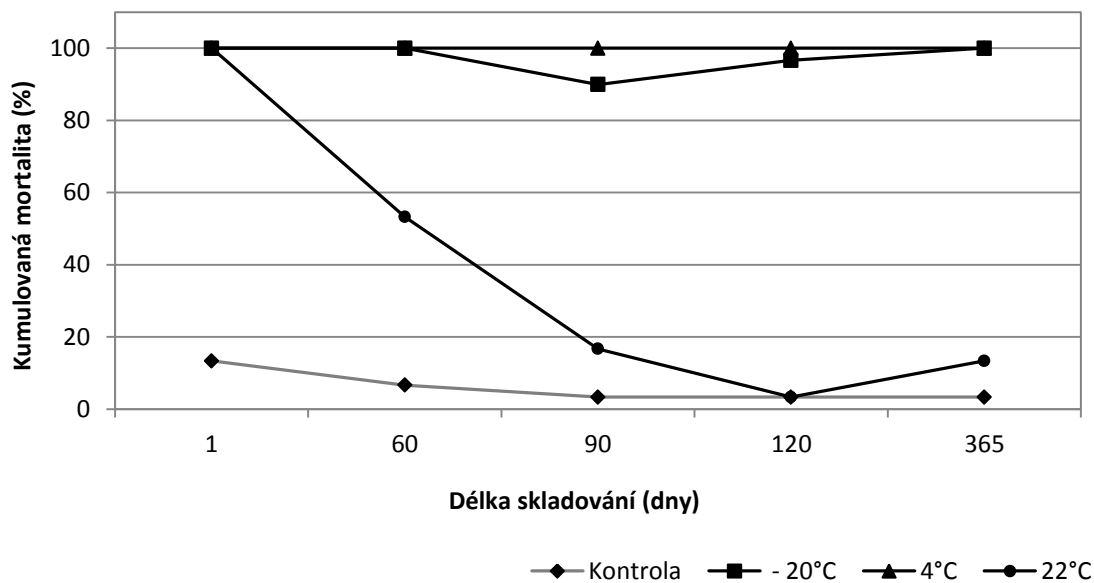
Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

Tabulka 41 Statistické vyhodnocení virulence houby *B. bassiana* kmen Bba I101 proti larvám *T. molitor* (neformulované spory, FDI biotest).

Den skladování (dny)	Délka biotestu (dny)		
	4	6	8
1	y	y	y
60	Ostatní /22 (p=0,0001) H _(2, N=90) =41,40350 p =0,0000	4/-20; 22 (p=0,0028); (p=0,002) -20/22 (p=0,0000) H _(2, N=90) =46,78183 p =0,0000	Ostatní/22 (p=0,0000) H _(2, N=90) =49,61150 p =0,0000
90	4; -20 /22 (p=0,0011); (p=0,0008) H _(2, N=90) =19,56216 p =0,0001	4/-20; 22 (p=0,0464); (p=0,0000) -20/22 (p=0,0000) H _(2, N=90) =50,50045 p =0,0000	Ostatní/22 (p=0,0000) H _(2, N=90) =55,77619 p =0,0000
120	Ostatní/22 (p=0,0000) H _(2, N=90) =58,65063 p =0,0000	Ostatní/22 (p=0,0000) H _(2, N=90) =60,79287 p =0,0000	Ostatní/22 (p=0,0000) H _(2, N=90) =70,33702 p =0,0000
365	Ostatní/22 (p=0,0000) H _(2, N=90) =64,15046 p =0,0000	Ostatní/22 (p=0,0000) H _(2, N=90) =65,75332 p =0,0000	-20/4; 22 (p=0,0020); (p=0,0000) 4/22 (p=0,0000) H _(2, N=90) =77,51133 p =0,0000

Formulace uvedené před lomítkem dosáhly v biotestu vyšších hodnot než varianty uvedené za lomítkem. Hodnoty byly posouzeny na základě Kruskal – Wallisova testu.

^y Mezi jednotlivými variantami nebyly nalezeny statisticky prokazatelné rozdíly

Graf 15 Porovnání účinnosti houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvy *T. molitor* (neformulované spory, hodnoty po 8 dnech biotestu).Tabulka 42 Statistické vyhodnocení účinnosti houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvy *T. molitor*.

Délka biotestu (dny)	Délka skladování (dny)				
	1	60	90	120	365
4	F=0,0000 p=1,0000	F=9,5275 p=0,1373	F=8,2497 p=0,01896	F=135,94 p=0,0000	F=133,00 p=0,00001
6	F=0,0000 p=1,0000	F=7,5992 p=0,02267	F=14,516 p=0,00502	F=86,785 p=0,0000	F=159,92 p=0,0000
8	---	F=23,665 p=0,00142	F=475,97 p=0,0000	F=86,785 p=0,0000	F=57,405 p=0,00012

Vyhodnocení provedeno na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

Virulence spor Bba I101 byla posuzována na základě rychlosti vývoje houby na larvách *T. molitor*. Do 90 dnů od počátku skladování byl nejrychlejší vývoj infekce iniciován sporama uloženými v teplotě 4°C, poté došlo k vyrovnání hodnot v teplotách 4 a -20°C. Jednoznačně nejpomalejší průběh měla infekce vyvolaná sporama Bba I101 uloženými v teplotě 22°C, jak naznačuje i statistické vyhodnocení. Rovněž mortalita larev vyvolaná sporama Bba I101 uloženými v teplotě 22°C měla rychle klesající trend, oproti zbylým dvěma variantám, které se v průběhu celého pokusu držely blízko nebo přímo na hranici 100% po 8 dnech biotestu.

Při hodnocení NK byly hodnoceny čtyři základní parametry. Prvním byla klíčivost, dále vývoj houby na 2% agaru, vývoj houby na živém hostiteli *T. molitor* a mortalita, kterou spory Bba I101 vyvolávaly po aplikaci na hostitele. Ve všech částech měly výsledky získané ze skladování v teplotách -20 a 4°C velmi podobný průběh a v těchto teplotách nedošlo ani k výrazné redukci kvalitativních vlastností během skladování. Co se týká teploty 22°C, byl jasně patrný klesající trend všech ukazatelů v průběhu skladování, po 365 dnech vykazovaly konidie skladované v této teplotě velmi nízkou vitalitu.

5.2.5. Porovnání vitality a virulence konidií formulovaných v nutritivním nosiči v průběhu skladování v různých teplotách

Jako další typ formulace byl použit NN. Biotesty hodnotící kvalitu spor v průběhu skladování byly shodné jako při hodnocení NK.

Tabulka 43 Vliv teploty skladování na vitalitu spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 (spory v nutritivním nosiči, klíčivost % po 24 hodinách±SE).

Délka skladování (dny)	Teplota skladování (°C)					
	-20		4		22	
1	97,33±0,47	ABa	97,33±0,47	Aa	97,33±0,47	Aa
30	97,67±0,94	ABa	97,00±0,00	Aa	96,33±0,47	Aa
60	96,67±0,47	ABa	97,67±0,47	Aa	87,33±0,94	Bb
90	98,67±0,47	Aa	97,67±0,47	Aa	56,00±2,16	Cb
120	93,67±0,47	Ca	96,67±0,47	Aa	12,33±1,70	Db
365	94,67±0,94	BCa	96,67±0,47	Aa	9,33±0,94	Db

A,B,C – hodnoty v jednom sloupci označené stejným velkým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

a,b,c - hodnoty v jednom řádku označené stejným malým písmenem nejsou statisticky na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

V prvních dvou hodnoceních, tzn. po 1 a 30 dnech nebyly nalezeny statisticky prokazatelné rozdíly v klíčivostech spor Bba I101 formulovaných v NN. V ostatních termínech hodnocení byly hodnoty dosažené v teplotě 22°C prokazatelně nejnižší ($F_{(2, 6)}=146,17$; $p=0,00001$; $F_{(2, 6)}=696,04$; $p=0,0000$; $F_{(2, 6)}=4120,9$; $p=0,0000$; $F_{(2, 6)}=7456,4$; $p=0,0000$). Spory imobilizované v NN skladované v ostatních dvou teplotách dosahovaly velmi vyrovnaných hodnot.

Tabulka 44 Vývoj houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v průběhu skladování (spory v nutritivním nosiči, GI 24±SE)

Délka skladování (dny)	Teplota skladování (°C)		
	-20	4	22
1	1,78±0,48	1,78±0,48	1,78±0,48
30	1,89±0,40	1,89±0,39	1,84±0,45
60	2,10±0,47	2,06±0,41	1,55±0,73
90	2,05±0,57	1,92±0,40	0,59±0,70
120	2,21±0,66	1,87±0,54	0,12±0,36
365	1,86±0,47	1,91±0,38	0,09±0,35

Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

V případě GI 24 nebyl po 30 dnech prokazatelný rozdíl mezi jednotlivými teplotami u konidií Bba I101 skladovaných v NN. Po 60 a 365 dnech byly odlišnosti v rychlosti vývoje GI 24 zjištěny u formulace uložené v teplotě 22°C ($H_{(2, N=900)}=203,0886$; $p=0,000$; $H_{(2, N=900)}=705,4522$; $p=0,000$). Rychlost vývoje byla zjevně pozitivně ovlivněna teplotou skladování -20°C a po 90 a 120 dnech se odlišovaly vzájemně všechny varianty ($H_{(2, N=900)}=535,2954$; $p=0,000$; $H_{(2, N=900)}=635,9211$; $p=0,000$).

Tabulka 45 Virulence houby *B. bassiana* kmen Bba I101 formulované v nutritivním nosiči na larvy *T. molitor* (průměrné FDI±SE).

Délka skladování (dny)	Délka biotestu (dny)	Teplota skladování (°C)		
		-20	4	22
1	4	1,53±0,91	1,53±0,91	1,53±0,91
	6	1,90±0,87	1,90±0,87	1,90±0,87
	8	2,67±0,48	2,67±0,48	2,67±0,48
60	4	1,60±0,92	1,62±0,13	0,80±0,09
	6	1,88±0,93	1,90±0,15	0,83±0,16
	8	2,65±0,52	2,53±0,15	1,87±0,10
90	4	0,80±0,66	1,05±0,72	0,33±0,36
	6	1,62±0,99	1,60±0,96	0,42±0,47
	8	2,37±0,87	2,73±0,61	0,82±0,99
120	4	1,70±0,54	1,47±0,50	0,30±0,44
	6	1,90±0,40	1,78±0,38	0,45±0,49
	8	2,52±0,48	2,27±0,37	0,80±0,97
365	4	2,02±0,29	1,82±0,62	0,22±0,26
	6	2,28±0,38	2,12±0,39	0,43±0,46
	8	3,00	2,58±0,40	0,55±0,44

Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

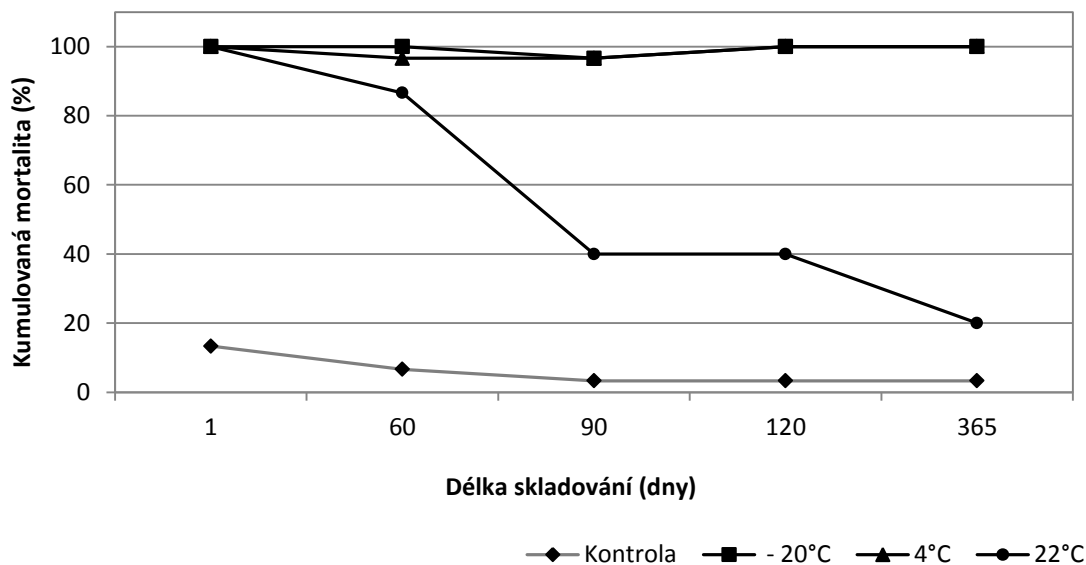
Tabulka 46 Statistické vyhodnocení FDI u konidií Bba I101 formulovaných v nutritivním nosiči skladovaných po dobu 1 roku v různých teplotách.

Den skladování (dny)	Délka biotestu (dny)		
	4	6	8
1	y	y	y
60	4; -20 /22 (p=0,0012); (p=0,0022) H _(2, N=90) =16,52531 p =0,0003	4;-20/ 22 (p=0,00006); (p=0,0001) H _(2, N=90) =23,79945 p =0,0000	-20; 4/ 22 (p=0,0069); (p=0,0036) H _(2, N=90) =15,43715 p =0,0004
90	4;-20 /22 (p=0,0002); (p=0,0199) H _(2, N=90) =17,70726 p =0,0001	-20;4/ 22 (p=0,0000) H _(2, N=90) =28,22277 p =0,0000	4;-20 /22 (p=0,0000) H _(2, N=90) =41,19143 p =0,0000
120	-20;4/ 22 (p=0,0000) H _(2, N=90) =54,13545 p =0,0000	-20;4/ 22 (p=0,0000) H _(2, N=90) =52,81207 p =0,0000	-20;4/ 22 (p=0,0000) H _(2, N=90) =37,67942 p =0,0000
365	-20;4/ 22 (p=0,0000) H _(2, N=90) =59,45029 p =0,0000	-20;4/ 22 (p=0,0000) H _(2, N=90) =60,71073 p =0,0000	-20/4; 22 (p=0,01942); (p=0,0000) 4/22 (p=0,0000) H _(2, N=90) =73,36471 p =0,0000

Formulace uvedené před lomítkem dosáhly v biotestu vyšších hodnot než varianty uvedené za lomítkem. Hodnoty byly posouzeny na základě Kruskal – Wallisova testu.

^y Mezi jednotlivými variantami nebyly nalezeny statisticky prokazatelné rozdíly

Tendence uváděné u rychlosti vývoje houby Bba I101 na vodním agaru tak úplně neplatily u rychlosti vývoje na živém hostiteli. V tomto případě byly hodnoty FDI zjištěné u variant založených se sporama skladovanými v teplotách 4 a -20°C velmi vyrovnané a prakticky v průběhu celého hodnocení nezaznamenaly statisticky prokazatelné odlišnosti. Stejně jako u obou předchozích ukazatelů i v rychlosti vývoje na larvách *T. molitor* byly prokazatelně nejnižší hodnoty zjištěny ve variantách spor Bba I101 formulovaných v NN a uložených v teplotě 22°C.

Graf 16 Účinnost houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvy *T. molitor* v průběhu skladování (spory v nutritivním nosiči, hodnoty po 8 dnech biotestu).Tabulka 47 Statistické vyhodnocení účinnosti houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvy *T. molitor* v průběhu skladování v nutritivním nosiči.

Délka biotestu (dny)	Délka skladování (dny)				
	1	60	90	120	365
	df=2, 6				
4	F=0,0000 p=1,0000	F=8,9758 p=0,01572	F=7,4710 p=0,02352	F=58,170 p=0,00012	F=28,764 p=0,00084
6	F=0,0000 p=1,0000	F=14,688 p=0,00488	F=28,164 p=0,00089	F=66,622 p=0,00008	F=223,88 p=0,0000
8	---	F=7,8691 p=0,02103	F=22,947 p=0,00155	F=223,24 p=0,0000	F=223,88 p=0,0000

Vyhodnocení provedeno na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

Křivka poklesu mortality nebyla tak strmá jako tomu bylo u neformulovaných konidií, přesto i v případě hodnocení formulace spor v NN byl pokles virulence spor uložených ve 22°C velmi výrazný, jak je patrné z grafu.

Vitalita u konidií formulovaných v NN byla výrazně vyšší v nízkých skladovacích teplotách (-20 a 4°C). Hodnoty klíčivosti se pohybovaly nad hranicí 93% v průběhu celého skladování. Ostatní hodnocení se mezi těmito dvěma teplotami příliš nelišila. Odlišnost byla výrazná po 365 dnech skladování ve 22°C, kde došlo k poklesu klíčivosti na úroveň 9,33% a indexu vývoje houby (GI) na hodnotu 0,09. Zatímco u teplot -20 a 4°C byly hodnoty 1,86 a 1,91. Podobný stav nastal i při hodnocení vývoje spor Bba I101 na larvách *T. molitor*, kdy formulace v NN skladovaná ve 22°C dosáhla maximální hodnoty FDI 0,55 po 8 dnech biotestu. Mortalita larev pak klesla na 19,98% oproti 100% u dalších dvou teplot. Všechny hodnocené parametry měly klesající tendenci v průběhu skladování ve 22°C.

5.2.6. Porovnání vitality a virulence konidií formulovaných v inertních nosičích v průběhu skladování v různých teplotách

Formulace v inertních nosičích byla součástí hodnocení práškových formulací. IN1 měl menší velikost částic oproti IN2. Mezi oběma nosiči se projeví v rámci skladování určité odlišnosti ve vitalitě a virulenci imobilizovaných konidií.

5.2.6.1. Porovnání vitality a virulence spor formulovaných v inertním nosiči č.1

Tabulka 48 Vliv teploty skladování na vitalitu houby *B. bassiana* kmen Bba I101 formulované v inertním nosiči č.1 (klíčivost % \pm SE, 24 hodin).

Délka skladování (dny)	Teplota skladování (°C)					
	-20		4		22	
1	97,33 \pm 0,47	Aa	97,33 \pm 0,47	Aa	97,33 \pm 0,47	Aa
30	95,33 \pm 2,87	Aa	94,33 \pm 0,47	Ba	93,00 \pm 0,82	Aa
60	94,00 \pm 0,82	ABa	93,67 \pm 1,25	Ba	45,33 \pm 2,63	Bb
90	90,33 \pm 0,47	BCa	89,33 \pm 0,47	Ca	44,33 \pm 1,70	Bb
120	88,00 \pm 1,63	Ca	88,67 \pm 1,25	Ca	44,67 \pm 1,25	Bb
365	89,33 \pm 0,47	BCa	84,67 \pm 0,47	Db	8,00 \pm 1,41	Cc

A,B,C – hodnoty v jednom sloupci označené stejným velkým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

a,b,c - hodnoty v jednom řádku označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

První rozdíly v klíčivosti konidií Bba I101 skladovaných v IN1 se objevily po 60 dnech skladování. V rozmezí 60 a 120 dnů byly statisticky prokazatelně odlišné hodnoty zjištěné v teplotě 22°C, ve které došlo k poklesu množství klíčivých konidií zhruba na polovinu množství zjištěného v ostatních dvou teplotách ($F_{(2, 6)}=516,37$; $p=0,0000$; $F_{(2, 6)}=1242,6$; $p=0,0000$; $F_{(2, 6)}=660,15$; $p=0,0000$). Po 365 dnech skladování byly prokazatelné odlišnosti mezi všemi skladovacími teplotami ($F_{(2, 6)}=5119,6$; $p=0,0000$).

Tabulka 49 Vliv teploty skladování na vývoj houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v průběhu skladování v inertním nosiči č. 1 (GI 24 \pm SE).

Délka skladování (dny)	Teplota skladování (°C)		
	-20	4	22
1	1,74 \pm 0,50	1,74 \pm 0,50	1,74 \pm 0,50
30	1,76 \pm 0,59	1,84 \pm 0,51	1,23 \pm 0,71
60	1,82 \pm 0,53	1,79 \pm 0,54	0,66 \pm 0,81
90	1,63 \pm 0,70	1,44 \pm 0,73	0,57 \pm 0,73
120	1,45 \pm 0,72	1,47 \pm 0,72	0,55 \pm 0,73
365	1,79 \pm 0,62	1,69 \pm 0,72	0,06 \pm 0,21

Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

Ze statistického hodnocení GI 24 u konidií Bba I101 skladovaných v IN1 je zřetelná odlišnost hodnot zjištěných v teplotě 22°C, s výjimkou hodnocení po 90 dnech skladování. V tomto intervalu byly statisticky odlišné hodnoty zjištěné ve všech teplotách, nejvyšší rychlost vývoje byla zaznamenána v případě formulace spor skladované v teplotě -20°C ($H_{(2, N=900)}=186,5109$; $p=0,000$; $H_{(2, N=900)}=406,4860$; $p=0,000$; $H_{(2, N=900)}=231,4705$; $p=0,000$; $H_{(2, N=900)}=596,5992$; $p=0,000$).

Tabulka 50 Virulence houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvách *T. molitor* v průběhu skladování spor v inertním nosiči č.1 (FDI±SE).

Délka skladování (dny)	Délka biotestu (dny)	Teplota skladování (°C)		
		-20	4	22
1	4	2,68±0,35	2,68±0,35	2,68±0,35
	6	2,98±0,05	2,98±0,05	2,98±0,05
	8	3,00	3,00	3,00
60	4	1,83±0,77	2,03±0,56	0,78±0,47
	6	2,38±0,59	2,63±0,53	1,62±0,53
	8	2,68±0,49	2,87±0,28	2,52±0,56
90	4	0,53±0,40	0,68±0,58	0,12±0,25
	6	1,22±0,83	1,58±0,88	0,15±0,23
	8	2,46±0,86	2,55±0,83	0,45±0,42
120	4	1,33±0,78	1,30±0,54	0,18±0,27
	6	1,73±0,73	1,57±0,72	0,25±0,36
	8	2,30±0,80	2,27±0,87	0,35±0,45
365	4	1,72±0,40	1,78±0,29	0,18±0,29
	6	1,98±0,50	2,23±0,32	0,32±0,47
	8	3,00	2,47±0,42	0,45±0,57

Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

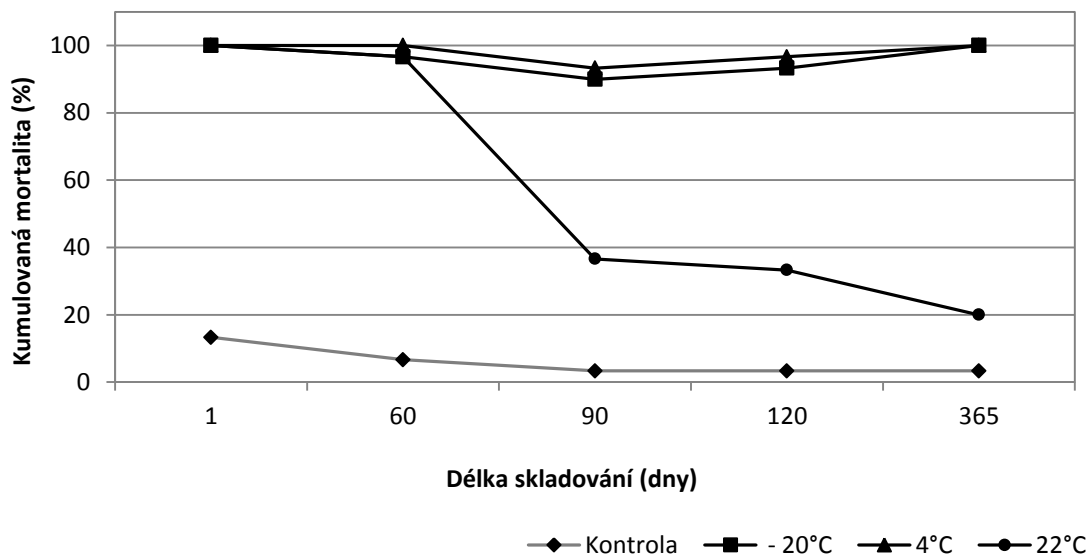
Tabulka 51 Statistické vyhodnocení vývoje houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvách *T. molitor* v průběhu skladování spor v inertním nosiči č.1.

Den skladování (dny)	Délka biotestu (dny)		
	4	6	8
1	y	y	y
60	4; -20 / 22 (p=0,0000) H _(2, N=90) =36,21475 p =0,0000	4; -20 / 22 (p=0,0000); (p=0,0002) H _(2, N=90) =33,63558 p =0,0000	4 / 22 (p=0,0301) H _(2, N=90) =8,93078 p =0,0115
	4; -20 / 22 (p=0,0000); (p=0,0008) H _(2, N=90) =29,88753 p =0,0000	4; -20 / 22 (p=0,0000) H _(2, N=90) =38,32328 p =0,0000	4; -20 / 22 (p=0,0000) H _(2, N=90) =47,92201 p =0,0000
	120	-20; 4 / 22 (p=0,0000) H _(2, N=90) =56,73318 p =0,0000	-20; 4 / 22 (p=0,0000) H _(2, N=90) =43,10321 p =0,0000
365	4; -20 / 22 (p=0,0000)	4; -20 / 22 (p=0,0000)	-20; 4; 22 (p=0,0060); (p=0,0000) 4/22 (p=0,0000) H _(2, N=90) =72,46006 p =0,0000
	H _(2, N=90) =62,71848 p =0,0000	H _(2, N=90) =64,20917 p =0,0000	

Formulace uvedené před lomítkem dosáhly v biotestu vyšších hodnot než varianty uvedené za lomítkem. Hodnoty byly posouzeny na základě Kruskal – Wallisova testu.

^y Mezi jednotlivými variantami nebyly nalezeny statisticky prokazatelné rozdíly

Do 90 dnů skladování byly nejvyšší hodnoty rychlosti vývoje FDI sledované v teplotě 4°C. Po uplynutí 120 dnů byly vyšší hodnoty FDI zjišťované u variant založených se spory skladovanými v IN1 v teplotě -20°C, přesto ve většině případů nebyl mezi variantami uloženými v nízkých teplotách nalezen statisticky prokazatelný rozdíl.

Graf 17 Vliv skladovací teploty a formulace na účinnost houby *B. bassiana* na larvy *T. molitor* (inertní nosič č.1, hodnoty po 8 dnech biotestu).Tabulka 52 Statistické vyhodnocení mortality larev *T. molitor* vyvolané houbou *B. bassiana* kmen Bba I101 formulované v inertním nosiči č.1.

Délka biotestu (dny)	Délka skladování (dny)				
	1	60	90	120	365
	df=2, 6				
4	F=0,0000 p=1,0000	F=18,464 p=0,00273	F=7,3707 p=0,02421	F=21,341 p=0,00187	F=28,764 p=0,00084
6	F=0,0000 p=1,0000	F=0,5000 p=0,62974	F=33,459 p=0,00056	F=18,005 p=0,00291	F=96,567 p=0,00003
8	---	F=0,5000 p=0,62974	F=16,202 p=0,00381	F=12,889 p=0,00673	F=98,929 p=0,00004

Vyhodnocení provedeno na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

V mortalitě vyvolané u larev *T. molitor* byl zjištěn mírný pokles hodnot po 90 dnech skladování, pokles nebyl příliš výrazný a nelišil se významně mezi variantami uloženými v teplotách 4 a -20°C . V případě průběhu mortality vyvolané spory finalizovanými v IN1 uloženými v teplotě 22°C došlo v průběhu skladování k výraznému poklesu.

V případě formulace spor Bba I101 v IN1 došlo k poklesu klíčivosti i u nízkých skladovacích teplot, hodnoty poklesly na úroveň 89,33% (-20°C) a 84,67% (4°C). Ukazatele vitality v teplotách -20 a 4°C prakticky kopírují svůj průběh. U skladovací teploty 22°C je zaznamenána výrazně klesající tendence. Nepatrně odlišná situace nastala u mortality, kde je mezi variantami uloženými v nízkých skladovacích teplotách vidět vyšší rozdíl.

5.2.6.2. Porovnání vitality a virulence spor formulovaných v inertním nosiči č.2

Imobilizace konidií Bba I101 v IN2 byla poslední hodnocenou formulací. U této formulace byl zaznamenán jiný trend vývoje kvalitativních ukazatelů než tomu bylo u předchozích nosičů.

Tabulka 53 Vliv teploty skladování na vitalitu houby *B. bassiana* kmen Bba I101 po imobilizaci spor do inertního nosiče č.2 (klíčivost %±SE, 24 hod).

Délka skladování (dny)	Teplota skladování (°C)					
	-20		4		22	
1	96,33±0,47	Aa	96,33±0,47	Aa	96,33±0,47	Aa
30	93,33±0,47	ABa	94,33±0,94	ABa	73,67±1,25	Bb
60	93,67±0,47	ABa	91,33±0,47	Ba	43,33±1,89	Cb
90	92,67±0,47	Ba	41,67±0,47	Db	15,00±1,41	Dc
120	87,33±2,06	Ca	40,67±2,36	Db	22,33±0,94	Dc
365	74,33±1,25	Da	50,33±1,25	Cb	1,33±0,47	Ec

A,B,C – hodnoty v jednom sloupci označené stejným velkým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

a,b,c - hodnoty v jednom řádku označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

Na počátku hodnocení klíčivosti nebyly statisticky prokazatelné rozdíly mezi jednotlivými variantami skladování konidií Bba I101 v IN2. Po 30 a 60 dnech byly prokazatelně odlišné hodnoty v počtu klíčivých spor ve 22°C ($F_{(2, 6)}=305,58$; $p=0,0000$; $F_{(2, 6)}=1210,7$; $p=0,0000$). Do konce pokusu pak byly prokazatelně odlišné hodnoty klíčivosti mezi všemi teplotami ($F_{(2, 6)}=3339,9$; $p=0,0000$; $F_{(2, 6)}=631,77$; $p=0,0000$; $F_{(2, 6)}=2491,8$; $p=0,0000$).

Tabulka 54 Vývoj houby *B. bassiana* kmen Bba I101 formulované v inertním nosiči č.2 v průběhu skladování (GI 24±SE).

Délka skladování (dny)	Teplota skladování (°C)		
	-20	4	22
1	1,74±0,52	1,74±0,52	1,74±0,52
30	1,84±0,51	1,76±0,57	1,11±0,86
60	1,87±0,49	1,71±0,63	0,55±0,74
90	1,76±0,59	0,90±0,87	0,19±0,42
120	1,55±0,72	0,71±0,89	0,22±0,49
365	1,41±0,87	0,98±0,98	0,01±0,06

Statistické vyhodnocení provedeno na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

Z hlediska GI 24 u konidií Bba I101 formulovaných v IN2 byly rozdíly ve stejných variantách jako u klíčivosti. Po 30 a 60 dnech se odlišoval vývoj u varianty skladované v IN2 v teplotě 22°C od zbývajících dvou variant ($H_{(2, N=900)}=178,6966$; $p=0,0000$; $H_{(2, N=900)}=448,9598$; $p=0,0000$). Vzájemné odlišnosti mezi všemi variantami byly zjištěny po 90, 120 a 365 dnech skladování, nejvyšší hodnoty byly stabilně zjišťované u spor uložených v teplotě -20°C ($H_{(2, N=900)}=424,4509$; $p=0,0000$; $H_{(2, N=900)}=327,9321$; $p=0,0000$; $H_{(2, N=900)}=338,1890$; $p=0,0000$).

Tabulka 55 Vliv teploty skladování na virulenci houby *B. bassiana* kmen Bba I101 hodnocené na larvách *T. molitor*, spory formulované v inertním nosiči č.2 (FDI±SE).

Délka skladování (dny)	Délka biotestu (dny)	Teplota skladování (°C)		
		-20	4	22
1	4	1,78±1,08	1,78±1,08	1,78±1,08
	6	2,63±0,76	2,63±0,76	2,63±0,76
	8	2,65±0,62	2,65±0,62	2,65±0,62
60	4	1,50±0,96	1,78±1,03	0,47±0,46
	6	1,58±0,95	1,98±0,89	1,37±0,79
	8	1,90±0,92	2,32±0,69	1,83±0,96
90	4	0,60±0,44	0,77±0,40	0,22±0,33
	6	1,32±0,97	1,33±0,91	0,38±0,50
	8	2,10±1,11	2,75±0,04	0,80±1,04
120	4	1,35±0,54	0,53±0,48	0,22±0,29
	6	1,68±0,71	1,45±0,45	0,32±0,34
	8	2,03±0,74	1,83±0,55	0,58±0,53
365	4	1,38±0,65	1,75±0,38	0,12±0,20
	6	1,90±0,43	2,02±0,40	0,35±0,35
	8	2,98±0,05	2,38±0,44	0,47±0,47

Statistické vyhodnocení provedeno na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

Tabulka 56 Statistické vyhodnocení vývoje houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvách *T. molitor* v průběhu skladování v inertním nosiči č.2.

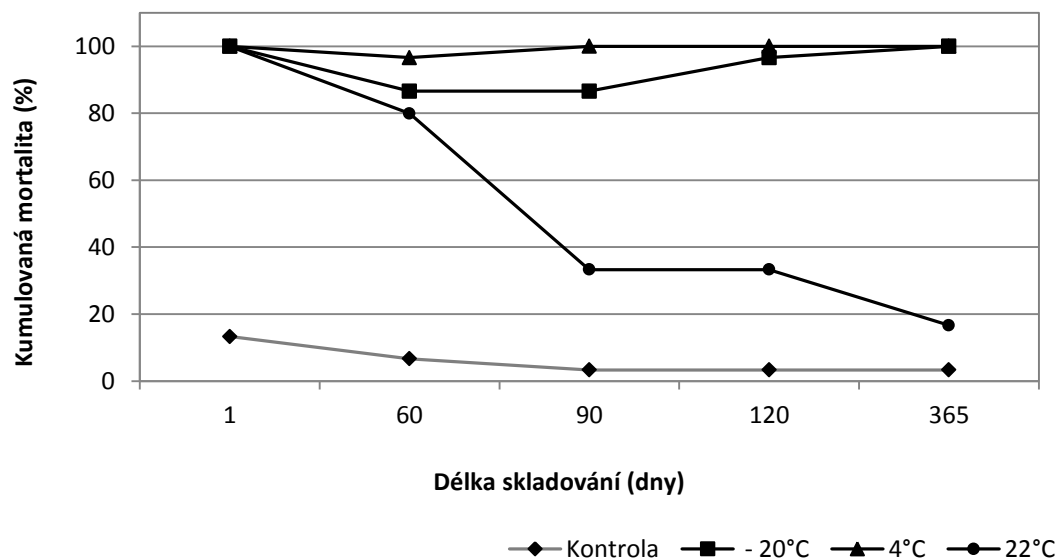
Den skladování (dny)	Délka biotestu (dny)		
	4	6	8
1	y	y	y
60	4;-20 /22 (p=0,0000); (p=0,0008) $H_{(2, N=90)}=26,79417$ p=0,000	y	y
90	4;-20 /22 (p=0,0000); (p=0,0079) $H_{(2, N=90)}=21,77947$ p=0,000	4; -20 / 22 (p=0,0001); (p=0,0002) $H_{(2, N=90)}=23,57998$ p=0,0000	4; -20 /22 (p=0,0000) $H_{(2, N=90)}=39,25160$ p=0,0000
120	-20/4; 22 (p=0,0001); (p=0,0000) $H_{(2, N=90)}=44,92245$ p=0,0000	-20;4/ 22 (p=0,0000) $H_{(2, N=90)}=50,00303$ p=0,0000	-20;4/ 22 (p=0,0000) $H_{(2, N=90)}=44,65212$ p=0,0000
365	4;-20 / 22 (p=0,0000) $H_{(2, N=90)}=56,87575$ p=0,0000	4;-20 / 22 (p=0,0000) $H_{(2, N=90)}=61,84586$ p=0,0000	-20/4;22 (p=0,0023); (p=0,0000) 4/22 (p=0,0000) $H_{(2, N=90)}=75,00652$ p=0,0000

Formulace uvedené před lomítkem dosáhly v biotestu vyšších hodnot než varianty uvedené za lomítkem. Hodnoty byly posouzeny na základě Kruskal – Wallisova testu.

^y Mezi jednotlivými variantami nebyly nalezeny statisticky prokazatelné rozdíly

V rychlosti vývoje houby Bba I101 na larvách *T. molitor* byl zaznamenán stejný průběh jako u předchozích formulací. Na počátku skladování byl rychlejší vývoj zaznamenán u variant uložených v teplotě 4°C, po uplynutí 120 dnů bylo vyšší rychlosti vývoje dosaženo u variant uložených v teplotě -20°C. Mezi oběma variantami však nebyly nalezeny statistické odlišnosti, s výjimkou 8. dne biotestu prováděného po 365 dnech skladování, kde byly hodnoty rychlosti vývoje zjištěné v teplotě -20°C prokazatelně nejvyšší.

Graf 18 Vývoj mortality larev *T. molitor* vyvolané houbou *B. bassiana* kmen Bba I101 v průběhu skladování v různých teplotách (inertní nosič č.2, hodnoty po 8 dnech biotestu).



V průběhu mortality byly rozdíly mezi všemi variantami, nejvyšší mortalita v průběhu hodnocení byla zjišťována při použití spor imobilizovaných v IN2 a uložených v teplotě 4°C.

Tabulka 57 Statistické vyhodnocení mortality larev *T. molitor* vyvolané houbou *B. bassiana* kmen Bba I101 v průběhu skladování v inertním nosiči č.2.

Délka Biotestu (dny)	Délka skladování (dny)				
	1	60	90	120	365
4	F=0,01697 p=0,98322	F=30,380 p=0,00073	F=4,1862 p=0,07275	F=16,688 p=0,00354	F=68,052 p=0,00008
6	---	F=1,1641 p=0,37393	F=48,872 p=0,00022	F=19,669 p=0,00232	F=35,951 p=0,00046
8	---	F=2,0161 p=0,21393	F=22,067 p=0,00171	F=64,664 p=0,00009	F=595,72 p=0,0000

Vyhodnocení provedeno na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

U spor formulovaných v IN2 nastala v průběhu hodnocení částečně odlišná situace v porovnání s předchozími hodnocenými formulacemi. Na rozdíl od nich totiž u spor uložených v IN2 došlo k poklesu klíčivosti i GI po 365 dnech skladování konidií i v teplotě 4°C. V rychlosti vývoje Bba I101 na larvách *T. molitor* byl pokles méně výrazný než v rámci hodnocení GI. Vyšší mortalita byla dosažena po použití spor Bba I101 skladovaných v teplotě 4°C, maximální rozdíl dosahoval 13,36%.

5.2.7. Porovnání vitality a virulence různých kmenů houby *B. bassiana* formulovaných v inertním nosiči

Jak bylo naznačeno v kapitole týkající se produkce spor, byly patrné rozdíly i v rámci preparátů vytvořených z různých kmenů jednoho druhu houby, v našem případě houby *B. bassiana*. V testech vitality a virulence byly použity spory kmenů houby *B. bassiana* vyprodukované na přirozeném substrátu (kroupy), které byly finalizovány do IN1. S formulacemi byly následně provedeny testy zahrnující hodnocení vitality (klíčivost a GI) a virulence vůči cílovému organismu *T. molitor*. V případě tohoto testu nebyla použita metoda dip testu, ale ke 20 larvám po povrchové sterilaci bylo přidáno 0,1g preparátu, který v určitém množství na larvách ulpěl, jak uvádí následující tabulka.

Tabulka 58 Kvantitativní ukazatele práškové formulace u různých kmenů houby *B. bassiana*.

Kmen	Kvantitativní ukazatele formulace		
	CFU/g preparátu		Spor/larvu*
Bba I 101	2,56±0,04x10 ⁸	b	7,81x10 ⁴
NP 0004	4,23±0,17x10 ⁸	a	1,10x10 ⁵
NP 0005	1,59±0,08x10 ⁸	c	5,58x10 ⁵
NP 0007	3,89±0,09x10 ⁸	a	1,13x10 ⁵
NP 0028	2,72±0,17x10 ⁸	b	6,39x10 ⁴

a,b,c – hodnoty v jednom sloupci označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

* množství spor na larvu bylo stanoveno na základě zjištěné hodnoty CFU/g preparátu

Mezi hodnotami CFU byl statisticky prokazatelný rozdíl $F_{(4, 10)}=151,14$; $p=0,0000$.

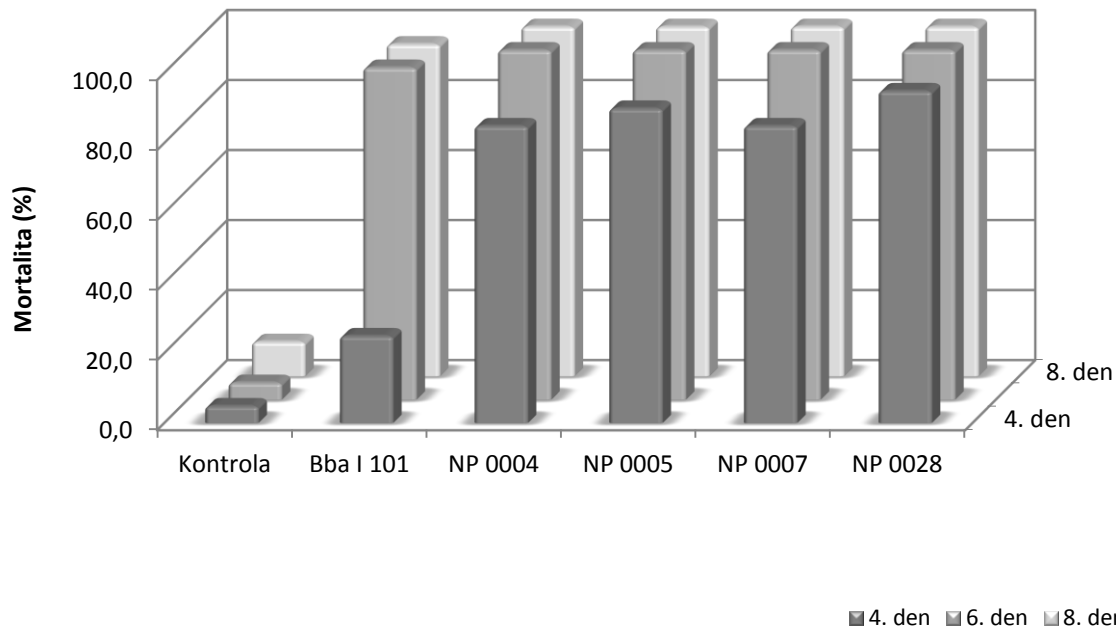
Tabulka 59 Porovnání vývoje různých kmenů houby *B. bassiana* na larvách *T. molitor* po imobilizaci spor do inertního nosiče č.1 (FDI±SE).

Kmen	Délka biotestu (dny)		
	4	6	8
Bba I 101	0,68±0,46	1,65±0,53	2,33±0,64
NP 0004	1,45±0,55	2,20±0,46	2,85±0,28
NP 0005	1,56±0,51	2,30±0,46	2,83±0,36
NP 0007	1,45±0,55	2,40±0,26	2,80±0,37
NP 0028	1,68±0,43	2,33±0,33	2,85±0,36

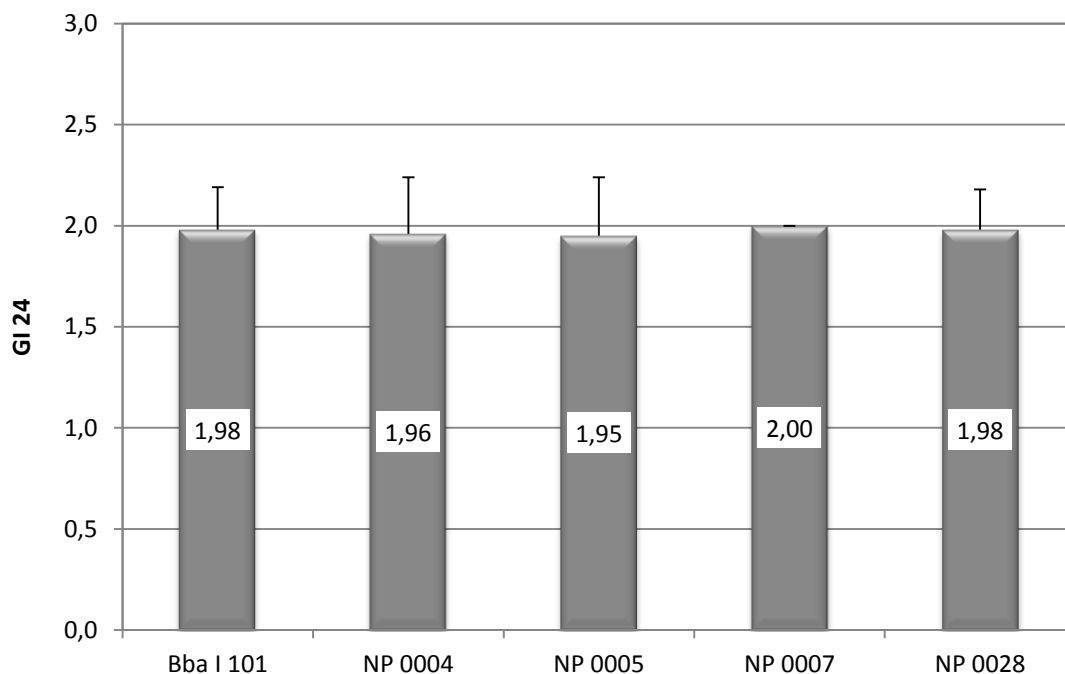
*Statistické vyhodnocení provedeno na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

V průběhu testu virulence se statisticky průkazně odlišil pouze kmen Bba I101, u kterého byly dosahovány nižší hodnoty FDI než u ostatních kmenů (po 4 dnech $H_{(4, N=100)}=30,22352$ $p=0,0000$; po 6 dnech $H_{(4, N=100)}=30,27502$ $p=0,0000$). Po 8 dnech biotestu došlo k vyrovnání hodnot a odlišnost zůstala pouze mezi kmenem Bba I101 a NP 0004, u kterého byl naopak vývoj nejrychlejší ($H_{(4, N=100)}=18,42006$ $p=0,0010$). V případě mortality byly odlišnosti po 4 dnech ($F_{(4, 5)}=6,9167$; $p=0,0286$). Prokazatelně nejvyšších hodnot bylo dosaženo s kmeny NP 0005 a NP 0028, nejnižší pak s kmenem Bba I101, v dalším průběhu biotestu nebyly mezi hodnotami statisticky prokazatelné rozdíly.

Graf 19 Porovnání mortality larev *T. molitor* vyvolané různými kmeny houby *B. bassiana*, spory formulované v inertním nosiči č.1.



Graf 20 Porovnání vitality vybraných kmenů houby *B. bassiana* po formulaci spor do inertního nosiče č.1 (GI 24).



Mezi zjištěnými hodnotami GI 24 nebyly výrazné rozdíly, hodnoty v rozmezí 1,95-2,00 nevykázaly ani statistickou odlišnost. Stejně tomu bylo i u klíčivostí, jejichž hodnoty se pohybovaly v rozmezí 98 až 100%.

5.3. Předaplikační příprava postřikové jichy z práškové formulace spor houby *B. bassiana*

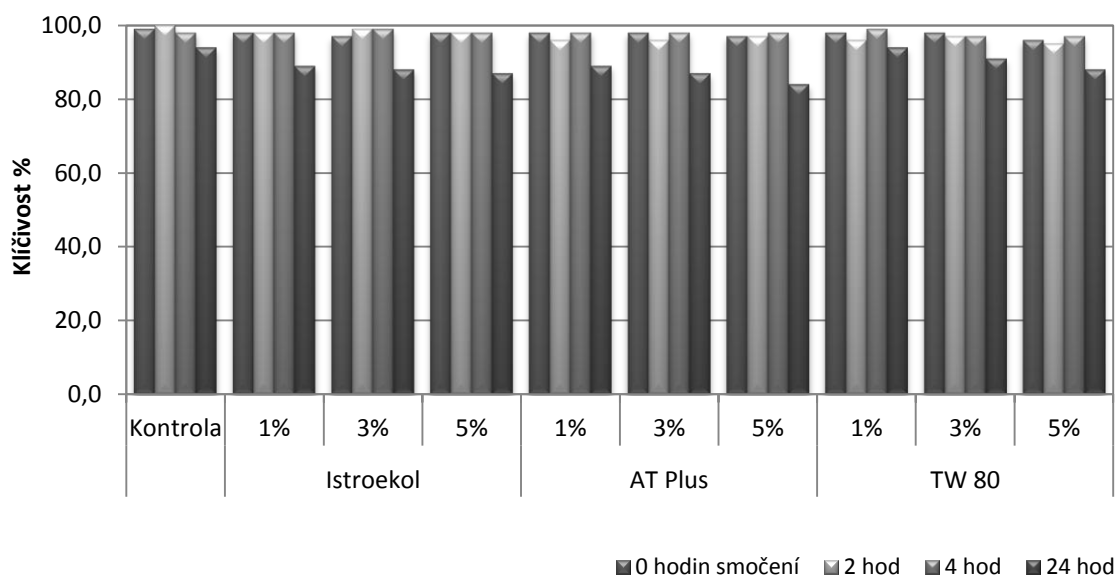
Konidie houby *B. bassiana* mají silně hydrofobní povrch, tudíž je k jejich rovnoměrnému rozmíchání do postřikové jichy potřeba použít smáčedlo. Základní požadavky pro výběr vhodného smáčedla jsou důkladná homogenizace prášku případně tekutiny ve vodě s co nejmenším negativním vlivem na kvalitu aplikovaných spor. V následující části práce byly hodnoceny rozdíly v ovlivnění zadaných kritérií jednotlivými komerčně produkovánými smáčedly. V první fázi bylo hodnoceno 6 smáčedel (Mero, Adigor, Istroekol, AT Plus, Agrovital a Tween 80), které byly aplikovány v dávce předepsané výrobcem. Na základě zjištěných údajů byla vybrána 3 smáčedla (Istroekol, AT Plus a Tween 80), u kterých se hodnotil vliv na vitalitu spor v dalších koncentracích a nakonec u finálního zvoleného přípravku Istroekol byla hodnocena schopnost vytvořit homogenní směs prášku s vodou.

Tabulka 60 Vliv smáčedla na rozpustnost preparátu na bázi houby *B. bassiana* kmen Bba I101.

Smáčedlo	Rozpustnost preparátu	Přítomnost nerozpuštěných shluků
Mero	**	sporadicky
Adigor	**	sporadicky
Istroekol	***	nejsou
AT Plus	***	nejsou
Agrovital	*	plavou na hladině
Tween 80	**	sporadicky

***výborná rozpustnost preparátu, **dobrá rozpustnost, *špatná rozpustnost, nerozpuštěné shluky

Graf 21 Vliv různých koncentrací smáčedla na klíčivost spor *B. bassiana* kmen Bba I101 (24 hod).



Tabulka 61 Vývoj houby *B. bassiana* kmen Bba I101 po 2 hodinách smáčení preparátu v různých přípravcích (GI 24±SE).

Varianta	Mero	Adigor	Istroekol	AT Plus	Agrovital	Tween 80 (1%)
Konidie	1,92±0,25	1,54±0,54	1,73±0,43	2,00±0,00	1,88±0,33	1,75±0,47
Preparát	1,98±0,20	2,00±0,00	1,99±0,07	2,00±0,00	1,96±0,17	2,00±0,00

Vyhodnocení provedeno na základě Kruskal- Wallisova testu

Rozpustnost preparátu byla v jednotlivých smáčedlech dobrá, ve dvou případech výborná. Jednalo se o smáčedla Istroekol a AT Plus. Ta byla na základě tohoto testu, vybrána pro další hodnocení. U většiny variant byly na povrchu suspenze nerozpuštěné shluky konidií, ve třech případech byl jejich výskyt pouze sporadický, v případě smáčedla Agrovital byl počet shluků o něco vyšší. Nejnižší klíčivost spor byla zaznamenána při použití přípravku Adigor, kdy zjištěná hodnota byla 90%, u všech ostatních variant byla klíčivost 100%. V případě hodnocení vlivu smáčedla na vitalitu spor formulovaných v NN nebyl zjištěn žádný statisticky průkazný rozdíl, v případě NK jich bylo hned několik. Po použití přípravku Adigor se hodnoty klíčivosti spor odlišovaly od varianty používající přípravek Mero, AT Plus a Agrovital. Množství klíčivých spor po použití přípravku AT Plus se dále odlišovalo od přípravku Istroekol a TW 80 ($H_{(5, N=600)}=90,75134$; $p=0,0000$). Vývoj hodnot GI byl v rozmezí 1,54 (Adigor) a 2,00 (AT Plus).

Tabulka 62 Vliv smáčedla a jeho koncentrace na vývoj houby *B. bassiana* kmen Bba I101 (GI 24±SE).

Smočení (hod)	Kontrola	Koncentrace smáčedla (%)	Istroekol	AT Plus	Tween 80
1	2,09±0,38	1	1,91 ± 0,33	1,88 ± 0,40	1,92 ± 0,33
		3	1,93 ± 0,35	1,91 ± 0,37	1,95 ± 0,29
		5	1,92 ± 0,35	1,92 ± 0,35	1,91 ± 0,40
2	2,14±0,22	1	1,95 ± 0,29	1,92 ± 0,41	1,92 ± 0,41
		3	2,00 ± 0,22	1,84 ± 0,45	1,90 ± 0,40
		5	1,98 ± 0,29	1,76 ± 0,47	1,86 ± 0,48
4	2,12±0,38	1	1,96 ± 0,30	1,90 ± 0,35	1,99 ± 0,21
		3	1,99 ± 0,21	1,93 ± 0,33	1,94 ± 0,34
		5	1,96 ± 0,28	1,94 ± 0,30	1,93 ± 0,35
24	1,88±0,61	1	1,71 ± 0,66	1,60 ± 0,61	1,84 ± 0,51
		3	1,73 ± 0,65	1,52 ± 0,65	1,75 ± 0,60
		5	1,66 ± 0,75	1,33 ± 0,65	1,67 ± 0,69

Statistické vyhodnocení provedeno na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

Tabulka 63 Statistické vyhodnocení vlivu smáčedla na vývoj houby *B. bassiana* kmen Bba I101 (vliv délky smočení).

Použité smáčedlo	Koncentrace smáčedla (%)		
	1	3	5
Kontrola	2; 4/24 ($p=0,0426$; $p=0,0269$) $H_{(3, N=400)}=15,90051$; $p=0,0012$		
AT Plus	Ostatní/24 ($p=0,0000-0,0001$)	Ostatní/24 ($p=0,0000$)	Ostatní/24 ($p=0,0000$) 4/2 ($p=0,0494$) $H_{(3, N=400)}=141,0806$; $p=0,000$
	$H_{(3, N=400)}=63,74888$; $p=0,0000$	$H_{(3, N=400)}=83,33890$; $p=0,0000$	

Časy uvedené před lomítkem dosáhly v biotestu vyšších hodnot než varianty uvedené za lomítkem. Hodnoty byly posouzeny na základě Kruskal – Wallisova testu.

Pozn. U přípravků Istroekol a TW 80 nebyly nalezeny statisticky prokazatelné rozdíly v různé době namáčení spor

Tabulka 64 Statistické porovnání vlivu smáčedla na vývoj houby *B. bassiana* kmen Bba I101 (vliv smáčedla).

Délka (hod)	smočení	Koncentrace smáčedla (%)		
		1	3	5
1	Kontrola/Ostatní ($p=0,0005-0,0019$) $H_{(3, N=400)}=56,62973$; $p=0,0000$	Kontrola/Ostatní ($p=0,0019-0,0068$) $H_{(3, N=400)}=57,21375$; $p=0,0000$	Kontrola/Ostatní ($p=0,0022-0,0023$) $H_{(3, N=400)}=56,51223$; $p=0,0000$	
2	Kontrola/Ostatní ($p=0,0007-0,0018$) $H_{(3, N=400)}=65,83158$; $p=0,0000$	Kontrola/Ostatní ($p=0,0000-0,0158$) $H_{(3, N=400)}=76,86117$; $p=0,0000$	Kontrola/Ostatní ($p=0,0000-0,0160$) Istroekol/AT Plus ($p=0,0122$) $H_{(3, N=400)}=89,75092$; $p=0,0000$	
4	Kontrola/Ostatní ($p=0,0000-0,0066$) $H_{(3, N=400)}=68,61892$; $p=0,0000$	Kontrola/Ostatní ($p=0,0003-0,0037$) $H_{(3, N=400)}=68,05349$; $p=0,0000$	Kontrola/Ostatní ($p=0,0003-0,0016$) $H_{(3, N=400)}=72,22528$; $p=0,0000$	
24	Kontrola; TW 80/AT Plus ($p=0,0000$; $p=0,0016$) $H_{(3, N=400)}=37,25774$; $p=0,0000$	Ostatní/AT Plus ($p=0,0000-0,0012$) $H_{(3, N=400)}=48,67457$; $p=0,0000$	Ostatní/AT Plus ($p=0,0000$) $H_{(3, N=400)}=80,75232$; $p=0,0000$	

Varianty uvedené před lomítkem dosáhly v biotestu vyšších hodnot než varianty uvedené za lomítkem. Hodnoty byly posouzeny na základě Kruskal – Wallisova testu.

Na základě statistického vyhodnocení prostřednictvím Kruskal-Wallisova testu byly zaznamenány průkazné rozdíly mezi kontrolou a ostatními vzorky. Po 24 hodinách smáčení se projevil pokles rychlosti vývoje spor kmene Bba I101 smáčených v přípravku AT Plus a tím došlo k jeho statistickému odlišení od ostatních variant včetně kontroly. Vezmeme-li v úvahu koncentrace jednotlivých smáčedel v závislosti na délce namáčení, pak u smáčedel Istroekol a TW 80 nebyl prokazatelný vliv na spory Bba I101 mezi žádnou z variant, u smáčedla AT Plus nastal pokles po 24 hodinách u všech koncentrací.

Tabulka 65 Vizuální hodnocení rozpustnosti preparátu *B. bassiana* kmen Bba I101.

Množství preparátu	Koncentrace (%)	Rozpouštění	Hodnocení rozpuštěné suspenze
1g preparátu	1	**	Po protřepání zůstávají na stěnách shluky nesmočených konidií, na hladině se po odstání odděluje od suspenze tenká vrstva nerozpuštěných částecek.
	2	**	Několik nerozpuštěných shluků částecek ulpívá na stěnách, na hladině se netvoří souvislá vrstva, po obvodu nádoby se tvoří kruh.
	3	***	Po protřepání je na stěnách malé množství nerozpuštěných částecek, méně než v předchozí variantě, po obvodu nádoby se tvoří nesouvislý kruh.
	5	***	Po protřepání je na povrchu suspenze několik nerozpuštěných shluků, kruh po obvodu nádoby není patrný.
10g preparátu	2	***	Při rozpouštění 10 g preparátu ve 2% roztoku smáčedla došlo téměř k úplnému rozpuštění, na povrchu bylo patrné několik nerozpuštěných částic, netvořily souvislou vrstvu.
	3	***	Po smíchání 10g preparátu se 150 ml vody a 3ml smáčedla došlo k úplnému rozpuštění preparátu, v suspenzi nebyly žádné nerozpuštěné částice
100g preparátu	3	***	Po smíchání 100g preparátu s 300 ml 3% roztokem smáčedla došlo k téměř úplnému rozpuštění preparátu, na dně bylo patrné usazování malého množství nerozpuštěných částic.

***výborná rozpustnost preparátu, **dobrá rozpustnost

Při hodnocení se vyskytly odlišnosti mezi jednotlivými komerčně dostupnými smáčedly již při hodnocení rozpustnosti, které byly následně podpořeny mírně negativním vlivem na klíčivost spor a vývoj houby *B. bassiana*. Bylo zjištěno, že ani po 24 hodinách namáčení v 5% koncentraci smáčedla nedošlo k usmrcení více než 16% spor, tzn. že nejnižší zaznamenaná klíčivost byla 84% a to po použití přípravku AT Plus. Smáčedlo TW 80 vykazovalo na 2% agaru mírně lepší výsledky klíčivosti spor i rychlosti vývoje kmene Bba I101. Přípravek Istroekol vykázal lepší schopnost homogenizovat suspenzi.

5.4. Sledování kvalitativních a kvantitativních parametrů v souvislosti s produkční teplotou inokula houby *B. bassiana*

Hlavním cílem následující části práce bylo sledování vývoje kvalitativních a kvantitativních parametrů houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v závislosti na teplotě produkce. Pokusy byly prováděny v teplotách 10, 15, 20, 25 a 30°C. Průběh vývoje byl hodnocen na základě testu klíčivosti, se kterým souviselo i hodnocení vývoje houby pomocí indexové stupnice (GI). Dále na porovnávání parametrů středových kultur a testu virulence prováděném na larvách cílového organismu *T. molitor*. Do testů vstupovalo inokulum získané z rozmezí teplot 10-30°C podle postupu popsaného v metodice. U každé kategorie bylo dosaženo odlišných výsledků. V některých případech se projevil velký vliv teploty produkce inokula na následný projev v jednotlivých biotestech.

5.4.1. Vliv teploty produkce inokula na změnu kvalitativních a kvantitativních ukazatelů sledovaných v teplotě 10°C

Jednalo se o první sérii testů, které následně probíhaly v dalších 4 teplotách. Při použití všech produkčních teplot bylo dosaženo 100% klíčivosti, ovšem u spor získaných z vyšších teplot byl potřebný delší čas pro jejich aktivaci. Základní rozdíl byl v klíčivosti po 24 hodinách ($F_{(4,5)}=189,80$; $p=0,0000$). V tabulce 66 jsou uvedeny rozdíly v hodnotách a statistické rozdíly na základě Tukeyho testu. Zatímco u spor získaných z teplot 10 a 15°C bylo dosaženo klíčivosti >90% již po 48 hodinách, u ostatních teplot tomu bylo až po 96 hodinách. Rozdíly v rámci jednoho kontrolního dne vystihuje i statistické vyjádření ($F_{(4,5)}=241,95$; $p=0,0000$ po 48 hod, $F_{(4,5)}=22,389$; $p=0,0022$ po 72 hod a $F_{(4,5)}=16,849$; $p=0,0042$ po 96 hod). U variant založených s inokulem vyprodukovaným v teplotě 10 a 15°C (kromě 10°C po 24 hod), nebyly v průběhu biotestu nalezeny statisticky významné rozdíly.

Tabulka 66 Vliv teploty produkce inokula na průběh klíčivosti spor *B. bassiana* kmen Bba I101 v 10°C (klíčivost %±SE).

Délka biotestu(hod)	Teplota produkce inokula (°C)									
	10		15		20		25		30	
24	20,70±2,07	b	41,71±0,36	a	7,80±0,94	cd	3,97±0,43	d	13,82±0,60	c
48	91,46±0,25	a	99,00±1,00	a	32,28±1,72	b	43,16±3,33	b	40,88±2,26	b
72	100	a	99,52±0,48	a	72,60±3,37	b	76,25±4,58	b	79,90±2,45	b
96			100	a	94,26±0,99	b	94,37±0,51	b	97,32±1,09	ab
120					99,52±0,49	y	96,08±0,28	y	100	y
144					100	y	100	y		

a,b,c – hodnoty v jednom řádku označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha<0,05$

y hodnocení nebylo možno provést z důvodu malého rozptylu množiny

U varianty založené se sporami produkovanými v 15°C byl po 24 hodinách kultivace zjištěn statisticky průkazný rozdíl v rychlosti vývoje houby od všech ostatních variant (10°C: $p=0,00078$; 20, 25 a 30°C: $p=0,0000$). Rozdíly ve vývoji se téměř vyrovnaly až po 96 hodinách kultivace. Plné sporulace pak bylo dosaženo společně u variant založených se sporami z teplot 10, 15 a 25°C po 168 hodinách, z 20°C po 216 hodinách a u varianty z 30°C nebylo hodnoty GI 3 dosaženo vůbec.

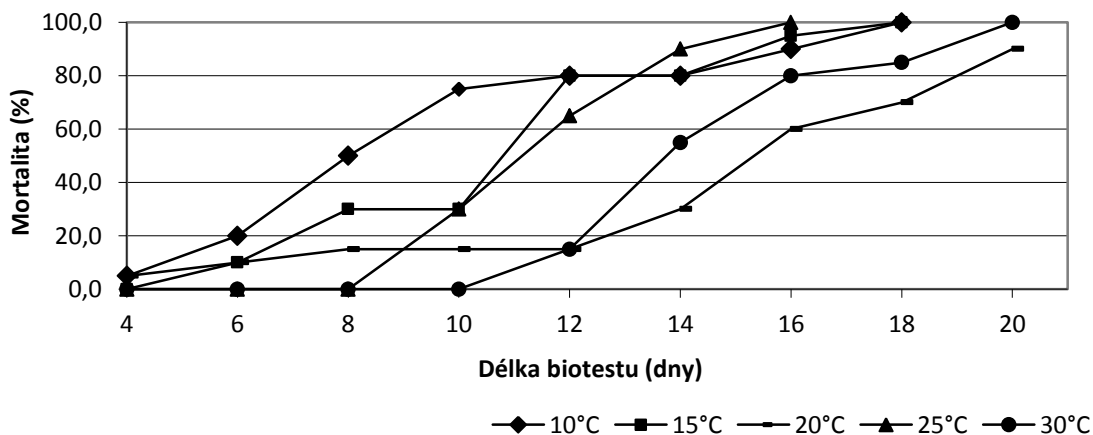
Tabulka 67 Vliv teploty produkce inokula na vývoj houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v teplotě 10°C (GI 24±SE).

Délka biotestu (hod)	Teplota produkce inokula (°C)				
	10	15	20	25	30
24	0,14±0,30	0,33±0,46	0,04±0,13	0,02±0,10	0,09±0,24
48	1,67±0,59	1,90±0,29	0,19±0,30	0,39±0,51	0,35±0,48
72	1,90±0,37	1,99±0,10	0,74±0,58	1,21±0,78	1,31±0,79
96	2,01±0,11	2,02±0,10	1,64±0,58	1,91±0,40	1,90±0,37
120	2,44±0,30	2,34±0,24	1,93±0,22	2,65±0,12	1,99±0,06
144	2,59±0,39	2,74±0,78	1,97±0,17	2,97±0,11	2,00±0,00
168	3,00	3,00	2,28±0,30	3,00	2,17±0,28
192			2,72±0,33		2,55±0,34
216			3,00		2,84±0,28

Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

Mortalita larev vykazovala poměrně jednoznačný trend. Nejvyšší hodnoty byly dosahovány při použití spor Bba I101 získaných z 10°C, následovala varianta vycházející z produkce spor získaných z 15°C. Nejpomalejší byl průběh mortality s použitím inokula z 20°C, kdy nedošlo k dosažení 100% mortality ani po 20 dnech biotestu.

Graf 22 Účinnost houby *B. bassiana* kmen Bba I101 produkované v různých teplotách na larvy *T. molitor* v teplotě 10°C.



*Mortalita v kontrolních variantách se pohybovala v rozmezí 0-5%.

Vývoj houby na larvách *T. molitor* byl nejrychlejší při použití spor vyprodukovaných v 10°C. Na mrtvých larvách se projevila plná sporulace po použití spor Bba I101 získaných v teplotách 10 a 15°C. To se ukázalo výrazně i při provedení statistické analýzy, která potvrdila odlišnost variant z těchto dvou produkčních teplot od všech ostatních, nikoliv však mezi sebou. U ostatních variant byl zaznamenán povrchový růst mycelia na hostitelských larvách, ne však jeho sporulace. Provedeme-li statistické zhodnocení průběhu vývoje po 6 dnech trvání biotestu zjistíme, že v případě použití spor z 10 a 15°C nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly. To ovšem neplatí u ostatních teplot, kde se varianta z 20°C

odlišovala od varianty z 25°C a 30°C ($p=0,0227$) ($H_{(4, N=100)}=22,5432$; $p=0,0002$). Pokud se podíváme zhruba do poloviny průběhu testu, na 12. den, tak dojde k většímu rozdělení výsledků ($H_{(4, N=100)}=32,6052$; $p=0,0000$), hlavně u variant založených s inokulem ze 30°C. Zde jsou průkazné rozdíly u všech teplot, s výjimkou 20°C (10°C: $p=0,0000$; 15°C: $p=0,0011$ a 25°C: $p=0,0211$).

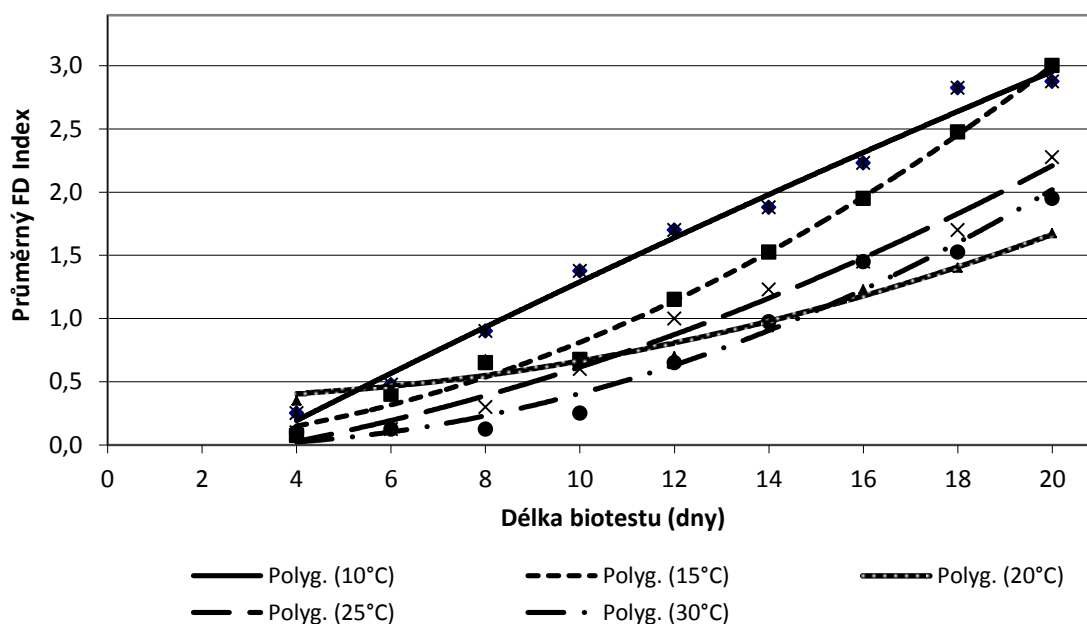
Tabulka 68 Vývoj houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v průběhu testu virulence na larvách *T. molitor* v teplotě 10°C (FDI±SE).

Délka biotestu (dny)	Teplota produkce inokula (°C)				
	10	15	20	25	30
4	0,25±0,30	0,08±0,18	0,35±0,29	0,10±0,21	0,10±0,21
6	0,48±0,47	0,40±0,31	0,48±0,34	0,13±0,22	0,13±0,22
8	0,90±0,55	0,65±0,52	0,68±0,47	0,31±0,26	0,13±0,22
10	1,38±0,78	0,68±0,49	0,68±0,47	0,60±0,50	0,25±0,26
12	1,70±1,02	1,15±0,33	0,70±0,50	1,00±0,46	0,65±1,13
14	1,88±1,01	1,53±0,70	0,93±0,52	1,23±0,60	0,98±0,68
16	2,23±0,82	1,95±0,72	1,23±0,72	1,45±0,28	1,45±0,65
18	2,83±0,37	2,48±0,66	1,40±0,79	1,70±0,30	1,53±0,66
20	2,88±0,32	3,00	1,68±0,71	2,28±0,55	1,95±0,48

Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

Průběh hodnot FDI byl následně vyjádřen pomocí polynomiálních regresních křivek. Z grafu 23 lze vyčíst, že nejrychlejšího průběhu bylo dosaženo u varianty založené se spory získanými z 10°C. Pomocí regresních rovnic vyplývajících z uvedeného grafu byl vypočten čas, za který dosáhl vývoj houby hodnoty 1,5. Tato hodnota je velmi důležitá, neboť podmiňuje nevratnou infekci patogenem.

Graf 23 Regresní křivky vyjadřující průběh virulence houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v teplotě 10°C, spory produkované v různých teplotách.



V případě průběhu biotestu v 10°C bylo nejrychlejšího průběhu infekce dosaženo s použitím spor získaných z 10°C. Rozdíl v délce intervalu od zahájení biotestu až po dosažení hodnoty FDI 1,5 je poměrně výrazný, vzhledem k tomu že u zmiňované teploty 10°C bylo potřeba 11,18 dnů, zatímco nejdelší interval byl 18,70 dnů v případě inokula pocházejícího z 20°C. Dále je patrná kratší doba, oproti ostatním variantám, i u varianty zakládané s inokulem vyprodukovaným v 15°C.

Tabulka 69 Vyjádření délky průběhu biotestu virulence houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvách *T. molitor* potřebné k dosažení hodnoty FDI 1,5.

Teplota produkce inokula (°C)	Polynomické regresní rovnice	R ²	d*
10	$y = -0,001x^2 + 0,1971x - 0,5791$	0,9887	11,18
15	$y = 0,0068x^2 + 0,0156x - 0,0208$	0,9943	13,85
20	$y = 0,0036x^2 - 0,0073x + 0,378$	0,9773	18,70
25	$y = 0,0038x^2 + 0,0443x - 0,2103$	0,9868	16,17
30	$y = 0,0061x^2 - 0,0215x + 0,012$	0,9735	17,48

*počet dnů potřebný pro dosažení hodnoty FDI 1,5
(R²)-koeficient spolehlivosti

Radiální růst středových kultur v teplotě 10°C byl hodnocen třemi základními parametry (průměr kultury, plocha kultury a výtěžnost). Průměr kultur se pohyboval v rozmezí 20,00 (inokulum z 10°C) až 25,50mm (inokulum z 15°C). Mezi každým jednotlivým rozměrem byly nalezeny statisticky významné rozdíly ($F_{(4,75)} = 243,22$; $p = 0,0000$). Od průměru kultur se samozřejmě odvíjí i plocha celé kultury. U této kategorie se hodnoty pohybovaly v rozmezí 314,16-510,71mm². Ačkoli byly průkazné rozdíly ve velikosti kultur, co se týkalo výtěžnosti spor/mm², nebyl mezi jednotlivými variantami nalezen statisticky významný rozdíl ($F_{4,5} = 1,6814$; $p = 0,2885$). V případě výtěžností z 1 mm² kultury se neprojevil vliv teploty produkce inokula na výslednou hodnotu. Množství získaných spor přepočtené na 1mm² se pohybovalo od 1,11x10⁶ (30°C) do 1,82x10⁶ (20°C).

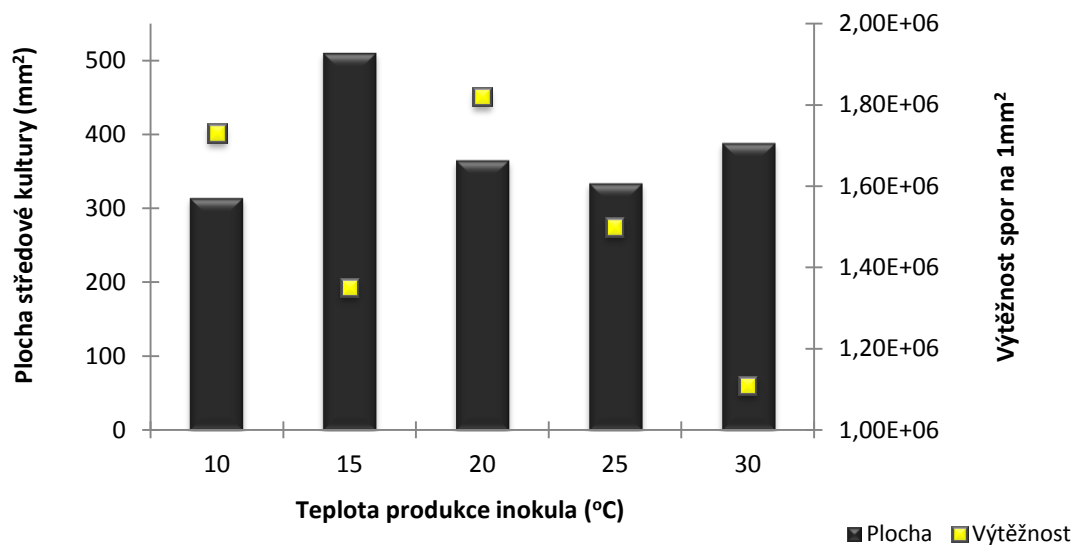
Tabulka 70 Porovnání radiálního růstu a produkčních parametrů středových kultur houby *B. bassiana* kmen Bba I101 po kultivaci v teplotě 10°C (21 dnů).

Teplota produkce (°C)	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)	Výtěžnost spor/mm ²
10	20,00±0,00 e	314,16±0,00	6,23±4,49 (1,73x10 ⁶) a
15	25,50±0,52 a	510,71±0,00	6,13±0,00 (1,35x10 ⁶) a
20	21,56±0,73 c	365,19±6,35	6,26±4,18 (1,82x10 ⁶) a
25	20,63±0,62 d	334,15±8,10	6,18±3,66 (1,50x10 ⁶) a
30	22,25±0,58 b	388,82±0,00	6,02±5,56 (1,11x10 ⁶) a

a,b,c – hodnoty v jednom sloupci označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

Na následujícím grafu je znázorněn vztah plochy středové kultury (mm²) a výtěžnosti spor z 1mm². V případě tohoto parametru byly zvýhodněny větší kultury, které v celkovém množství spor dosáhly vyšších absolutních hodnot. Hodnoty se pohybují od 5,02x10⁸ spor/kulturu u inokula získaného z 25°C po 6,91x10⁸ spor/kulturu u inokula vyprodukovaného v 15°C.

Graf 24 Plocha kultur a výtěžnost spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 po kultivaci v teplotě 10°C (21 dnů).



5.4.2. Vliv teploty produkce inokula na změnu kvalitativních a kvantitativních ukazatelů sledovaných v teplotě 15°C

V teplotě 15°C byl patrný vliv zvyšující se teploty, která ovlivňuje všechny prováděné testy. Je to patrné již na prvních testech, které se týkaly hodnocení klíčivosti. Při hodnocení po 24 hodinách bylo dosaženo 100% klíčivosti u spor získaných z 10°C a klíčivost vyšší než 90%, konkrétně 92,82% u varianty vycházející z inokula získaného z 15°C. U variant založených se sporami z teplot 20-30°C bylo k dosažení 100% klíčivosti potřeba 72 hodin. V rámci statistického hodnocení byly po 24 hodinách jednotlivé hodnoty prokazatelně odlišné $F_{(4,5)}=593,53$; $p=0,0000$. Po 48 hodinách se hodnoty vyrovnaly $F_{(4,5)}=2,0921$; $p=0,21944$).

Tabulka 71 Vliv teploty produkce inokula na klíčivosti spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v průběhu testu v teplotě 15°C (klíčivost % \pm SE).

Délka biotestu (hod)	Teplota produkce inokula (°C)				
	10	15	20	25	30
24	100 a	92,82 \pm 1,47 b	36,24 \pm 0,39 d	60,34 \pm 0,34 c	63,93 \pm 1,79 c
48		100 a	94,57 \pm 2,49 a	95,75 \pm 0,05 a	97,12 \pm 2,88 a
72			100 y	100 y	100 y

a,b,c – hodnoty v jednom řádku označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

y hodnocení nebylo možno provést z důvodu malého rozptylu množiny

U rychlosti vývoje houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na vodním agaru nebyly po 24 hodinách biotestu výrazné rozdíly mezi variantami založenými se sporami vyprodukovanými v 10 a 15°C, což potvrzuje i statistické vyhodnocení $H_{(4, n=1058)}=392,5462$; $p=0,0000$). Rovněž mezi sporami z produkčních teplot 25 a 30°C nebyl statisticky průkazný rozdíl. U všech ostatních variant byl tento rozdíl statisticky prokazatelný ($p=0,0000$). Po 48 hodinách biotestu se hodnoty u spor získaných z 20°C odlišovaly od všech ostatních (p v rozmezí 0,0000-0,0061) a hodnoty u spor získaných z 25°C se rovněž odlišovaly od všech ostatních s výjimkou hodnot získaných u spor z teploty 30°C $H_{(4, N=1046)}=172,2539$; $p=0,0000$.

Tabulka 72 Ovlivnění vývoje houby *B. bassiana* kmen Bba I101 teplotou produkce inokula, biotest probíhající v teplotě 15°C (GI 24±SE).

Délka (hod)	biotestu	Teplota produkce inokula (°C)				
		10	15	20	25	30
24		1,49±0,45	1,30±0,63	0,27±0,41	0,65±0,62	0,74±0,69
48		2,00±0,00	2,00±0,00	1,66±0,57	1,82±0,49	1,91±0,34
72		2,11±0,21	2,56±0,16	1,98±0,11	2,08±0,20	2,34±0,23
96		3,00	3,00	2,00±0,00	3,00	3,00
120				2,25±0,27		
144				3,00		

Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

Po 4 dnech biotestu prováděného na larvách *T. molitor* byly statisticky průkazné rozdíly mezi pokusy založenými s inokulem z teploty 10°C a ostatními teplotami ($H_{(4, N=100)}$; $p=0,0002$), s výjimkou varianty z teploty 25°C. U variant z těchto dvou teplot byly hodnoty téměř shodné (0,80 z 10°C a 0,78 z 25°C). Ostatní hodnoty byly výrazně nižší. Po 8 dnech biotestu bylo u variant z teplot 10 a 15°C dosaženo shodných hodnot (1,90), které se však výrazně odlišovaly od všech ostatních, což bylo opět potvrzeno i statistickým hodnocením ($H_{(4, N=100)}$; $p=0,0000$). V dalším průběhu biotestu se pak výrazněji odlišily hodnoty rychlosti vývoje u variant, ve kterých byly spor vyprodukované v teplotě 15°C (2,65 po 10 dnech, p v rozmezí 0,0000-0,0074) a další tendence dospěly k tomu, že po 14 dnech už se významně odlišovaly pouze výsledky získané u variant pocházejících z teploty 20°C ($p=0,0002$ -0,0043) ($H_{(4, N=100)}=44,7767$; $p=0,0000$). To platilo ještě po 16 dnech, po 18 dnech nebyly mezi variantami prokazatelné odlišnosti.

Tabulka 73 Vliv teploty produkce inokula na vývoj houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvách *T. molitor* v průběhu biotestů v 15°C (FDI±SE).

Délka biotestu (dny)	Teplota produkce inokula (°C)				
	10	15	20	25	30
4	0,80±0,47	0,33±0,24	0,28±0,26	0,78±0,55	0,23±0,26
6	1,75±0,50	1,23±0,57	0,45±0,48	0,98±0,48	0,58±0,52
8	1,90±0,53	1,90±0,50	0,83±0,41	1,15±0,40	0,73±0,60
10	2,20±0,66	2,65±0,63	1,28±0,80	1,78±0,41	1,78±0,91
12	3,00	2,75±0,47	1,63±0,92	2,80±0,44	2,10±0,74
14		3,00	1,90±0,88	2,88±0,32	2,73±0,47
16			2,25±0,77	3,00	3,00
18			2,68±0,49		
20			2,85±0,40		

Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

Při porovnání FDI u variant z produkčních teplot 10 a 20°C, u kterých byl rozdíl v rychlosti vývoje nejzřetelnější zjistíme, že se v dosažení hodnoty FDI 1,5 lišily o 5,36 dne (6,18 u 10°C a 11,54 u 20°C). Mortalita larev *T. molitor* se opět odvíjela od produkční teploty spor. Nejrychleji bylo 100% mrtvých larev dosaženo při použití inokula z 15°C (8 dnů). Nejdéle interval vyžadovaly varianty ze spor vyprodukovaných ve 20°C (16 dnů). V tomto případě tedy nebyly hodnoty mortality přímo ovlivněny teplotou produkce inokula. Ostatní varianty se pohybovaly v rozmezí 10 (25°C) až 12 dnů (10 a 30°C). V kontrolních vzorcích byla zaznamenaná mortalita maximálně 10%.

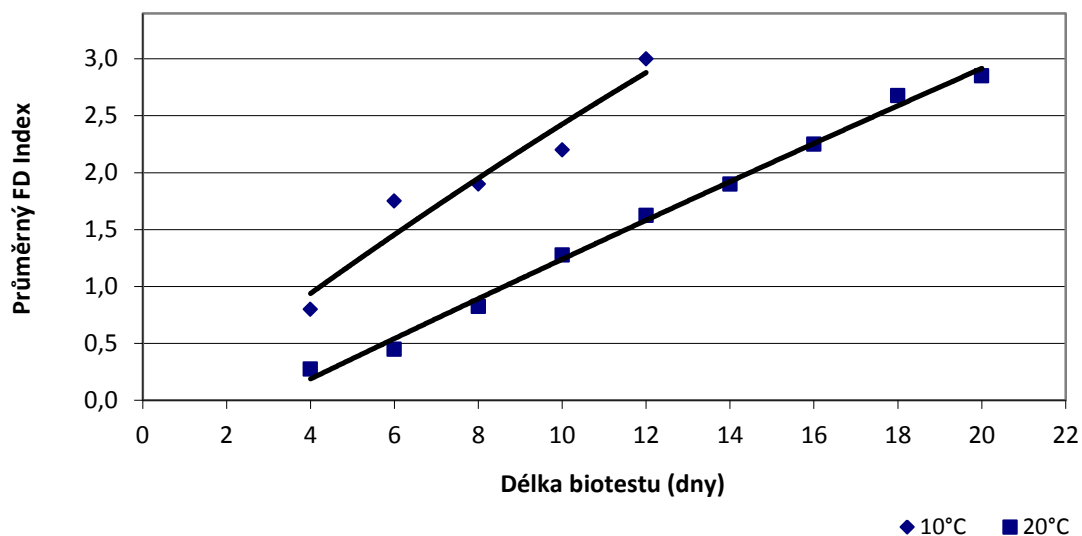
Tabulka 74 Vyjádření dosažení hodnoty vývoje (FDI 1,5) houby *B. bassiana* kmen Bba I101 pomocí regresních rovnic.

Teplota produkce inokula (°C)	Polynommické regresní rovnice	R ²	d*
10	$y = -0,0027x^2 + 0,2854x - 0,16$	0,9311	6,18
15	$y = -0,0248x^2 + 0,7131x - 2,1471$	0,9935	6,65
20	$y = -0,0005x^2 + 0,1817x - 0,5302$	0,9948	11,54
25	$y = 0,0038x^2 + 0,1882x - 0,2086$	0,8500	7,84
30	$y = 0,0016x^2 + 0,2174x - 0,7731$	0,9712	9,76

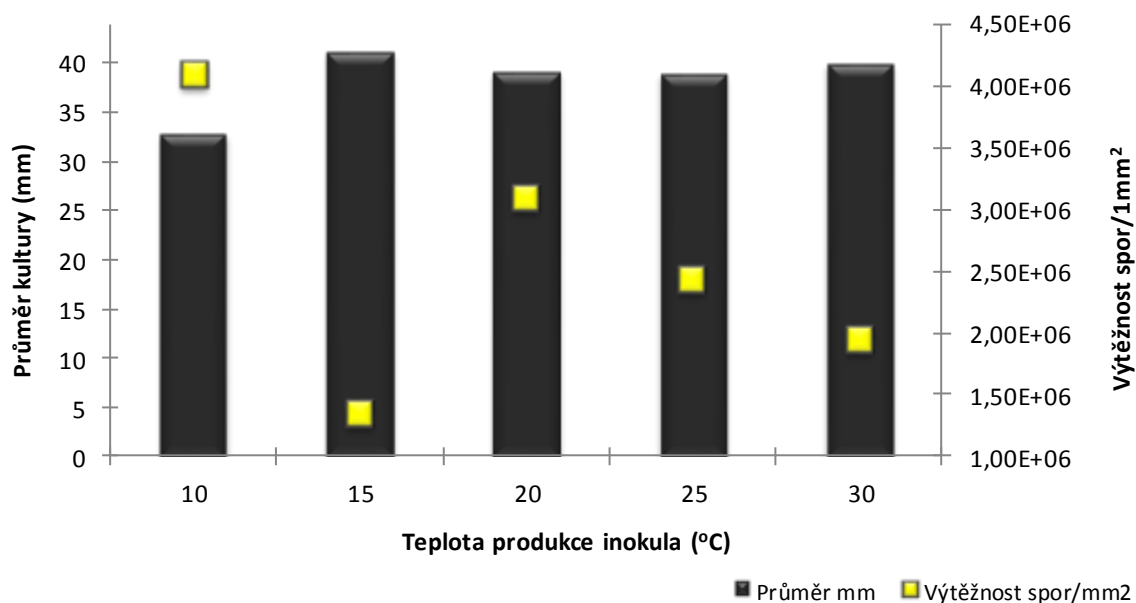
*počet dnů potřebný pro dosažení hodnoty FDI 1,5

(R²)-koeficient spolehlivosti

Graf 25 Porovnání průběhu vývoje houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvách *T. molitor*, znázornění tendence vývoje pomocí polynommické regresní křivky.



Graf 26 Závislost průměru kultury a výtěžností spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 při kultivaci v 15°C.



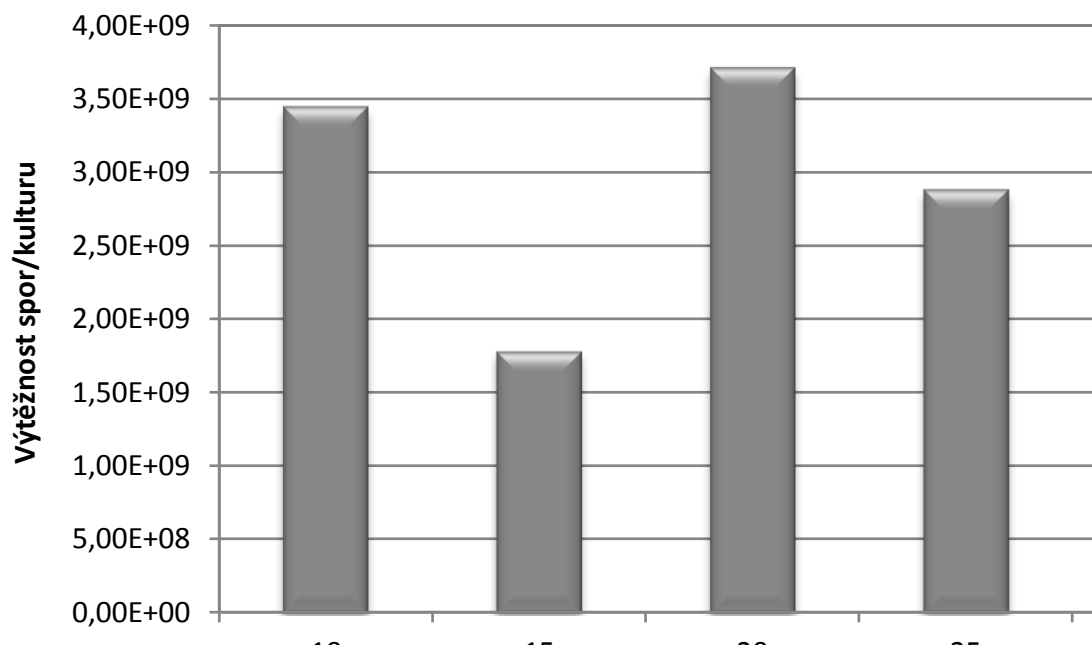
Tabulka 75 Porovnání vlivu teploty produkce inokula na růstové a výnosové parametry středových kultur houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v teplotě 15°C.

Teplota produkce (°C)	Průměr kultury (mm)		Plocha kultury (mm ²)	Výtěžnost spor/mm ²	
10	32,75±0,68	c	842,40±6,43	6,61±4,83 (4,09x10 ⁶)	a
15	41,13±0,96	a	1328,62±40,37	6,13±4,99 (1,34x10 ⁶)	c
20	39,07±1,07	b	1201,02±14,08	6,49±5,57 (3,09x10 ⁶)	ab
25	38,94±1,24	b	1190,79±11,47	6,38±5,34 (2,42x10 ⁶)	ab
30	39,93±1,90	ab	1258,27±40,60	6,29±5,47 (1,95x10 ⁶)	bc

a,b,c – hodnoty v jednom sloupci označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

Výnosové parametry byly pozitivně ovlivněny produkcí spor v teplotě 10°C, kde byl průměr kultury a tedy i její plocha v porovnání s ostatními variantami nejmenší ($F_{(4,71)}=113,10$; $p=0,0000$), ovšem výtěžnost získaná z 1mm² byla nejvyšší a dosáhla hodnoty $4,09 \times 10^6$ spor. Opačný trend byl zjištěn u spor vyprodukovaných v teplotě 15°C, V této variantě bylo dosaženo největší plochy kultury, avšak nejnižšího výnosu spor/mm², což bylo prokázáno i statisticky ($F_{(4,5)}=17,843$; $p=0,0037$). U všech variant se jednalo o rozptyl v rámci jednoho řádu, hodnoty se pohybovaly v rozmezí $1,34-4,09 \times 10^6$ spor/mm².

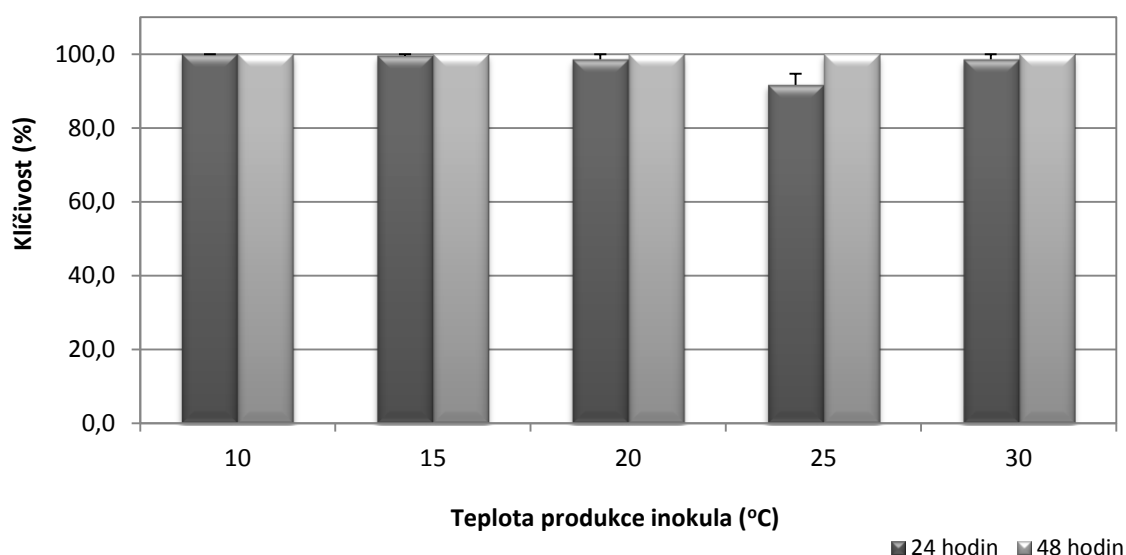
Graf 27 Vliv teploty produkce na výtěžnost spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 kultivovaných v 15°C.



5.4.3. Vliv teploty produkce inokula na změnu kvalitativních a kvantitativních ukazatelů sledovaných v teplotě 20°C

Biotesty v této teplotě probíhaly většinou rychleji a získané výnosové hodnoty byly v některých případech nejvyšší ze všech variant. Došlo k výraznému ovlivnění kvalitativních a kvantitativních parametrů spor Bba I101 v závislosti na produkční teplotě spor. U klíčivosti bylo 100% hodnoty dosaženo již po 24 hodinách a to u varianty zakládané s inokulem získaným v 10°C. U ostatních variant byla potřebná dvojnásobná doba k dosažení stejného výsledku. Ovšem i zde byla již po 24 hodinách nejnižší hodnota 91,65% u teploty 25°C, ostatní se pohybovaly v rozmezí 98,57-99,56% (graf 37).

Graf 28 Vliv teploty produkce inokula na klíčivost spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v průběhu kultivace v teplotě 20°C.



Vývoj houby na 2% agaru byl poměrně rychlý, nejnižší počáteční hodnoty přesáhly hranici GI 1,5. Nejrychlejší vývoj byl, stejně jako tomu bylo u klíčivosti, u spor produkovaných v 10°C. Podle statistických parametrů se po 24 hodinách významně odlišovaly hodnoty získané u variant zakládaných z inokulem z teplot 20 a 25°C od všech ostatních ($p=0,0000-0,0134$) ($H_{(4, N=1066)}$; $p=0,0000$). Po 48 hodinách byl významný rozdíl mezi všemi zjištěnými hodnotami $H_{(4, N=1008)}=750$; $p=0,0000$).

Tabulka 76 Ovlivnění vývoje houby *B. bassiana* kmen Bba I101 teplotou produkce inokula, biotesty probíhaly v teplotě 20°C (GI 24±SE).

Délka biotestu (hod)	Teplota produkce inokula (°C)				
	10	15	20	25	30
24	1,94±0,24	1,96±0,19	1,60±0,49	1,64±0,64	1,93±0,29
48	3,00	2,50±0,00	2,01±0,07	2,61±0,21	2,65±0,23
72		3,00	3,00	3,00	3,00

Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

V teplotě 20°C se výrazně zkrátila doba potřebná pro celý vývojový cyklus houby *B. bassiana* na larvách *T. molitor*. V rámci biotestů bylo dosaženo plné sporulace u všech variant v rozmezí 10 až 14 dnů. U nízkých produkčních teplot bylo dosaženo hodnoty FDI 3 (plná sporulace) po 10 dnech. Nejdelší dobu potřebovala houba k plné sporulaci u varianty založené se spory získanými z 25°C. Rychlejší vývojový trend dokazují i výsledky statistického hodnocení, ze kterých je patrné, že po 4 dnech biotestu byly hodnoty u houby vyprodukované v 10°C významně odlišné od všech ostatních ($H_{(4, N=100)}=34,7765$; $p=0,0000$). Po 6 dnech se srovnaly hodnoty u variant ze spor získaných z 10 a 15°C a po produkci spor v 15°C byla zjištěna odlišnost od produkce ve 25 a 30°C ($p=0,0011$ a $p=0,0095$). Ostatní hodnoty zůstaly stále bez výrazných rozdílů ($H_{(4, N=100)}$; $p=0,0000$). V následujících dnech průběhu biotestu se hodnoty začaly vzájemně přibližovat, po 8 dnech se odlišovaly již pouze spory pocházející z teploty 15 a 30°C ($p=0,0408$) a po 10 dnech nebyl mezi jednotlivými variantami žádný statisticky prokazatelný rozdíl.

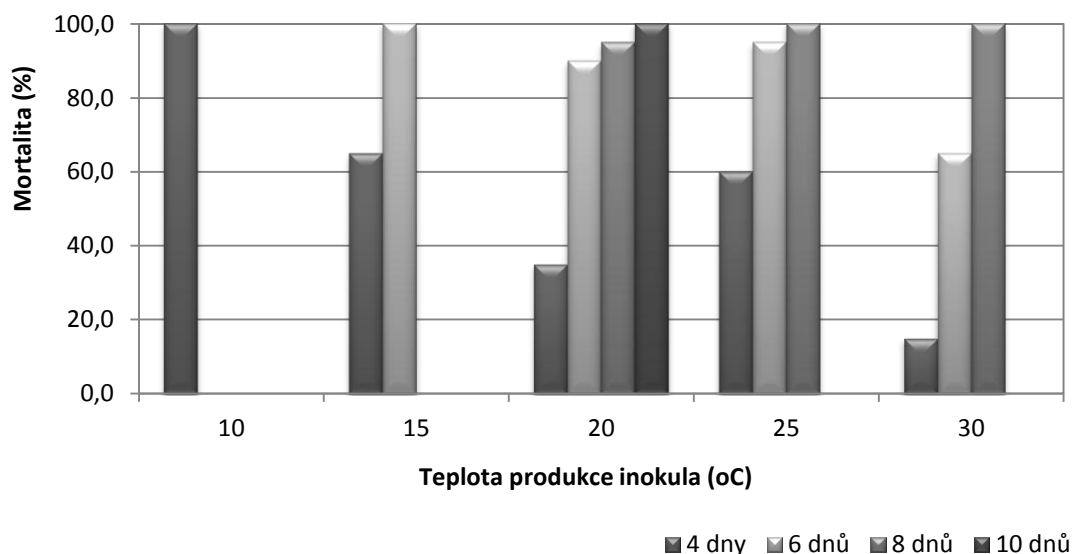
Tabulka 77 Vliv teploty produkce spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na jejich následný vývoj na larvách *T. molitor* v teplotě 20°C (FDI±SE).

Délka biotestu (dny)	Teplota produkce inokula (°C)				
	10	15	20	25	30
4	1,63±0,46	1,08±0,47	0,88±0,60	0,83±0,41	0,53±0,50
6	2,83±0,29	2,28±0,68	1,83±0,65	1,33±0,34	1,35±0,76
8	2,90±0,21	2,90±0,26	2,50±0,58	2,53±0,53	2,33±0,71
10	3,00	3,00	2,95±0,15	2,80±0,30	2,88±0,22
12			3,00	2,93±0,18	3,00
14				3,00	

Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

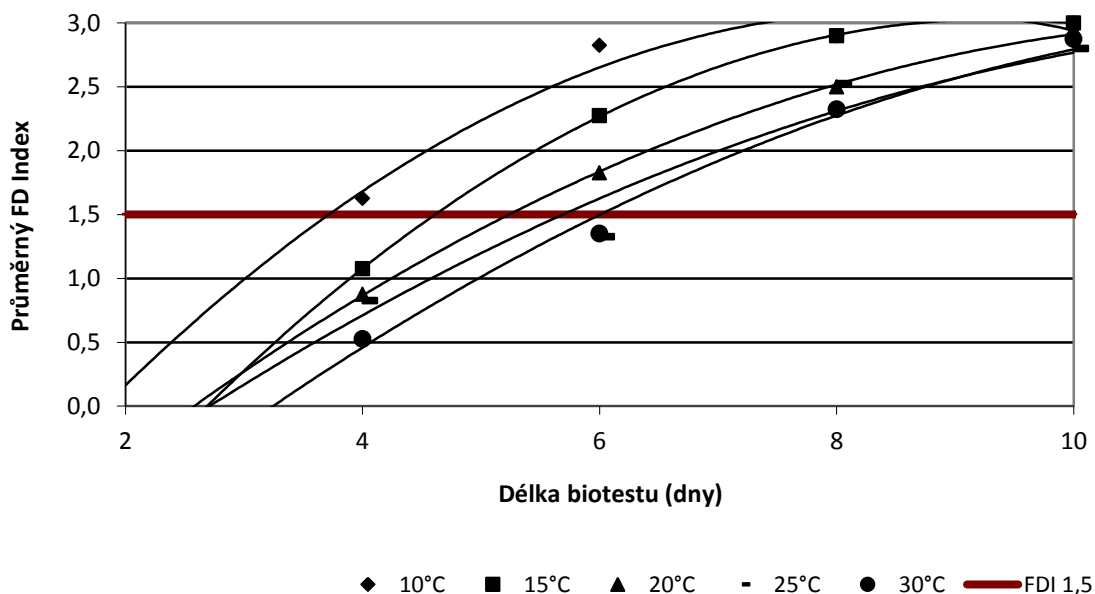
Rychlejší nástup infekce se projevil i vyšší mortalitou larev *T. molitor*, která byla po použití spor získaných z 10 a 15°C 100% již po 4, respektive 6 dnech. Nejdelší interval se projevil po produkci spor ve 20°C, kdy se doba prodloužila na 10 dnů, ovšem i zde byla již po 6 dnech mortalita vyšší než 90%. V kontrolních variantách se projevila nízká mortalita, která dosahovala maximálně 10% mrtvých larev potměníka moučného.

Graf 29 Vliv různé teploty produkce spor na mortalitu larev *T. molitor* vyvolanou houbou *B. bassiana* kmen Bba I101 v teplotě 20°C.



Délka časového intervalu nutná pro dosažení hodnoty FDI 1,5 v porovnání s předchozími testy ztlačně poklesla. Nejkratší vypočtený čas byl 3,72 dnů zjištěn po použití spor získaných v 10°C, nejdelší pak 6,01 dne po použití spor získaných ve 30°C. V případě biotestů probíhajících ve 20°C byla vidět tendence postupného narůstání času nezbytného pro zahájení saprotrofní fáze vývojového cyklu. Na grafu 30 je pomocí trendových křivek (polynomická regrese) znázorněn průběh vývojového cyklu. Tyto křivky postupně protínají hodnotu označující FDI 1,5 ve vzestupném pořadí teplot produkce inokula od 10 do 30°C.

Graf 30 Průběh vývoje houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvách *T. molitor* vyjádřený pomocí regresních křivek, v různých časech protínají hodnotu FDI 1,5.



Při vyjádření doby potřebné pro dosažení hodnoty FDI 1,5 pomocí polynomické regrese byl zjištěn vysoký koeficientu spolehlivosti, který se pohyboval minimálně na hodnotě 0,9471.

Tabulka 78 Vyjádření doby potřebné pro zahájení saprotrofní fáze vývojového cyklu spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v teplotě 20°C.

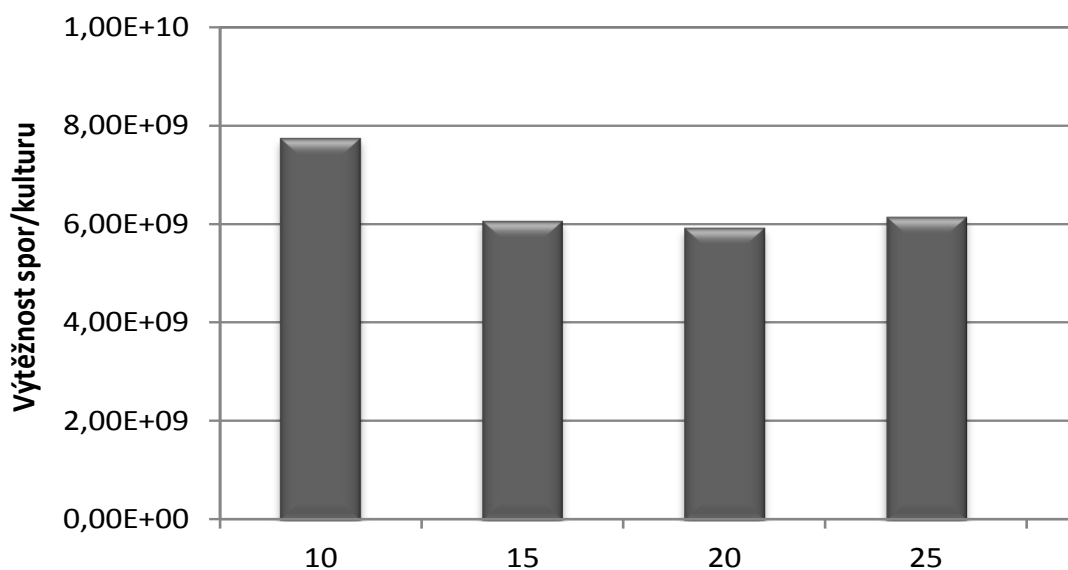
Teplota produkce inokula (°C)	Polynomické regresní rovnice	R ²	d*
10	$y = -0,0688x^2 + 1,1725x - 1,9075$	0,9471	3,72
15	$y = -0,0687x^2 + 1,2825x - 2,9525$	0,9999	4,46
20	$y = -0,0362x^2 + 0,8473x - 1,945$	0,9993	5,24
25	$y = -0,0287x^2 + 0,7442x - 1,8061$	0,9638	5,69
30	$y = -0,0326x^2 + 0,8448x - 2,3985$	0,9915	6,01

*počet dnů potřebný pro dosažení hodnoty FDI 1,5
(R²)-koeficient spolehlivosti

Tabulka 79 Zhodnocení vlivu teploty produkce na kvantitativní parametry středových kultur kultivovaných v teplotě 20°C.

Teplota produkce (°C)	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)	Výtěžnost spor/mm ²
10	43,43±0,94 c	1479,10±15,62	6,72±5,45 (5,23x10 ⁶) a
15	45,25±0,77 b	1608,16±8,88	6,58±5,30 (3,77x10 ⁶) a
20	42,88±1,86 c	1444,21±50,51	6,61±5,89 (4,11x10 ⁶) a
25	36,94±0,93 d	1071,61±10,88	6,76±5,27 (5,73x10 ⁶) a
30	50,94±1,48 a	2038,34±65,01	6,33±5,11 (2,11x10 ⁶) b

a,b,c – hodnoty v jednom sloupci označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukey HSD testu, $\alpha < 0,05$

Graf 31 Výtěžnost spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v závislosti na teplotě produkce inokula (testy ve 20°C).

Ze spor vyprodukovaných v teplotách 10 a 20°C vznikly prakticky stejně velké kultury, u ostatních variant byly nalezeny statisticky průkazné rozdíly ($F_{(4, 73)}=249,99$; $p=0,0000$). Přesto nejmenšího průměru dosáhly kultury založené s inokulem získaným z 15°C (36,94mm), nejvyššího pak kultury vzniklé s použitím spor ze 30°C (50,94mm). Nicméně je třeba zdůraznit, že ačkoli ze spor vyprodukovaných ve 25°C vznikla kultura o nejmenší ploše, bylo u této varianty dosaženo nejvyšší výtěžnosti spor na 1mm² (5,73x10⁶). Získané hodnoty výtěžností z jednotlivých teplot produkce sice dosáhly statisticky průkazné odlišnosti ($F_{(4, 5)}=16,473$; $p=0,0044$), ta se však týkala pouze produkční teploty 30°C. Hodnoty se pohybovaly v rozmezí 2,11-5,73x10⁶ spor/mm². Velikosti středových kultur v rámci jedné produkční teploty byly poměrně vyrovnané. V průběhu měření nebyly zaznamenány výrazné rozdíly mezi velikostmi ploch kultur. Největší plochy, u kterých bylo zaznamenáno nejnížší množství vyprodukovaných spor, byly u kultur vzniklých při použití suspenze spor získané ze 30°C.

5.4.4. Vliv teploty produkce inokula na změnu kvalitativních a kvantitativních ukazatelů sledovaných v teplotě 25°C

Testy prováděné v teplotě 25°C měly v některých fázích velmi podobný průběh jako tomu bylo ve 20°C. Obdobný průběh se týkal především testu klíčivosti, mezi jejímiž hodnotami nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly. Nejnižší hodnota po 24 hodinách biotestu byla zjištěna po použití spor z produkční teploty 25°C (96,76%), ostatní hodnoty se pohybovaly nad hranicí 99%.

Co se týká vývoje houby v rámci tohoto biotestu lze říci, že byl rychlejší než v předchozích případech. Plné sporulace mycelia bylo dosaženo již po 48 hodinách kultivace u všech testovaných produkčních teplot a nebyly zde zaznamenány výrazné rozdíly ani mezi jednotlivými variantami po 24 hodinách biotestu. Hodnoty se nacházely v rozpětí 1,88-2,00 ($H_{(4, N=1049)}=50,90188$ $p=0,0000$).

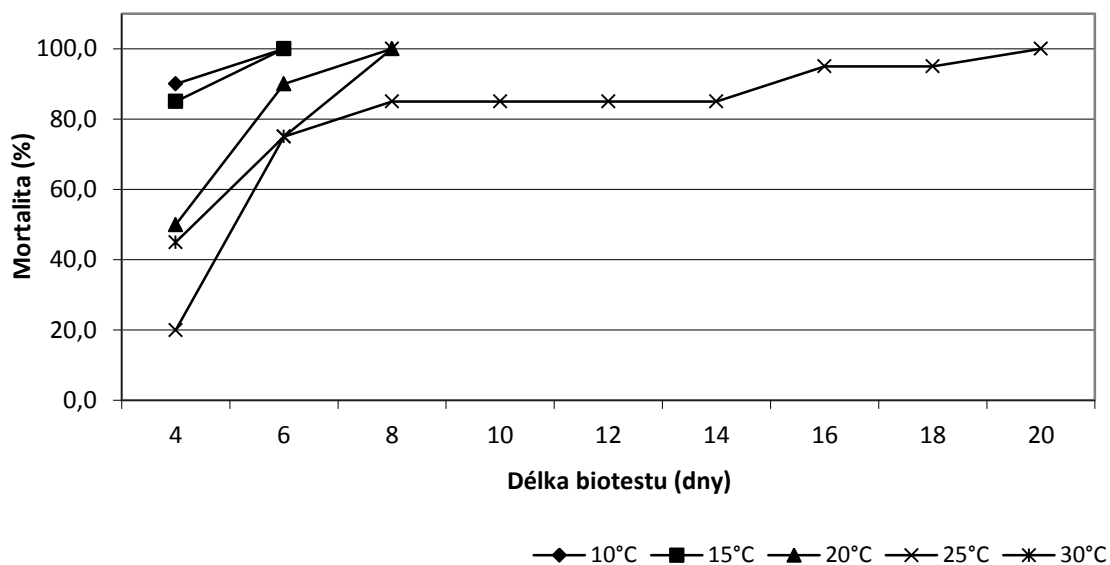
Tabulka 80 Vývoj houby *B. bassiana* kmen Bba I101 ovlivněný teplotou produkce, testy hodnocené v teplotě 25°C (GI 24±SE).

Délka biotestu (hod)	Teplota produkce inokula (°C)				
	10	15	20	25	30
24	2,00±0,00	1,98±0,11	1,97±0,14	1,88±0,40	1,99±0,10
48	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00

Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

Mortalita larev hostitelského organismu vyvolaná spory kmene Bba I101 byla vysoká, již po 6 dnech biotestu dosáhla hranice 100% s použitím spor vyprodukovaných v teplotách 10 a 15°C, u spor získaných z teplot 20 a 30°C bylo této hodnoty dosaženo po 8 dnech biotestu. Výjimku zde tvořily pouze spory získané z 25°C. I v tomto případě se ale hodnoty pohybovaly nad hranicí 85% mortality po 8 dnech biotestu.

Graf 32 Vliv teploty produkce inokula na účinnost houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvy *T. molitor* v teplotě 25°C.



Při hodnocení vývoje houby *B. bassiana* na larvách *T. molitor* byl zjištěn rychlý průběh. Celý vývojový cyklus byl ukončen plnou sporulací mycelia po 10 resp. 12 dnech biotestu, pouze u spor získaných z teploty 25°C byl vývoj pomalejší. Přesto, že bylo dosaženo zahájení růstu kompaktního mycelia na povrchu těl larev, nebylo v této variantě dosaženo plné sporulace. V průběhu 20 dnů, po které trval biotest došlo k objevení spor na myceliu pouze na několika hodnocených larvách. Pro tento jev bohužel nemáme vysvětlení.

Na počátku biotestu byl vývoj houby po produkci v 10 a 15°C prokazatelně odlišný od variant vyprodukovaných v teplotách 25 a 30°C ($H_{(4, N=100)}=37,3293$; $p=0,0000$). Po 10 dnech se hodnoty vyrovnaly a zůstala pouze odlišnost mezi variantami získanými z 25°C a ostatními variantami $H_{(4, N=100)}=78,7603$; $p=0,0000$.

Tabulka 81 Vliv teploty produkce inokula na vývoj houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvách *T. molitor* při kultivaci v teplotě 25°C (FDI±SE).

Délka biotestu (dny)	Teplota produkce inokula (°C)				
	10	15	20	25	30
4	1,45±0,58	1,45±0,46	1,05±0,69	0,40±0,38	0,75±0,57
6	2,65±0,37	2,60±0,45	2,00±0,76	1,00±0,46	1,65±0,80
8	2,85±0,24	2,93±0,24	2,53±0,60	1,65±0,78	2,35±0,59
10	3,00	3,00	2,95±0,15	1,68±0,61	2,88±0,22
12			3,00	1,73±0,72	3,00
14				1,80±0,52	
16				1,80±0,52	
18				1,85±0,54	
20				1,90±0,39	

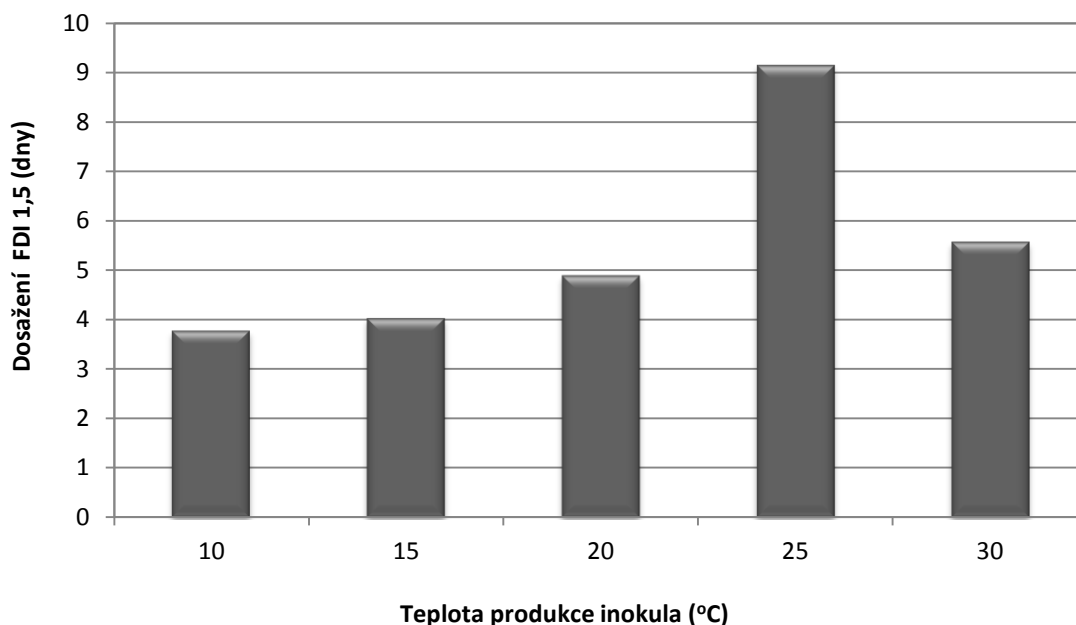
Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

S pomalejším vývojem houby *B. bassiana* kmen Bba I101 získané z 25°C samozřejmě souvisí i prodloužení doby, ve které bylo dosaženo klíčové hodnoty FDI 1,5. K oddálení tohoto termínu došlo v průměru téměř o dvojnásobek doby v porovnání s variantami z ostatních teplot. Jeho hodnota byla 9,15 dne. U ostatních variant bylo této hodnoty dosaženo ve velmi krátkém časovém úseku, nejkratší byl 3,78 dnů u variant získaných z teploty 10°C, ostatní se pohybovaly v rozmezí 4,03-5,58 dne. Při výpočtu těchto hodnot bylo dosaženo vysoké spolehlivosti výsledků, koeficient se pohyboval nad hranicí 0,90 což znamená, že hodnoty jsou velmi přesné.

Tabulka 82 Vliv teploty produkce inokula na dobu potřebnou pro dosažení hodnoty vývoje houby *B. bassiana* kmen Bba I101 1,5 v teplotě 25°C.

Teplota produkce inokula (°C)	Polynomické regresní rovnice	R ²	d*
10	$y=-0,0656x^2+1,1613x-2,0975$	0,9699	3,78
15	$y=-0,0672x^2+1,1894x-2,2038$	0,9893	4,03
20	$y=-0,0339x^2+0,7854x-1,535$	0,9979	4,90
25	$y=-0,0098x^2+0,3102x-0,5182$	0,9058	9,15
30	$y=-0,0308x^2+0,7791x-1,89$	0,9986	5,58

*počet dnů potřebný pro dosažení hodnoty FDI 1,5
(R²)-koeficient spolehlivosti

Graf 33 Doba potřebná pro dosažení hodnoty vývoje houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvách *T. molitor* 1,5.

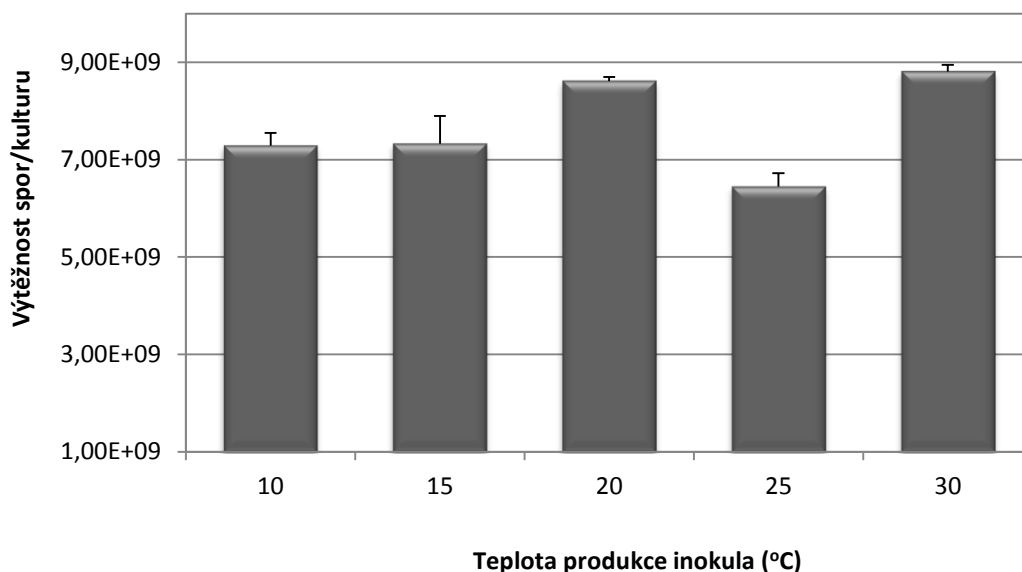
Tabulka 83 Produkční parametry středových kultur získané v teplotě 25°C z inokula vyprodukovaného v různých teplotách.

Teplota produkce (°C)	Průměr kultury (mm)	Plocha kultury (mm ²)	Výtěžnost spor/mm ²
10	44,25±0,77	1537,91±17,38	6,68±5,07 (4,74x10 ⁶)
15	45,31±0,48	1612,63±13,35	6,66±5,50 (4,54x10 ⁶)
20	45,64±2,10	1642,68±43,40	6,72±5,28 (5,25x10 ⁶)
25	40,13±2,28	1264,95±47,27	6,71±4,43 (5,10x10 ⁶)
30	54,00±1,96	2283,43±49,40	6,59±5,16 (3,86x10 ⁶)

a,b,c – hodnoty v jednom sloupci označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukey HSD testu, $\alpha < 0,05$

V radiálním růstu středových kultur byly zjištěny výrazné rozdíly oproti předchozím testům. Průměry středových kultur dosahovaly nejvyšších hodnot ze všech hodnocených variant. Největší průměr byl zaznamenán po použití spor získaných z teploty 30°C, nejnižší naopak po použití spor vyprodukovaných v teplotě 25°C. Mezi hodnotami byly statisticky průkazné rozdíly $F_{(4,71)}=134,67$; $p=0,0000$. Z největší plochy bylo získáno významně nižší množství spor na 1mm² než tomu bylo u nejmenší kultury. U většiny případů je toto množství kompenzováno právě velikostí kultury. V tomto případě je patrné, že ačkoli u variant založených se spory získanými z teploty 30°C bylo množství spor na 1mm² kultury nízké, z hlediska absolutní výtěžnosti přepočtené na plochu celé kultury bylo dosaženo nejvyšší hodnoty (8,81x10⁹ spor/kulturu). Výtěžnosti spor na 1mm² u variant založených se spory pocházejícími z 20 a 25°C se prakticky vůbec nelišily. Hodnoty získané u variant ze spor vyprodukovaných v 10 a 15°C vykazovaly částečnou statistickou odlišnost $F_{(4,5)}=8,7944$; $p=0,0174$.

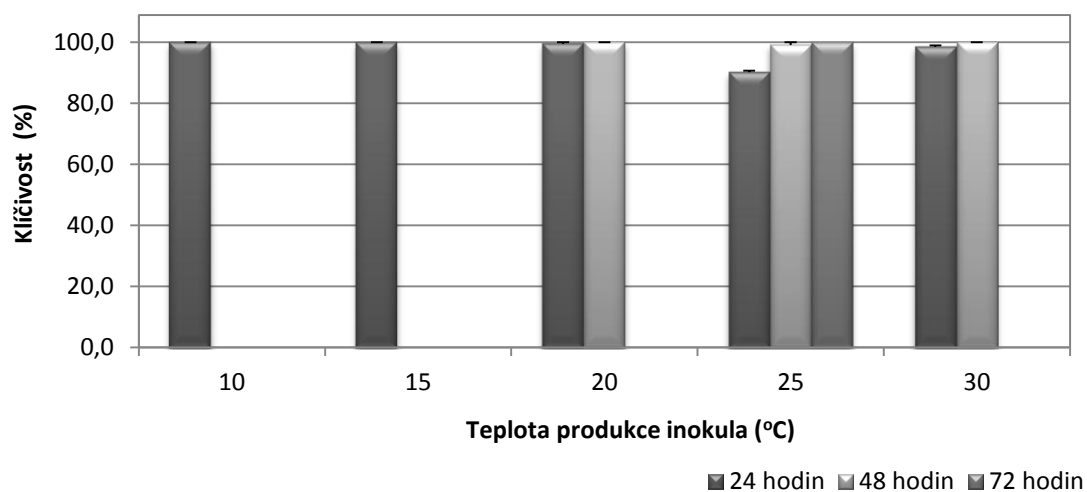
Graf 34 Výťažnost spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v teplotě 25°C, inokulum získané v různých teplotách.



5.4.5. Vliv teploty produkce inokula na změnu kvalitativních a kvantitativních ukazatelů sledovaných v teplotě 30°C

V teplotě 30°C nastala plná sporulace u všech variant již po 72 hodinách. Vyhodnocování klíčivosti po 24 hodinách ukázalo, že ve 2 variantách již byly vyklíčeny všechny spory (10 a 15°C), v dalších pozorováních, po 48 hodinách přibyly další 2 varianty (20 a 30°C) a nakonec u spor získaných z teploty 25°C byla zjištěna 100% klíčivost po 72 hodinách testu. U poslední jmenované varianty byla však klíčivost po 48 hodinách již 99,13%, varianty tedy neprojevily výraznou odlišnost.

Graf 35 Vliv teploty produkce inokula na klíčivost spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v průběhu testu ve 30°C.



Až na odchylku u varianty založené ze spor získaných z 25°C (1,32) byl i vývoj houby *B. bassiana* na vodním agaru velmi vyrovnaný. Hodnoty se pohybovaly v rozmezí 1,81-1,96 po 24 hodinách ($H_{(4,N=1074)}=241,5402$; $p=0,000$). Test byl ukončen po 72 hodinách kdy všechny varianty dosáhly plné sporulace mycelia. Vitalita spor zůstala i přes vyšší teplotu neovlivněna. V případě vývoje houby nebyl rovněž zaznamenán ani vliv teploty produkce spor na jejich následný růst a vývoj v teplotě 30°C.

Tabulka 84 Vliv teploty produkce inokula na vývoj houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v teplotě 30°C (GI 24±SE).

Délka biotestu (hod)	Teplota produkce inokula (°C)				
	10	15	20	25	30
24	1,81±0,38	1,88±0,27	1,96±0,16	1,32±0,69	1,87±0,33
48	2,12±0,21	2,02±0,10	2,12±0,25	2,12±0,32	2,00±0,03
72	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00

Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

Při hodnocení vývoje kmene Bba I101 na larvách *T. molitor* byly zvýhodněny varianty založené ze spor z nižší teploty produkce oproti variantám z vyšších teplot. Z počátku průběhu biotestu byly hodnoty vyrovnané a nebyl mezi nimi nalezen prokazatelný rozdíl ve prospěch žádné z teplot. Po 8 dnech se projeví první rozdíly a to mezi variantami pocházejícími z teplot 20 a 25°C ($p=0,0370$) ($H_{(4,N=100)}=16,9041$; $p=0,0020$). Po 10 dnech se k tomuto rozdílu přidaly další odlišnosti u spor vyprodukovaných v teplotě 25°C, které zůstaly na stejné úrovni jako spory ze 30°C a od všech ostatních se významně odlišovaly ($H_{(4,N=100)}=29,1979$; $p=0,0000$). V dalším pozorování se hodnoty sjednotily a rychlejší průběh vývoje oproti variantám získaným z 25 a 30°C vykazovala pouze varianta založená se sporami vyprodukovanými v teplotě 10°C, což platilo až do konce biotestu. V závěru testu se odlišily navíc ještě hodnoty získané po použití inokula z 20°C ($H_{(4,N=100)}=23,9647$; $p=0,0001$).

Tabulka 85 Průběh vývoje houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvách *T. molitor* v teplotě 30°C s použitím inokula vyprodukovaného v různých teplotách (FDI±SE).

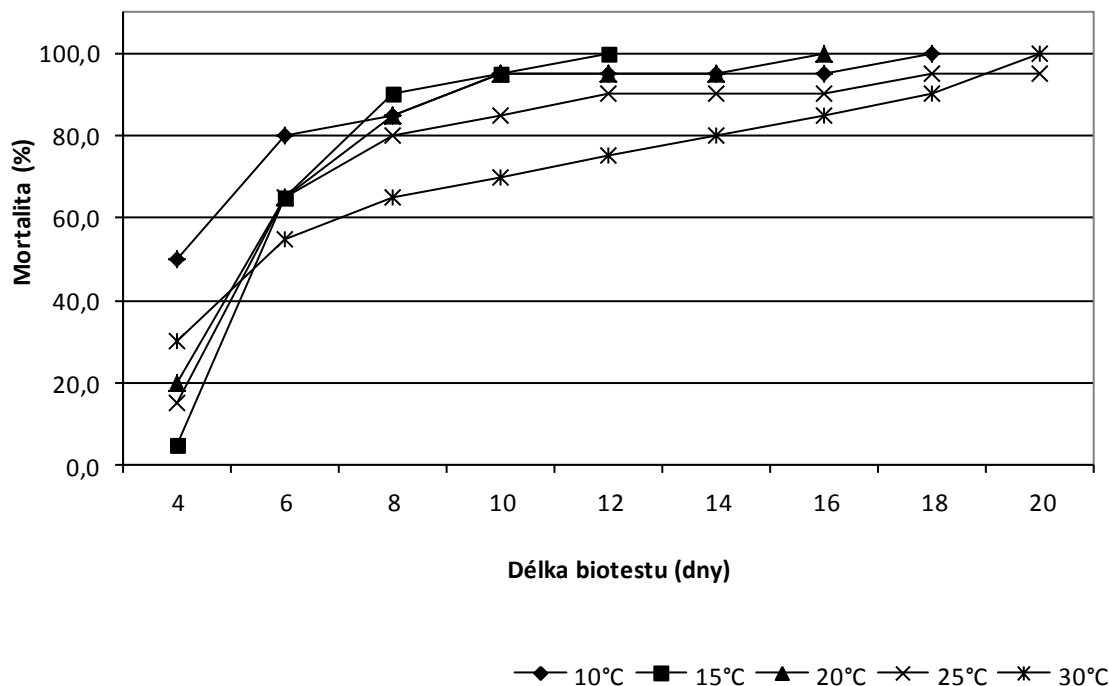
Délka biotestu (dny)	Teplota produkce inokula (°C)				
	10	15	20	25	30
4	0,65±0,40	0,48±0,20	0,70±0,64	0,40±0,35	0,48±0,53
6	1,23±0,55	0,88±0,46	1,10±0,62	0,80±0,38	0,93±0,59
8	1,33±0,59	1,33±0,47	1,50±0,69	0,95±0,28	0,93±0,59
10	1,75±0,77	1,60±0,38	1,90±0,64	0,98±0,26	1,13±0,70
12	2,28±0,83	1,63±0,39	1,93±0,63	1,35±0,49	1,35±0,71
14	2,30±0,80	1,78±0,60	1,95±0,61	1,35±0,49	1,35±0,71
16	2,30±0,80	1,93±0,71	1,98±0,55	1,38±0,46	1,40±0,62
18	2,30±0,80	2,03±0,70	1,98±0,55	1,45±0,46	1,43±0,59
20	2,30±0,80	2,13±0,65	2,20±0,70	1,50±0,51	1,50±0,46

Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

Průběh mortality byl pozvolnější než tomu bylo u předchozích kultivačních teplot. Doba potřebná pro dosažení 100% mortality se prodloužila na 20 dnů a při použití spor získaných v teplotě 25°C nebylo ani po ukončení biotestu dosaženo 100% mortality (max. 95%). Přesto byly hodnoty opět vyrovnané, u teploty produkce 15°C byla zjištěna vyšší počáteční mortalita než u ostatních variant, v průběhu času se však rozdíly částečně vyrovnaly.

U biotestů prováděných v teplotě 30°C byla zjištěna vyšší mortalita larev *T. molitor* v kontrolních variantách než tomu bylo u předešlých pokusů. Po 10, resp. 12 dnech byla mortalita v kontrole 15% ve všech variantách.

Graf 36 Vývoj mortality larev *T. molitor* vyvolané houbou *B. bassiana* kmen Bba I101 v teplotě 30°C, spory produkované v různých teplotách.



V souvislosti s pomalejším vývojem houby na těle mrtvých larev došlo i k prodloužení času potřebného pro dosažení hodnoty FDI 1,5. V některých případech se tento interval prodloužil až na více než 18 dnů (18,15 u produkční teploty 30°C a 18,20 u produkční teploty 25°C). Nižší hodnoty zůstávaly u variant založených ze spor vyprodukovaných v teplotách 10 a 20°C (7,91 a 8,35 dne), u spor získaných z teploty 15°C se hodnota nacházela zhruba v polovině hodnotící doby, tedy 10,23 dnů.

Tabulka 86 Vliv teploty produkce inokula na rychlost vývoje houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v teplotě 30°C.

Teplota produkce inokula (°C)	Polynomické regresní rovnice	R ²	d*
10	$y = -0,0098x^2 + 0,337x - 0,5527$	0,9678	7,91
15	$y = -0,0062x^2 + 0,2431x - 0,3377$	0,9791	10,23
20	$y = -0,0079x^2 + 0,2687x - 0,1923$	0,9458	8,35
25	$y = -0,0039x^2 + 0,1577x - 0,1075$	0,9624	18,20
30	$y = -0,0035x^2 + 0,1433x + 0,0521$	0,9543	18,15

*počet dnů potřebný pro dosažení hodnoty FDI 1,5

(R²)-koeficient spolehlivosti

Tabulka 87 Radiální růst kultur a výtěžnosti spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 získané v teplotě 30°C z inokula vyprodukovaného v různých teplotách.

Teplota produkce (°C)	Průměr kultury (mm)		Plocha kultury (mm ²)	Výtěžnost spor/mm ²	
10	21,44±0,89	a	361,02±10,52	4,69±3,74 (4,92x10 ⁴)	c
15	20,06±0,57	bc	316,13±1,97	5,29±3,79 (1,97x10 ⁵)	a
20	18,63±1,20	d	272,75±18,29	4,71±3,54 (5,13x10 ⁴)	c
25	20,63±0,96	ab	334,15±8,10	5,03±3,69 (1,08x10 ⁵)	b
30	19,56±0,51	c	300,57±1,92	4,83±3,05 (6,71x10 ⁴)	c

a,b,c – hodnoty v jednom sloupci označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukey HSD testu, $\alpha < 0,05$

Po 21 dnech byl vyhodnocen růstový potenciál houby *B. bassiana* v teplotě 30°C. Kultury měly v některých případech srovnatelnou velikost s kulturami pěstovanými v teplotě 10°C, ovšem z hlediska výtěžnosti se hodnoty pohybovaly na mnohem nižší úrovni. Průměr kultur byl v rozmezí 18,63 a 21,44mm (největší kultury byly získané u varianty produkce inokula v 10°C) a mezi jednotlivými hodnotami byly prokazatelné rozdíly ($F_{(4,75)}=24,098$; $p=0,0000$). Co se týká hodnot výtěžnosti, tak ty se v tomto biotestu pohybovaly již na úrovni dvou řádů, rozpětí hodnot bylo $5,13 \times 10^4 - 1,97 \times 10^5$ spor/mm². Tento rozdíl samozřejmě znamená statisticky průkazné odlišnosti mezi jednotlivými variantami ($F_{(4,5)}=84,910$; $p=0,0000$). Nejnižší hodnota výtěžnosti a zároveň i nejmenší průměr kultury vznikly ze suspenze spor vyprodukovaných v teplotě 20°C. Podobná situace je i u spor získaných z teploty 30°C.

Produkční teplota inokula shodná s teplotou kultivace 30°C neprokázala výhody v žádném z parametrů. U biotestů probíhajících v této teplotě se znatelně prodloužila doba potřebná pro usmrcení hostitele a ukončení vývojového cyklu houby.

5.4.6. Porovnání vlivu teploty produkce inokula na následné parametry ve všech kultivačních teplotách

Vzhledem k tomu, že v testech byla používána široká škála teplot, tak se jednotlivé varianty mezi sebou výrazně lišily. Pro přehlednost bude v následující části uvedeno porovnání vlivu produkčních teplot na vlastnosti houby Bba I101 ve všech kultivačních teplotách zároveň, aby byly zdůrazněny jednotlivé rozdíly. Z hlediska klíčivosti po 24 hodinách lze shrnout, že teplota produkce inokula měla výrazný vliv pro následnou kultivaci v teplotách 10 a 15°C, zvláště pak u první jmenované. U ostatních teplot se neprojevil vliv produkce inokula na následné klíčení spor v biotestu.

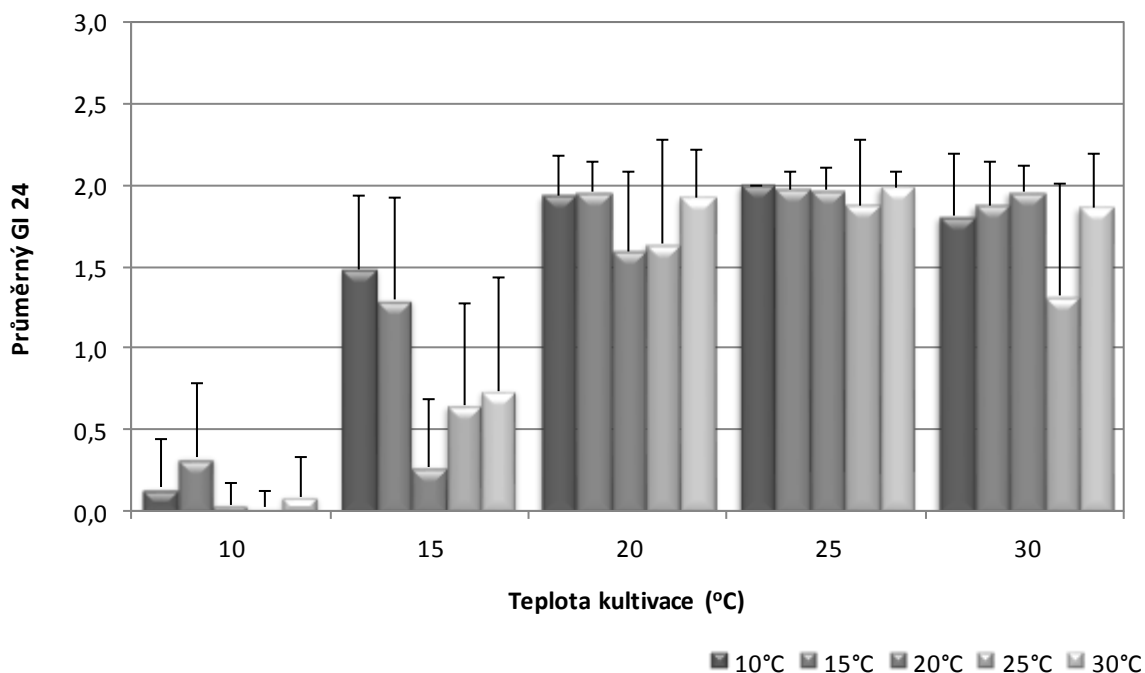
Při statistickém porovnání v rámci jednotlivých kultivačních teplot byly rozdíly vyjádřeny následovně : 10°C – $F_{(4,5)}=189,80$; $p=0,0000$, 15°C – $F_{(4,5)}=589,53$; $p=0,0000$, 30°C – $F_{(4,5)}=140,51$; $p=0,0000$, u produkčních teplot 10°C – $F_{(4,5)}=1467,6$; $p=0,0000$, 15°C – $F_{(4,5)}=1170,0$; $p=0,0000$, 20°C – $F_{(4,5)}=2896,3$; $p=0,0000$, 25°C – $F_{(4,5)}=625,96$; $p=0,0000$, 30°C – $F_{(4,5)}=4,3432$; $p=0,0685$.

Tabulka 88 Vitalita spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v různých teplotách (klíčivost %±SE).

Produkce Inokula (°C)	Teplota průběhu biotestu (°C)									
	10	15	20	25	30	10	15	20	25	30
10	20,70±2,07	Bb	100	Aa	100	Aa	100	Aa	100	Aa
15	41,71±0,36	Ac	92,82±1,47	Bb	99,56±0,47	Aa	99,51±0,49	Aa	100	Aa
20	7,80±0,94	CDc	36,24±0,39	Db	98,57±1,43	Aa	100	Aa	99,56±0,49	Aa
25	3,97±0,43	Dc	60,34±0,34	Cb	91,65±3,05	Aa	96,76±1,52	Aa	90,26±0,43	Ba
30	13,82±0,60	Cc	63,93±1,79	Cb	98,60±1,40	Aa	99,52±0,49	Aa	98,54±0,50	Aa

A,B,C - hodnoty v jednom sloupci označené stejným velkým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

a,b,c – hodnoty v jednom řádku označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukey HSD testu, $\alpha < 0,05$

Graf 37 Vývoj houby *B. bassiana* kmen Bba I101 ve všech hodnocených teplotách.

Při hodnocení teplot kultivace 10 a 30°C byly zjištěny prokazatelně nejdelší intervaly pro dosažení FDI 1,5. V těchto teplotách se interval protáhl až na 18,70 dne. Délka intervalu výrazně závisela na teplotě produkce spor použitých pro zakládání testu. Volbou vhodné produkce inokula lze zkrátit tuto dobu až o 7,52 dne.

Tabulka 89 Čas potřebný pro dosažení hodnoty vývoje houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvách *T. molitor* 1,5 (R^2).

Produkce inokula(°C)	Teplota průběhu biotestu (°C)				
	10	15	20	25	30
10	11,18 (0,9887)	6,18 (0,9311)	3,72 (0,9471)	3,78 (0,9699)	7,91 (0,9678)
15	13,85 (0,9943)	6,65 (0,9935)	4,46 (0,9999)	4,03 (0,9893)	10,23 (0,9791)
20	18,70 (0,9773)	11,54 (0,9948)	5,24 (0,9993)	4,90 (0,9979)	8,35 (0,9458)
25	16,17 (0,9868)	7,84 (0,8500)	5,69 (0,9638)	9,15 (0,9058)	18,20 (0,9588)
30	17,48 (0,9735)	9,76 (0,9712)	6,01 (0,9915)	5,58 (0,9986)	18,15 (0,9543)

*počet dnů potřebný pro dosažení hodnoty FDI 1,5
(R^2)-koeficient spolehlivosti

Rozměry středových kultur byly ohraničené hodnotami získanými při kultivaci v 10 a 30°C. V radiálním růstu byly sice prokazatelné rozdíly, nicméně v 10°C se průměry pohybovaly v rozmezí 20,00-25,50mm, ve 30°C mezi 18,63-21,44mm. V rámci zbylých třech teplot se průměry kultur ve většině případů zvyšovaly se stoupající produkční teplotou. Největší kultura byla vytvořena s inokulem vyprodukovaným ve 30°C při následné kultivaci v teplotě 25°C a dosahovala průměru 54,00mm. Mezi všemi variantami ať už v rámci jedné kultivační nebo produkční teploty byly nalezeny statisticky průkazné rozdíly. Statistické hodnocení v rámci produkční teploty: 10°C – $F_{(4,73)}=3860$; $p=0,0000$, 15°C – $F_{(4,75)}=4794,0$; $p=0,0000$, 20°C – $F_{(4,71)}=1122,6$; $p=0,0000$, 25°C – $F_{(4,75)}=891,93$; $p=0,0000$, 30°C – $F_{(4,71)}=1997,2$; $p=0,0000$. V rámci kultivační teploty 10°C – $F_{(4,75)}=243,22$; $p=0,0000$, 15°C – $F_{(4,71)}=113,10$; $p=0,0000$, 20°C – $F_{(4,73)}=249,99$; $p=0,0000$, 25°C – $F_{(4,71)}=134,67$; $p=0,0000$, 30°C – $F_{(4,75)}=24,098$; $p=0,0000$.

Tabulka 90 Statistické vyhodnocení vlivu produkční teploty inokula na průměr kultury houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v jednotlivých teplotách biotestu.

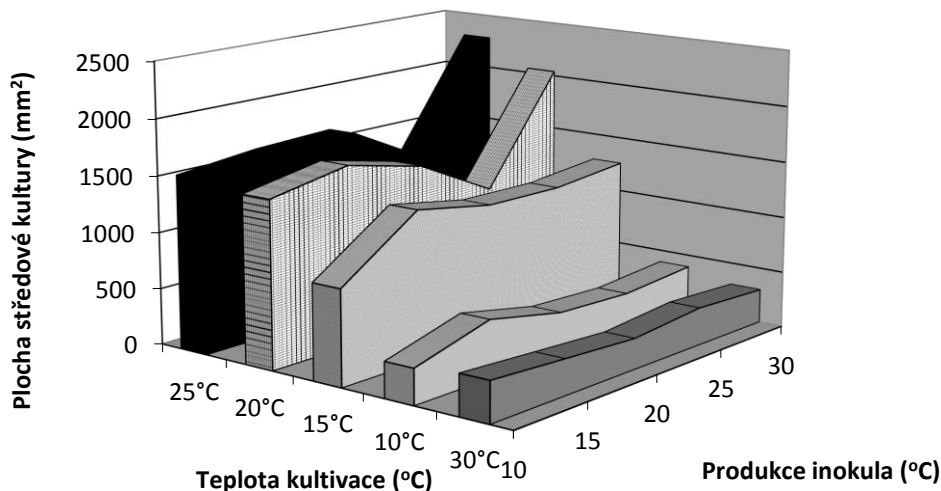
Produkce inokula (°C)	Teplota průběhu biotestu (°C)									
	10		15		20		25		30	
10	20,00±0,00	Ee	32,75±0,68	Cc	43,43±0,94	Cb	44,25±0,77	Ba	21,44±0,89	Ad
15	25,50±0,52	Ac	41,13±0,96	Ab	45,25±0,77	Ba	45,31±0,48	Ba	20,06±0,57	BCd
20	21,56±0,73	Cd	39,07±1,07	Bc	42,88±1,86	Cb	45,64±2,10	Ba	18,63±1,20	Ee
25	20,63±0,62	Dc	38,94±1,24	Ba	36,94±0,93	Db	40,13±2,28	Ca	20,63±0,96	ABc
30	22,25±0,58	Bd	39,93±1,90	ABc	50,94±1,48	Ab	54,00±1,96	Aa	19,56±0,51	De

A,B,C - hodnoty v jednom sloupci označené stejným velkým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

a,b,c- hodnoty v jednom řádku označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

Výtěžnosti spor přepočtené na 1mm^2 se většinou v rámci jedné kultivační teploty nelišily. Rozdíly byly nalezeny napříč všemi variantami v rámci jedné produkční teploty. Nejvyššího výnosu spor na 1mm^2 zde dosahovaly kultury pěstované v teplotách 20 a 25°C . Největší rozkolísanost hodnot byla zaznamenána v teplotě 30°C , kde se množství spor pohybovalo v rozmezí $4,92 \times 10^4$ - $1,08 \times 10^5/\text{mm}^2$ a to byly zároveň i nejnižší hodnoty v průběhu celého biotestu. Ačkoli byly rozměry kultur získané v 10°C velikostně srovnatelné s teplotou 30°C , byl zde nesrovnatelně vyšší výnosový potenciál. V této teplotě se množství získaných spor pohybovalo v rozmezí $1,11$ - $1,82 \times 10^6/\text{mm}^2$.

Graf 38 Velikost ploch středových kultur houby *B. bassiana* kmen Bba I101 v souvislosti s teplotou produkce a následné kultivace.



* Z důvodu přehlednosti byl graf znázorňující teplotu 30°C přesunut dopředu, ostatní grafy jsou řazeny od 10 do 25°C vzestupně

Tabulka 91 Výtěžnost spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 ze středových kultur, uváděné hodnoty jsou logaritmem původních hodnot.

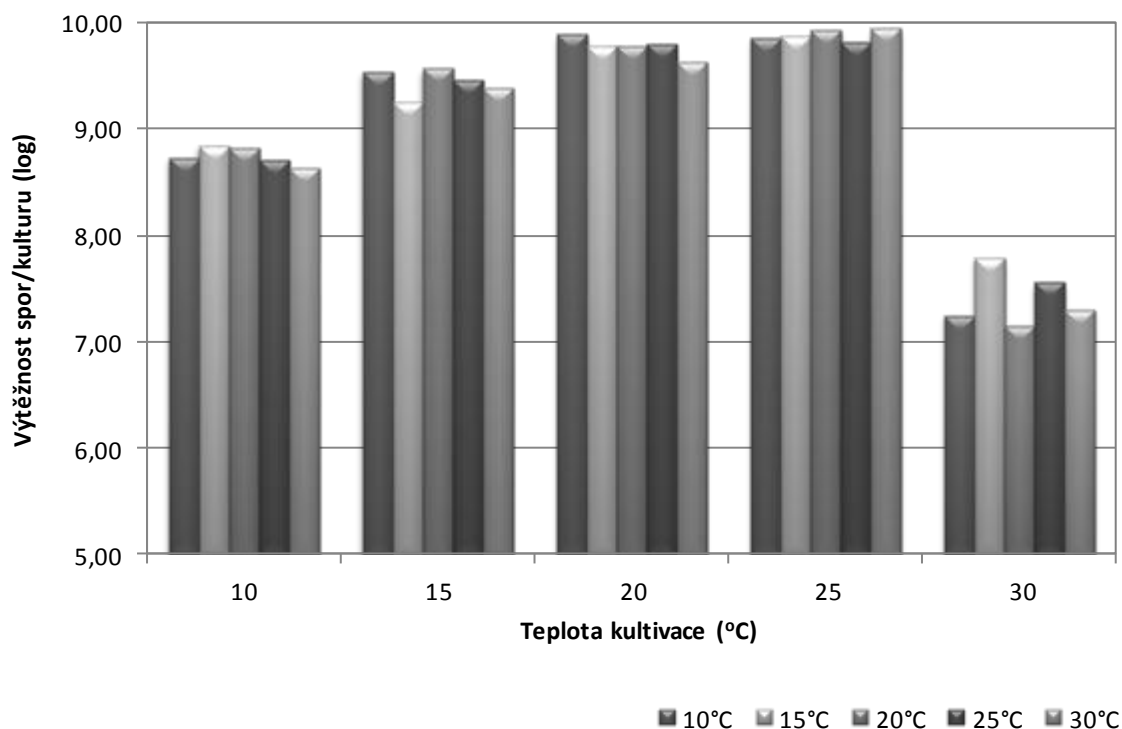
Teplota produkce inokula (°C)	Logaritmus výtěžnosti (netransformovaná hodnota)									
	Teplota kultivace biotestu (°C)									
	10		15		20		25		30	
10	6,23±4,49 (1,73x10 ⁶)	Ac	6,61±4,83 (4,09x10 ⁶)	Ab	6,72±5,45 (5,23x10 ⁶)	Aa	6,68±5,07 (4,74x10 ⁶)	ABab	4,69±3,74 (4,92x10 ⁴)	Cd
15	6,13±0,00 (1,35x10 ⁶)	Ab	6,13±4,99 (1,34x10 ⁶)	Cb	6,58±5,30 (3,77x10 ⁶)	Aa	6,66±5,50 (4,54x10 ⁶)	ABa	5,29±3,79 (1,97x10 ⁵)	Ac
20	6,26±4,18 (1,82x10 ⁶)	Ab	6,49±5,57 (3,09x10 ⁶)	ABab	6,61±5,89 (4,11x10 ⁶)	Aa	6,72±5,28 (5,25x10 ⁶)	Aa	4,71±3,54 (5,13x10 ⁴)	Cc
25	6,18±3,66 (1,50x10 ⁶)	Ac	6,38±5,34 (2,42x10 ⁶)	ABb	6,76±5,27 (5,73x10 ⁶)	Aa	6,71±4,43 (5,10x10 ⁶)	Aa	5,03±3,69 (1,08x10 ⁵)	Bd
30	6,02±5,56 (1,11x10 ⁶)	Ab	6,29±5,47 (1,95x10 ⁶)	BCab	6,33±5,11 (2,11x10 ⁶)	Bab	6,59±5,16 (3,86x10 ⁶)	Ba	4,83±3,05 (6,71x10 ⁴)	Cc

A,B,C – hodnoty v jednom sloupci označené stejným velkým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

a,b,c - hodnoty v jednom řádku označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

V rámci jedné produkční teploty lze statistickou významnost charakterizovat jako: 10°C – $F_{(4,5)}=1201,3$; $p=0,0000$, 15°C – $F_{(4,5)}=552,94$; $p=0,0000$, 20°C – $F_{(4,5)}=321,74$; $p=0,0000$, 25°C – $F_{(4,5)}=1153,5$; $p=0,0000$, 30°C – $F_{(4,5)}=79,255$; $p=0,0001$, v rámci jedné kultivační teploty pak: 10°C - $F_{(4,5)}=1,6814$; $p=0,2885$, 15°C - $F_{(4,5)}=17,843$; $p=0,0037$, 20°C - $F_{(4,5)}=16,473$; $p=0,0044$, 25°C - $F_{(4,5)}=8,7944$; $p=0,0174$ a 30°C - $F_{(4,5)}=84,910$; $p=0,0000$.

Nejnižší absolutní výtěžnosti spor dosahovaly kultury pěstované ve 30°C. V teplotách 20 a 25°C byly hodnoty prakticky vyrovnané, množství spor na kulturu v teplotě 15°C zaznamenalo částečný pokles oproti vyšším teplotám.

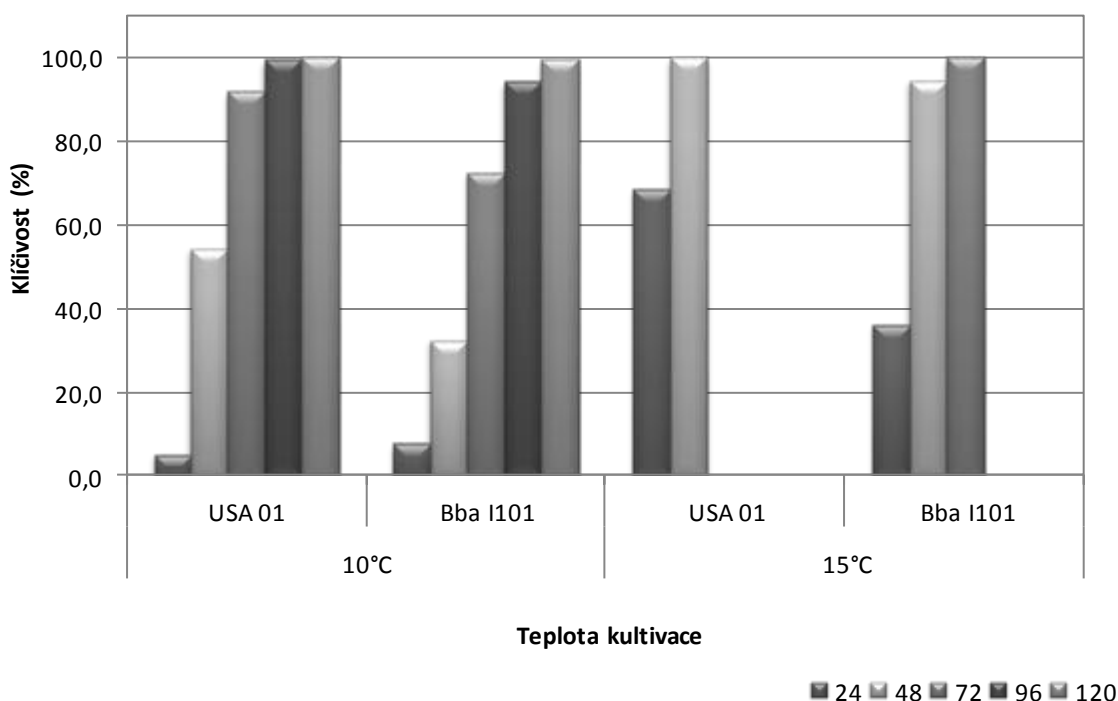
Graf 39 Výtěžnost spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 získaná z 1 kultury, uváděné hodnoty jsou dekadickým logaritmem zjištěných výtěžností.

5.4.7. Porovnání dvou kmenů houby *B. bassiana* pocházejících z odlišných klimatických oblastí

V následující části byly použity dva kmeny houby *B. bassiana* - Bba I101 a USA Bba 01, které pochází z naprosto odlišných klimatických oblastí. Byly u nich sledovány změny parametrů v rámci jednotlivých teplot. Spory, které posloužily pro přípravu počáteční suspenze byly produkovány v teplotě 20°C a hodnocení následně probíhala v teplotách od 10 do 30°C jako ve všech předchozích případech. Cílem bylo zjistit, zda dojde k výraznému odlišení některých kvalitativních nebo kvantitativních ukazatelů. S oběma kmeny byla provedena kompletní série pokusů hodnotících vitalitu a virulenci.

Při porovnávání klíčivosti nebyl pozorován rozdíl mezi oběma kmeny v teplotách 20-30°C. V teplotách 10 a 15°C byly v průběhu testu zaznamenány mírné odlišnosti, nejvýraznější rozdíl byl v teplotě 15°C po 24 hodinách kultivace, kdy hodnota klíčivosti u Bba I101 byla 36,24%, zatímco u kmene USA Bba 01 68,66%. V průběhu další 24 hodin se však tento rozdíl vyrovnal. Podobná situace nastala i v 10°C po 48 hodinách, ovšem i zde bylo 100% klíčivosti dosaženo po 120 hodinách u obou kmenů.

Graf 40 Porovnání klíčivosti spor dvou kmenů houby *B. bassiana*.



Co se týká vývoje houby hodnoceného společně s testem klíčivosti na 2% agaru, bylo v některých případech dosaženo výraznějších odlišností. Délka intervalu potřebného k dosažení plné sporulace mycelia se ve většině případů nelišila. Jedinou výraznější odlišností byl vývoj ve 20°C, kde kmen Bba I101 dosáhl hodnoty GI 3 po 72 hodinách, zatímco kmen USA Bba 01 až po 96 hodinách. U ostatních variant byl celkový čas stejný, odlišoval se pouze průběh vývoje. V teplotách 15 a 20°C byl u kmene Bba I101 pomalejší vývoj na počátku biotestu a i v dalším průběhu vývoje byly drobné odlišnosti.

Tabulka 92 Vliv teploty kultivace na vývoj dvou kmenů houby *B. bassiana*.

Kmen	Délka biotestu (hod)	Teplota kultivace (°C)				
		10	15	20	25	30
Bba I101	24	0,04±0,13	0,27±0,41	1,60±0,49	1,97±0,14	1,96±0,16
	48	0,19±0,30	1,66±0,57	2,01±0,07	3,00	2,12±0,25
	72	0,74±0,58	1,98±0,11	3,00		3,00
	96	1,64±0,58	2,00±0,00			
	120	1,93±0,22	2,25±0,27			
	144	1,97±0,17	3,00			
	168	2,28±0,30				
	192	2,72±0,33				
	216	3,00				
USA Bba 01	24	0,03±0,11	0,66±0,60	1,83±0,41	1,99±0,07	1,91±0,28
	48	0,51±0,59	1,94±0,25	2,00±0,00	3,00	2,52±0,34
	72	1,53±0,59	2,00±0,00	2,93±0,18		3,00
	96	1,93±0,25	2,09±0,23	3,00		
	120	1,98±0,11	2,61±0,43			
	144	2,00±0,00	3,00			
	168	2,12±0,21				
	192	3,00				

Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

Byl nalezen statisticky průkazný rozdíl prakticky mezi všemi variantami na základě Mann-Whitneyho U testu na hladině významnosti $\alpha=0,05$. Bez rozdílu byly pouze varianty v 10 a 25°C po 24 hodinách kultivace a 20 a 30°C po 72 hodinách testu. Mezi všemi ostatními variantami byly více či méně průkazné rozdíly.

Tabulka 93 Zhodnocení statistické odlišnosti ve vývoji dvou kmenů houby *B. bassiana* na základě hodnoty p.

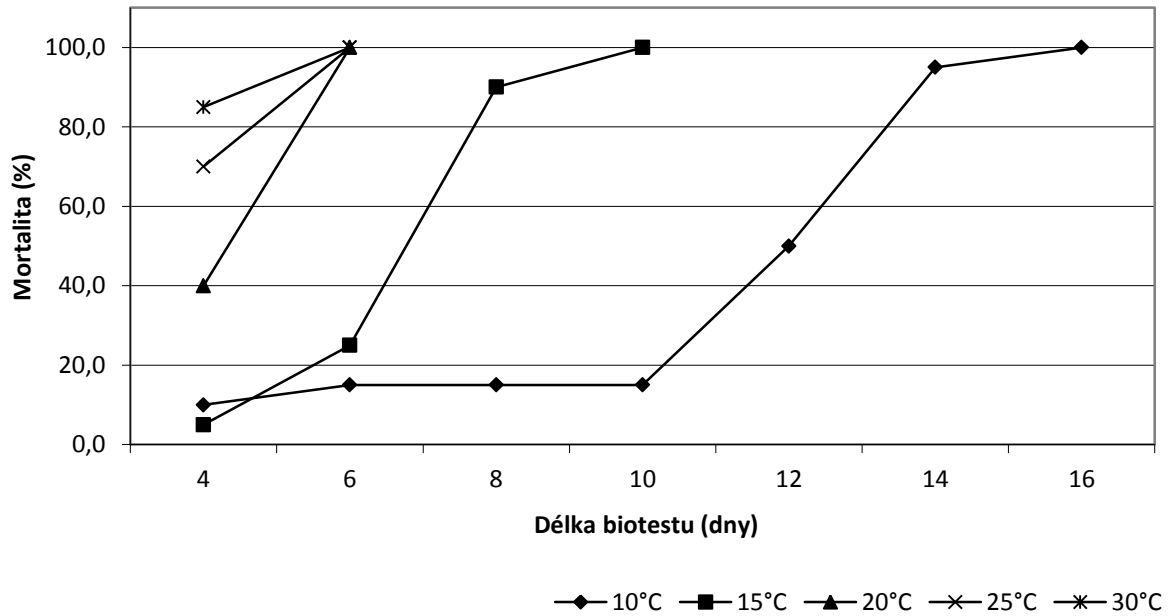
Teplota kultivace (°C)	Délka biotestu (hod)							
	24	48	72	96	120	144	168	192
10	^y	0,0000	0,0000	0,0000	0,0066	0,0093	0,0000	0,0000
15	0,0000	0,0000	0,0281	0,0000	0,0000			
20	0,0000	0,0450	^y					
25	^y							
30	0,0411	0,0000	^y					

*Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

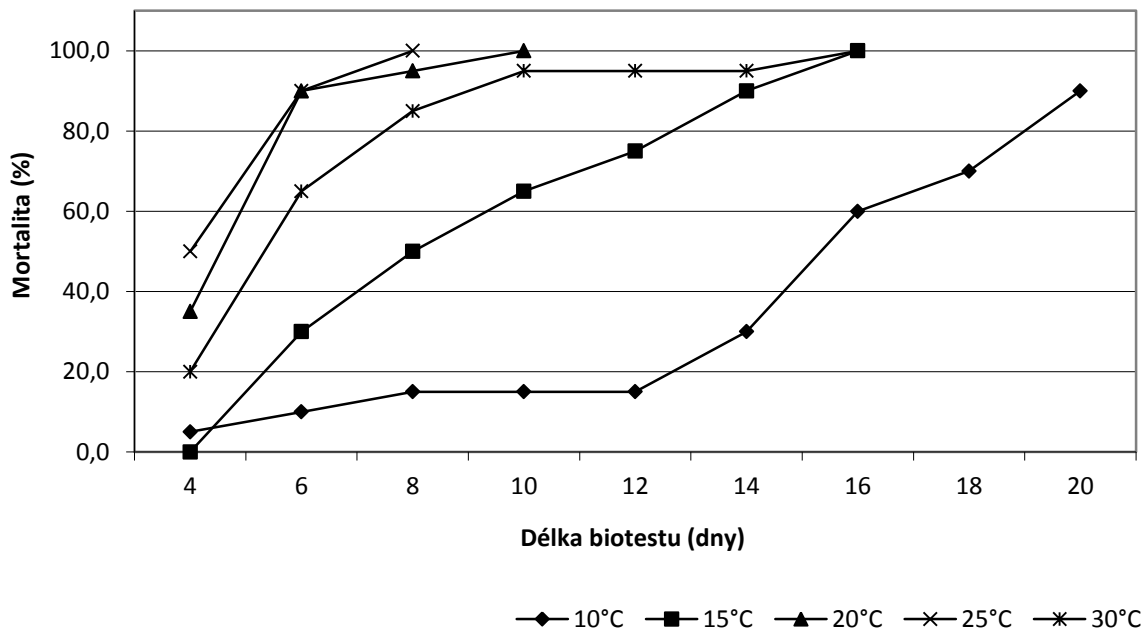
^y Mezi jednotlivými variantami nebyl nalezen dostatečný rozptyl

Test virulence prováděný standardně na larvách *T. molitor* ukázal podstatně výraznější odlišnosti v rychlosti vývoje obou kmenů. Zatímco u kmene Bba I101 nebylo v teplotě 30°C hodnoty FDI 3 dosaženo ani po ukončení biotestu po 20 dnech, u kmene USA Bba 01 byl tento index prokazatelný již po 12 dnech. Nárůst rychlosti vývoje houby kmene USA Bba 01 byl v teplotách 25 a 30°C zřejmý již po 4 dnech od počátku biotestu. V teplotě 25°C došlo v průběhu biotestu k vyrovnání indexů u obou kmenů. Naopak je třeba zmínit, že kmen Bba I101 měl rychlejší vývoj v 10°C až do 10. dne, v dalších dnech došlo k obrácenému trendu vývoje. V rámci teplot 10, 20 a 25°C nebyla použitým kmenem ovlivněna rychlost dosažení plné sporulace houby na těle larvy, v teplotě 15°C byla o dva dny zkrácena u varianty používající kmen USA Bba 01.

Graf 41 Vliv teploty kultivace na účinnost houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvy *T. molitor*.



Graf 42 Vliv teploty kultivace na účinnost houby *B. bassiana* kmen USA Bba 01 na larvy *T. molitor*.



Mortalita larev v kontrolních variantách se pohybovala v rozmezí 0-10% v teplotách 10-25°C, v teplotě 30°C dosáhla maximálně 15%.

Tabulka 94 Průběh testu virulence ve všech sledovaných teplotách, inokulum houby *B. bassiana* kmen Bba I101 a USA 01 produkované ve 20°C.

Kmen	Délka biotestu (dny)	Teplota kultivace biotestu (°C)				
		10	15	20	25	30
Bba I101	4	0,35±0,29	0,28±0,26	0,88±0,60	1,05±0,69	0,70±0,64
	6	0,48±0,34	0,45±0,48	1,83±0,65	2,00±0,76	1,10±0,62
	8	0,68±0,47	0,83±0,41	2,50±0,58	2,53±0,60	1,50±0,69
	10	0,68±0,47	1,28±0,80	2,95±0,15	2,95±0,15	1,90±0,64
	12	0,70±0,50	1,63±0,92	3,00	3,00	1,93±0,63
	14	0,93±0,52	1,90±0,88			1,95±0,61
	16	1,23±0,72	2,25±0,77			1,98±0,55
	18	1,40±0,79	2,68±0,49			1,98±0,55
	20	1,68±0,71	2,85±0,40			2,20±0,70
USA Bba 01	4	0,23±0,34	0,15±0,29	0,70±0,54	1,28±0,73	1,48±0,55
	6	0,28±0,44	0,43±0,67	2,05±0,16	2,13±0,56	2,28±0,41
	8	0,35±0,54	1,55±0,56	2,48±0,30	2,83±0,29	2,83±0,29
	10	0,38±0,53	1,98±0,26	2,88±0,22	2,98±0,11	2,90±0,26
	12	0,78±0,50	2,18±0,34	3,00	3,00	3,00
	14	1,48±0,50	2,75±0,30			
	16	1,83±0,41	2,98±0,11			
	18	2,23±0,34	3,00			
	20	2,35±0,29				

Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

Tabulka 95 Statistické zhodnocení průběhu virulence houby *B. bassiana*, kmene Bba I101 a USA Bba 01, vyjádřeno pomocí hodnoty p.

Teplota kultivace (°C)	Délka biotestu (dny)								
	4	6	8	10	12	14	16	18	20
10	y	0,0460	y	0,0095	y	0,0018	0,0043	0,0001	0,0003
15	y	y	0,0001	0,0039	y	0,0022	0,0014	y	
20	y	y	y	y	y				
25	y	y	y	y	y				
30	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000				

Statistické vyhodnocení proběhlo na základě neparametrického Kruskal-Wallisova testu

^y Mezi variantami nebyl nalezen dostatečný rozptyl

V rámci statistického vyhodnocení jsou patrné rozdíly mezi oběma variantami. Nejprokazatelnější odlišnosti byly v případě teploty kultivace 30°C. Zde se pohybovaly hodnoty na hranici nebo v blízkosti $p=0,0000$. V teplotách 20 a 25°C pak nebyly nalezeny žádné statistické rozdíly, vývoj FDI byl velmi vyrovnaný.

U nízkých teplot byly prokázány odlišnosti, většinou však ve prospěch kmene USA Bba 01, což se odrazilo následně i při vyhodnocování času potřebného pro dosažení vývojové fáze FDI 1,5. Délka úseku byla velmi vyrovnaná v teplotách 20 a 25°C, kde se hodnoty lišily pouze o desetiny dne. V ostatních teplotách byly některé rozdíly velmi výrazné. Pokud se jednalo o teplotu 10°C, byl rozdíl 3,34 dne, u teploty 15°C pak 2,99 dne. V obou případech ve prospěch kmene USA Bba 01. Nejvýraznější rozdíl byl v teplotě 30°C, kde se jednalo o 4,28 dne.

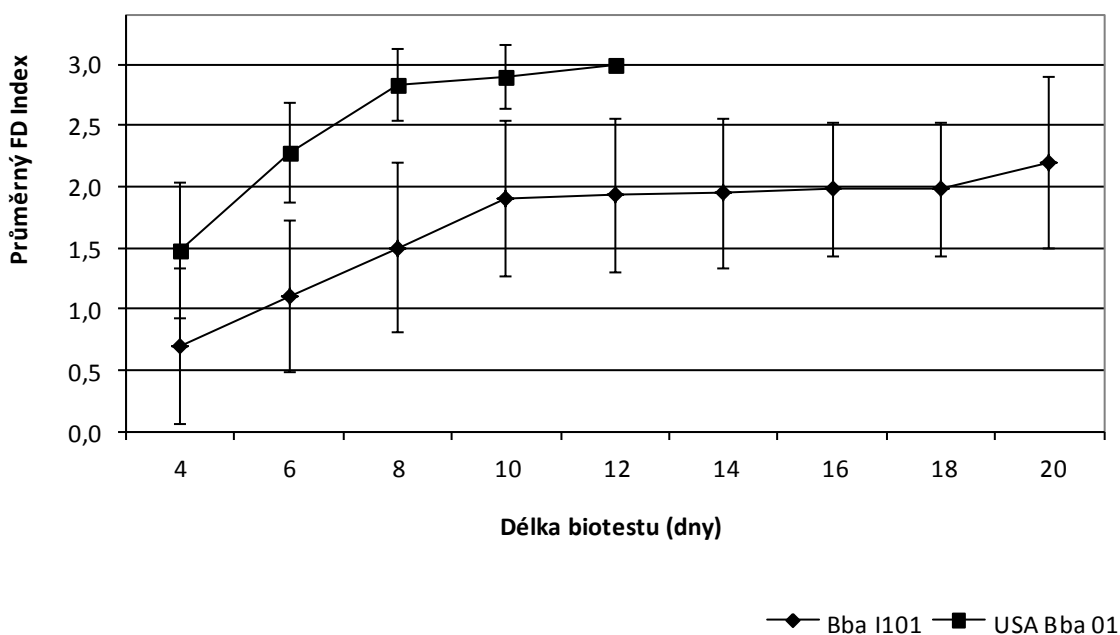
Tabulka 96 Vyjádření doby potřebné pro dosažení indexu vývoje 1,5 u houby *B. bassiana*, kmen Bba I101 a USA Bba 01.

Teplota kultivace (°C)	Bba I101		USA Bba 01	
	Polynomické regresní rovnice	d* (R ²)	Polynomické regresní rovnice	d* (R ²)
10	$y=0,0036x^2-0,0073x+0,378$	18,70 (0,9773)	$y=0,0068x^2-0,0106x+0,0588$	15,36 (0,9573)
15	$y=-0,0005x^2+0,1817x-0,5302$	11,54 (0,9948)	$y=0,0456x^2-0,5549x+2,1961$	8,55 (0,8212)
20	$y=-0,0362x^2+0,8473x-1,945$	5,24 (0,9993)	$y=-0,0594x^2+1,1788x-3,02$	5,19 (0,9849)
25	$y=-0,0339x^2+0,7854x-1,535$	4,90 (0,9979)	$y=-0,0438x^2+0,9025x-1,655$	4,46 (0,9956)
30	$y=-0,0079x^2+0,2687x-0,1923$	8,35 (0,9458)	$y=-0,0453x^2+0,8756x-1,3138$	4,07 (0,998)

* doba potřebná pro dosažení indexu FDI 1,5
(R²)-koeficient spolehlivosti

U kmene USA Bba 01 byl biotest na larvách *T. molitor* prováděný ve 30°C ukončen po dosažení plné sporulace po 12 dnech, u kmene Bba I101 probíhal po celých 20 dnů a ani po uplynutí této doby nedosáhlo mycelium na povrchu těla larev plné sporulace.

Graf 43 Porovnání průběhu virulence na larvách *T. molitor* u dvou kmenů houby *B. bassiana* ve 30°C .



Zatímco u kmene Bba I101 bylo největších kultur dosahováno ve 20 a 25°C, u kmene USA Bba 01 tomu bylo v teplotách 25 a 30°C. Ve 30°C se průměr kultury lišil dokonce téměř o 30mm, což je velmi výrazný rozdíl vezmeme-li v úvahu, že nižší z hodnot byla 18,63mm, vyšší pak 47,81mm. Od průměrů středových kultur se odvíjí i plocha kultury, která byla v případě kmene Bba I101 vymezena dvěma hraničními teplotami (10 a 30°C), v případě kmene USA Bba 01 pak vykazovala stále stoupající tendenci, která měla vrchol ve 30°C.

Tabulka 97 Porovnání průměrů a ploch středových kultur dvou kmenů houby *B. bassiana*.

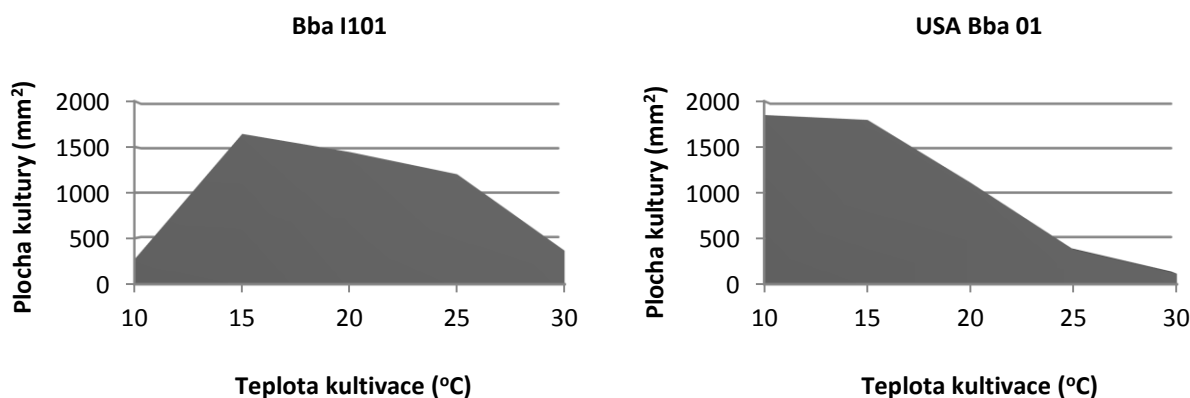
Kultivace (°C)	Průměr kultury (mm)				Plocha kultury (mm ²) ^z			
	Bba I101		USA Bba 01		Bba I101		USA Bba 01	
10	21,56±0,73	Da	12,00±0,73	Db	365,19±6,35	Da	113,10±0,00	Cb
15	39,07±1,07	Ca	21,88±0,62	Cb	1201,02±14,08	Ca	375,83±0,00	Cb
20	42,88±1,86	Ba	37,56±2,48	Bb	1444,21±50,51	Ba	1108,30±25,81	Bb
25	45,64±2,10	Aa	47,81±1,22	Aa	1642,68±43,40	Aa	1795,48±14,08	Aa
30	18,63±1,20	Eb	48,50±2,13	Aa	272,75±18,29	Db	1849,25±14,24	Aa

A,B,C – hodnoty v jednom sloupci označené stejným velkým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

a,b,c - hodnoty v jednom řádku označené stejným malým písmenem nejsou statisticky rozdílné na základě ANOVA a Tukeyho HSD testu, $\alpha < 0,05$

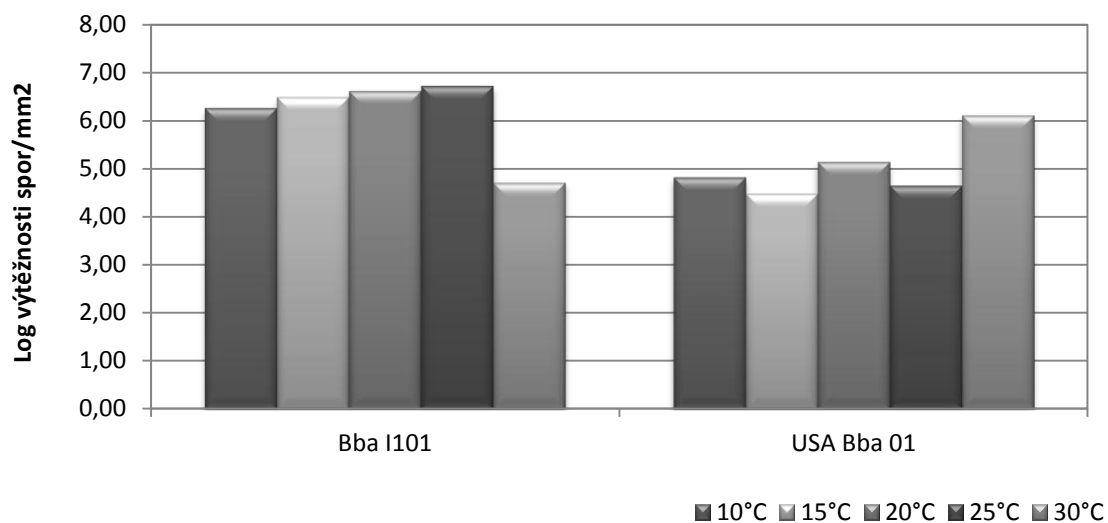
^z společné hodnocení parametrů v rámci plochy kultury

Velikosti ploch středových kultur získané u obou kmenů měly naprosto odlišný průběh závislý na jednotlivých teplotách kultivace. Rozdíly v rámci jednoho kmene byly prokazatelné u obou variant ($F_{(4, 5)}=394,79$; $p=0,0000$ u kmene Bba I101 a $F_{(4,5)}=226,97$; $p=0,0000$ u kmene USA Bba 01). Je zřejmé, že kmen Bba I101 byl schopen vytvořit výrazně větší kultury v nízkých teplotách než kmen USA Bba 01 a naopak. Druhý jmenovaný kmen tvořil nepoměrně větší kultury ve 30°C. Hodnoty radiálního růstu a celkové plochy kultury byly srovnatelné pouze v teplotě 25°C, což dokazuje i statistické hodnocení $F_{(1,2)}=11,216$; $p=0,0788$.

Graf 44 Plocha středových kultur dvou kmenů houby *B. bassiana*.

Z hodnocených parametrů byla posledním výtěžnost spor získaná z jednotlivých středových kultur. Výtěžnosti byly po spočítání množství spor přečteny na jednotku plochy (mm²) a pro sjednocení výsledků byl použit dekadický logaritmus. Z hodnot se ukázalo, že jednoznačně vyšší výtěžnosti na 1mm² dosahovaly kultury založené se spory kmene Bba I101. Ovšem s výjimkou teploty 30°C, kde byla u kmene Bba I101 zjištěna výtěžnost $6,71 \times 10^4$, u kmene USA Bba 01 pak $1,28 \times 10^6$ spor/mm². V ostatních teplotách byly hodnoty u Bba I101 v rozmezí $1,82-5,25 \times 10^6$ spor/mm², u kmene USA Bba 01 v rozmezí $2,99 \times 10^4-1,39 \times 10^5$ spor/mm². Z hlediska výtěžnosti spor v teplotách 10-25°C je tedy jednoznačně výhodnější kultivovat kmen Bba I101.

Graf 45 Porovnání výtěžností dvou kmenů houby *B. bassiana* při kultivaci v různých teplotách.



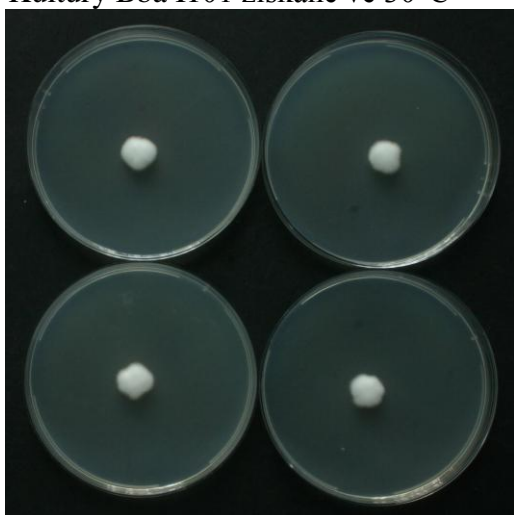
Srovnání středových kultur získaných kultivací houby *B. bassiana* kmen Bba I101 a USA Bba 01.



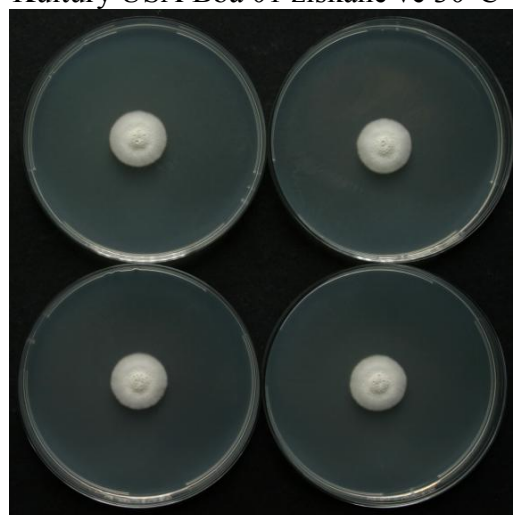
Kultury Bba I101 získané ve 30°C



Kultury USA Bba 01 získané ve 30°C



Kultury Bba I101 získané v 10°C



Kultury USA Bba 01 získané v 10°C

6. DISKUSE

Entomopatogenní houby (dále EH) jsou považovány za velmi slibný prostředek v biologické ochraně rostlin. Předurčuje je k tomu nejen široké spektrum hostitelských organismů a schopnost infikovat různá vývojová stádia, ale především jejich kosmopolitní charakter. Houba *B. bassiana* je celosvětově rozšířena a patří mezi druhy, které jsou s nejvyšší četností izolovány z hmyzu a půdních vzorků (Alves, 1998). Mimo jiné bylo prokázáno, že se běžně nachází i v nadzemních částech rostlin, kde je systemicky aktivní a podílí se na ochraně proti rostlinným patogenům (Meyling, Eilenberg 2007, Pell 2007, Vega et al. 2009, Ownley et al. 2010). EH často vyvolávají přirozené epizootie v populacích hmyzu (Butt, Goettel 2000). Je dobře zdokumentováno, že mohou vzejít až dramatické epizootie, které vedou k rapidnímu snížení četnosti populací hostitele (Pell, Hannam, Steinkraus 2010). Např. Townsend et al. (1995) ve své práci uvádí, že populace vrubounovitých brouků *Costelytra zealandica* byla houbou *B. bassiana* zredukována až o 99%. Zájem o využívání houbových organismů v ochraně rostlin se v posledních letech zvyšuje. V oblasti vývoje biopreparátů je zainteresováno stále více firem, které se snaží vytvořit produkty odolávající nepříznivým podmínkám prostředí a zajišťující spolehlivou ochranu. V roce 2006 byly EH využity jako účinná složka více než 100 komerčně dostupných mykoinsekticidních přípravků v řadě zemí světa (Jaronski 2010). Faria a Wraight (2007) dokonce uvádějí 171 produktů na bázi EH.

Při přípravě mykoinsekticidů na bázi mitosporických hub je nutné respektovat nároky jednotlivých druhů EH s důrazem na kmen a jeho původ, stejně jako registrační podmínky. Především jde o to, že každý kmen si s sebou nese jistou informaci související s adaptací na původní prostředí, ze kterého pochází a prostředí, do kterého je introdukovan nemusi svými atributy splňovat optimální podmínky pro jeho růst, množení a přežívání na stanovišti. Při foliární aplikaci je okamžitá účinnost EH a jejich persistence na rostlině ovlivněna slunečním zářením, vlhkostí, teplotou a dalšími faktory souvisejícími s fyloplánem. Při aplikaci do půdy může být účinnost mykoinsekticidu ovlivněna půdní texturou, vlhkostí, teplotou a řadou biotických faktorů (Jaronski 2010). Z toho důvodu byla velká pozornost věnována výběru a hodnocení kmene určeného pro praktické aplikace s ohledem na lokalitu jeho plánovaného využití. Registrované mykoinsekticidy jsou založeny vždy na jednom konkrétním kmene. V řadě zemí existují problémy s registrací takovýchto preparátů, zvláště v Evropě jsou omezení velmi striktní. Kvůli legislativě a obtížím souvisejícím s registrací nových biopreparátů je v Evropě v porovnání se státy Jižní Ameriky registrováno nesrovnatelně menší množství přípravků na bázi EH. Registrovaný přípravek může být následně distribuován do zemí po celém světě. To přináší jistou formu rizika rozšiřování nepůvodních kmenů. Avšak Gaitan et al. (2002) uvádí, že u tak široce rozšířených druhů patřících mezi EH, nedochází k výraznému ovlivnění stávající diverzity introdukcí cizích kmenů (Gaitan et al. 2002).

Váženým problémem však stále zůstává odstup mezi vědeckým výzkumem v laboratoři a praktickým použitím, včetně účelnosti vývoje v agrochemických společnostech (Zimmermann 1997). Aplikace biopreparátů na bázi EH mohou mít široké použití v polních nebo skleníkových podmínkách, stejně jako při ochraně skladovaných produktů. Jejich použití je velmi nadějnou metodou ochrany proti hmyzím škůdcům (Moore et al. 1996). V literatuře se uvádí, že účinnost a spolehlivost přípravků na bázi EH je srovnatelná s chemickými prostředky a technologie používané pro produkci, finalizaci a aplikaci entomopatogenních hub je často srovnatelná s tou, která se používá pro produkci chemických pesticidů. Je však třeba mít na paměti, že houby se chovají jinak než chemické substance a jsou více než syntetické pesticidy ovlivňovány různými biotickými a abiotickými přírodními faktory, jako

je teplota, relativní vzdušná vlhkost nebo UV záření (Zimmermann 1997). To může způsobovat problémy, např. s nevhodným načasováním aplikace. Při používání mykopesticidů je potřeba, více než u chemických pesticidů, sledovat a hodnotit prostředí a mít určitou míru znalostí a povědomí o jejich vlastnostech. I z toho důvodu je jednou z důležitých součástí zavádění biologických přípravků do praxe poskytnutí doporučení pro správné použití (Faria et al. 2010).

Jak již bylo naznačeno, snaha o využití EH v biointenzivní integrované ochraně musí začínat u samotné houby, resp. jejího kmene. Je známa řada modelů podpory parazitů a predátorů v prostředí, ale modely na podporu mikroorganismů nejsou dosud běžné. Proto je důležité nejprve správně charakterizovat kmen. Pro komerční produkci jsou pak důležitá i další kritéria, která zahrnují schopnost přežívání na daném stanovišti, schopnost růstu a sporulace, genetickou stabilitu a patogenitu (Tarocco et al. 2005).

Většina mitosporických hub je schopna tvořit více rozmnožovacích struktur. U EH používaných v praktické biologické ochraně se jedná hlavně o konidie nebo blastospor. Produkce obou forem se liší způsobem kultivace a rovněž její náročností a ekonomickou rentabilitou. Pro pokusy v hlavní části předkládané dizertační práce byly zvoleny vzdušné konidie, které jsou silnostěnné se schopností vydržet v širokém rozpětí podmínek prostředí (Daoust, Roberts 1983). Při produkci infekčních jednotek hub bylo využíváno jejich schopnosti střídání parazitický a saprotrofní vývojový cyklus.

Projekt byl zaměřen na využívání EH v konceptu lokálních kmenů a stabilizaci ekosystému s důrazem na prevenci. Neměl ambice dávat návod na vývoj biopreparátů, ale spíše ukázat možnosti využívání lokálních kmenů v širším měřítku. Práce spočívala v podrobném popsání vybraného kmene houby *B. bassiana*, jeho schopnosti saprotrofního růstu na různých substrátech, uchovávání v rozdílných podmínkách prostředí bez výrazného ovlivnění jeho vlastností a v poslední části i stimulaci rychlosti vývoje prostřednictvím různé teploty produkce. Pro poskytnutí uceleného pohledu na danou problematiku bylo provedeno krátké srovnání s dalšími kmeny houby *B. bassiana* a dvěma kmeny hub *I. fumosorosea* a *M. anisopliae*. Vzhledem k předpokládanému možnému využití v polních podmínkách byla provedena studie týkající se předaplikační přípravy.

Hodnocení vitality a virulence v in vitro podmínkách prostřednictvím standardních laboratorních testů

Při hodnocení vitality a virulence houby *B. bassiana* byla věnována velká pozornost vývoji houby, který mohl mít značnou vypovídací hodnotu o postupu vývoje a potenciální možnosti šíření infekce. Při práci byly využívány dva velice důležité testy. Jedním z nich bylo hodnocení vývoje houby na vodním agaru, který je hodnocen pomocí indexové stupnice GI (Growth Index), druhým pak vývoj houby v a na larvách potměníka moučného hodnocený rovněž podle indexové stupnice, v tomto případě FDI (Fungus development index). Obě stupnice jsou tvořeny 7 stupni, rozlišenými po půlstupních v rozmezí od 0 do 3. Index 0 znamená, že houba nejeví žádné známky vitality, respektive virulence. Popis obou fenoménů je velmi podobný. V zásadě jde o vyjádření schopnosti houby iniciovat a následně realizovat kompletní vývojový cyklus. Na počátku hodnocení GI stojí dormantní konidie, která nevykazuje žádné morfologické změny v době pozorování a je tudíž označena indexem 0. Těsně před klíčením začíná spora bobtnat díky absorpci vody a její objem se může zvětšit 2-6 krát, v závislosti na druhu (Voelz, Niederpruem, 1964, Gottlieb, Tripathi, 1968). U druhu *B. bassiana* je nápadné bobtnání konidie znakem její vitality (Goettel et al. 2000) a pokud se na jejím konci objeví klíček, který dosahuje maximální délky 1/2 spory, hodnotí se projev indexem 0,5 a spora je označena za živou (= klíčivou). Ovšem to, že spora začne klíčit, nemusí nutně znamenat, že realizuje celý vývojový cyklus. V průběhu prodloužení klíční

hyfy a jejího větvení bereme v potaz její délku, podle které přiřazujeme indexy 1,0; 1,5 a 2,0. V případě, že se klíčící hyfa začíná větvit, je reálný předpoklad, že dojde k tvorbě konidioforů a prvních konidií. Pohybuje-li se počet nově vytvořených konidií od 1 do 3, je přiřazen index 2,5. Hodnota GI 3 odpovídá plně vysporulovanému konidioforu. Díky vytvoření sporulujícího mycelia je houba schopna šířit se v prostředí a vytvářet zdroj infekce.

Co se týká hodnocení virulence houby *B. bassiana* na larvách *T. molitor*, nelze ji shrnout pouze údajem o mortalitě, ale znalost vývoje houby nám umožňuje širší porozumění průběhu nákazy. Význam jednotlivých stupňů v indexové stupnici je poněkud odlišný od stupnice GI. První zásadní odlišnost spočívá v tom, že indexy 0-1 jsou hodnoceny jako projevy larvy, nikoli samotné spory. Stejně jako v předchozím případě značí i FDI 0 nečinnost houby a larva zůstává bez jakýchkoli známek infekce. Hmyz napadený houbou vykazuje jako první příznaky drobné černé melanizační skvrny na povrchu kutikuly (Weiser 1991) a tento projev je v používané indexové stupnici charakterizován indexem 0,5 a jedná se o první známky vitality konidií (Landa et al. 1994). Obecně houba penetruje tenčí, nesklerotizované části kutikuly nebo prorůstá přirozenými otvory (Zimmermann 2007). Při objevení skvrn, se nutně nemusí jednat o důkaz houbové infekce. Ten není potvrzen ještě ani v dalším stupni FDI 1, kterým jsou označovány mrtvé larvy, nebo larvy vykazující velmi nízkou vitalitu. Po usmrcení hostitele začíná houba saprotrofní fázi svého vývoje charakterizovanou objevením mycelia na povrchu těla hostitele (Zimmermann 2007). Tato fáze značí kolonizaci hostitele, je nevratná a hmyz už se nedokáže zotavit z infekce (Landa et al. 1994). V takové fázi je přiřazován FDI 1,5. Z důvodu velkého významu tohoto údaje byl v práci hodnocen čas potřebný pro dosažení hodnoty FDI 1,5. Snaha zajistit co nejrychlejší průběh infekce až do fáze objevení mycelia je zřejmá z důvodu potlačení populace hmyzího škůdce. Další fáze vývoje jsou sice rovněž důležité a značí schopnost houby šířit se v prostředí. Pokud je izolát schopen efektivně usmrcovat dospělce, ale neprodukuje konidie, pak není schopen zajistit stabilní úroveň infekce (McGuire et al. 2005). Saprophytická fáze patogena končí jeho úplnou sporulací (Osborne, Landa 1992). Čím více spor je vytvořeno, tím je dosaženo vyššího stupně supresivity prostředí.

Optimalizace produkce entomopatogenních hub pro využití v biointenzivní integrované ochraně rostlin

Kultivační médium a způsob kultivace mohou významně ovlivnit klíčivost, myceliální růst a virulenci hub používaných jako mykoinsekticidy (Fargues, Robert 1983, Lane et al. 1991). Tato hypotéza stála na počátku dílčí části práce, která si nedávala za úkol masovou produkci, ale pouze namnožení biomasy 6 různých kmenů houby *B. bassiana* se zvláštním důrazem na kmen Bba I101, aniž by došlo k negativnímu ovlivnění vitality a virulence spor a zároveň byly vynaloženy co nejnižší prostředky. Protože je schopnost houby *B. bassiana* růst a produkovat konidie na umělých médiích jednou z hlavních výhod při vývoji komerčních produktů na bázi této houby (Bidochka et al. 2000) bylo zároveň dílčím cílem porovnat výtěžnost kmene Bba I101 na běžně používaných umělých živných půdách. Jako důkaz univerzálnosti používaných postupů bylo provedeno srovnání s dalšími dvěma druhy entomopatogenních hub (*M. anisopliae* a *I. fumosorosea*).

U mnoha druhů EH je růst, produkce spor a jejich klíčivost velmi výrazně ovlivněna médiem, teplotou a zároveň i izolátem (Ali-Shtayeh et al. 2002). V první fázi práce byl tedy zkoumán vliv přirozených substrátů na kvantitativní a kvalitativní parametry spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101, které byly následně porovnány s dalšími pěti kmeny této houby. Produkce konidií je obvykle realizována na substrátech jako jsou obiloviny, rýže nebo jiné substráty se škrobovým základem (Goettel, Roberts 1992, Feng et al. 1994, Grimm 2001). Pro vyhodnocení schopnosti houby *B. bassiana* růst saprotrofně v in vitro podmínkách bylo

zvoleno pět obilovin (kroupy, rýže, ječmen, pšenice a oves) a jedna olejnina (řepka). Z hlediska výtěžností, bylo nejnižší množství získaných spor po 7 denní kultivaci zaznamenáno po kultivaci na ječmeni a pšenici ($1,56$ a $1,62 \times 10^8$ spor/g), naopak nejvyšší hodnoty výtěžnosti byly zjištěny u spor získaných z rýže a krup ($3,89$ a $2,27 \times 10^9$ spor/g). V průběhu 14 denní kultivace bylo u ovsa zjištěno snížení produkce, u všech ostatních substrátů byl vývoj opačný a produkce se zvýšila, u některých téměř na dvojnásobek hodnoty zjištěné po 7 dnech (řepka, ječmen, pšenice). Přesto však ječmen ani pšenice nedosáhli úrovně 10^9 spor/g substrátu. To, že je možné obiloviny využívat i pro produkci většího objemu spor dokazují studie, které provedli Sahayaraj a Namasivayam (2008), kteří ovšem dosáhli při svých pokusech poněkud odlišných výsledků, kdy zjistily, že nejvyšší produkce spor houby *B. bassiana* byla dosažena na pšenici ($1,18 \times 10^8$ spor/g substrátu) a byla srovnatelná s výtěžností spor zjištěnou na rýži ($1,12 \times 10^8$ spor/g substrátu). Sharma et al. (2002) došli k závěru, že rýže je nejvhodnější obilninou pro produkci houby *B. bassiana* a dá se používat i pro produkci dalších deuteromycet. Rýže je zřejmě jedním z nejpoužívanějších substrátů pro produkci spor mitosporických hub jak popisuje řada autorů (Goettel, Roberts 1992, Ye et al. 2006, Posada-Flórez 2008). Na těchto příkladech se ukazuje, že houby *B. bassiana* je schopna produkovat velké množství spor i při použití velmi levných substrátů, které je schopna v některých případech úplně rozkládat, jak popisuje Posada-Flórez (2008), že při pozdějším sklizení spor z rýže se snižovala efektivita získávání, což bylo dáno prorůstáním houby obilkami (spory byly sklizeny v rozmezí 15-45 dnů). Stejný jev se ukázal i v pokusech předkládaných v této práci, což naznačuje velmi silný potenciál EH využívat a rozkládat organické zbytky v půdě.

Pro optimalizaci růstu houby *B. bassiana* je důležité stanovit rovněž teplotní limity kultivace (Shimazu 2004). Jak bylo dříve uvedeno, jsou nároky každého kmene EH odlišné a do jisté míry závislé na podmínkách prostředí odkud kmen pochází. S respektem k tomuto faktu, byla provedena i studie růstu houby *B. bassiana* kmen Bba I101 ve třech různých teplotách. Teplota 20°C je obecně považována za optimální pro růst houby *B. bassiana* a teploty 10 a 30°C tvořily suboptimální podmínky. Přesto bylo i v podmínkách ležících mimo optimum pro daný druh houby zjištěna vysoká výtěžnost kvalitních spor kmene Bba I101 a jako nejvhodnější substrát pro jejich produkci se projevil kroupy. O univerzálnosti využití krup jako kultivačního substrátu svědčí i testy prováděné s dalšími kmeny houby *B. bassiana*, ve kterých byla zjištěna výtěžnost v rozmezí $6,8 \times 10^9$ - $1,94 \times 10^{10}$ spor/g substrátu. Výsledky pocházejí z hodnocení 5 různých kmenů. Z výsledků je patrné, že při použití méně 3 kg krup je možné vyprodukovat dostatečné množství biomasy na ošetření 1 ha plochy. Stejně tak bylo na tomto substrátu možné úspěšně vyprodukovat i další mitosporické houby *I. fumosorosea* ($8,02 \times 10^9$ spor/g substrátu) a *M. anisopliae* ($9,61 \times 10^8$ spor/g substrátu). Vysoké produkce spor houby *B. bassiana* jsou dosahovány částečně také proto, že v porovnání s ostatními entomopatogenními houbami jsou její konidie menší (Wraight, Carruthers 1999). Jak však bylo ukázáno, neplatí toto tvrzení doslova. Pro srovnání, Sahayaraj a Namasivayam (2008) hodnotili 6 obilnin a dosáhli výtěžnosti u *I. fumosorosea* $8,76$ - $10,37 \times 10^8$ spor/g, což jsou hodnoty o řád nižší, než jakých bylo dosaženo v prezentovaných hodnoceních.

Při nízkoobjemové produkci spor však není výtěžnost jediným požadavkem. Protože se jedná o produkci biomasy, která má být reintrodukována zpět do prostředí s cílem sloužit jako preventivní opatření proti výskytu škodlivého hmyzu, musí spory dosahovat určité kvality. V tomto ohledu se ukázala pšenice jako nejméně vhodný substrát, protože u získaných spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 byla po 24 hodinách zjištěna nejnižší klíčivost (81,8% po 7 dnech, po 14 dnech dokonce pouze 71,6%). Klíčivost spor získaných z ostatních substrátů se po 7 dnech kultivace pohybovala nad 93%, po 14 dnech byla vyšší než 84%. Kvalita vyprodukovaných spor hodnocená z pohledu klíčivosti byla po 7 denní kultivaci vyšší oproti sporům sklizeným až po 14 dnech. Podobné hodnoty klíčivosti zjistil i

Posada-Floréz (2008), v jehož testech měly spory houby *B. bassiana* získané z rýže klíčivost více než 80%, mírně se lišila u jednotlivých použitých kmenů. Hodnocení kvality spor bylo provedeno i z pohledu virulence proti larvám *T. molitor*. Pro její vyhodnocení byly, vzhledem k předchozím ukazatelům, použity pouze spory získané z rýže, krup a řepky. V rámci mortality nedošlo k ovlivnění schopnosti spor vyvolat mortalitu v populaci cílového organismu. Zjištěné hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 93,3% (při použití spor z rýže) do 100%. To, že použití obilovin pro kultivaci houby *B. bassiana* nemá negativní vliv na jejich virulenci, prokázal i Posada-Floréz (2008), který hodnotil mortalitu brouků *H. hampei* vyvolanou houbou *B. bassiana*, jejíž spory byly získány z rýže (mortalita 92,5%).

V případě umělých živných médií jsou EH výrazněji ovlivněny použitým médiem (Derakhshan et al. 2008). Vlastnosti a výše produkce spor závisí právě na výběru vhodného složení živného média. V běžné laboratorní praxi je používáno několik standardních agarizovaných živných půd, které se ovšem mohou výrazně lišit z hlediska vlivu na fenotypový projev kultur a na vlastnosti vyprodukovaných spor. Tento fakt prezentovaný jako radiální růst kultury svědčí i o tom, že EH jsou schopny v závislosti na dostupných živinách odlišnou rychlostí kolonizovat prostředí. V práci bylo hodnoceno 5 základních umělých živných půd. Mezi jednotlivými půdami byly zjištěny velmi výrazné rozdíly ve velikosti kultur i v množství vyprodukovaných spor. Ali-Shtayeh et al. (2002) popsali vliv média na radiální růst několika druhů entomopatogenních hub. Při použití médií PDA, CMA, CZ a SDA byly zjištěny výrazné odlišnosti v rychlosti růstu. To se potvrdilo i v předkládané práci, kde byl průměr kultur dosažený s houbou *B. bassiana* kmen Bba I101 nejmenší na živné půdě PDA (45,67mm) a největší na CZ (69,92mm). Naopak výtěžnosti na 1mm² kultury byly v opačném pořadí, nejvyšší na půdě PDA (7,84x10⁶ spor/mm²) a naopak nejnižší na CZ (4,07x10⁵ spor/mm²). To svědčí o závislosti růstu a sporulace EH na složení média, potažmo prostředí. Pro prostředí, které je vhodné pro rychlejší růst kultur, umožňuje i jejich rychlejší šíření a zajištění vyšší supresivity prostředí. Produkce konidií houby a jejich velikost je výrazně ovlivněna použitým kmenem, což uvádí Safavi et al. (2007), kteří zjišťovali výtěžnost různých kmenů houby *B. bassiana* na různých médiích. Aiuchi et al. (2008) došli ke stejnému závěru i u houby *L. lecanii*.

Rychlost růstu mycelia, stejně jako kvalita a kvantita získaných spor, závisí nejen na použitém živném médiu, ale i na kmenu EH. Z výzkumů, které prováděli Ali-Shtayeh et al. (2002) vyplynulo, že za laboratorních podmínek je optimální radiální růst mycelia, produkce konidií entomopatogenních hub a jejich klíčivost závislé na kultivačním médiu a teplotě. Radiální růst mycelia u všech vybraných izolátů hub dosáhl nejlepších výsledků na CMA a PDA. Naopak Kamp a Bidochka (2002) zjistili, že na substrátech chudých na dusík (CMA, NA) byl velmi sporý myceliální růst a bylo vyprodukováno pouze malé množství konidií. Schopnost deuteromycet, zvláště *B. bassiana* a *M. anisopliae* růst na médiích obsahujících pouze sacharozu, dusík a minerální komponenty uvádějí Iskandarov et al. (2006). Velikost vytvořených kolonií nesouvisí vždy s množstvím vyprodukovaných spor.

Co se týká virulence spor, jsou podle Kryukova et al. (2010) kmene tvořící hladké moučné kolonie nejvíce virulentní a nejslibnější z hlediska masové kultivace, zatímco kultury s povrchem plstnatým nebo podobným bavně vykazaly nižší virulenci a slabší sporulaci. Houba *B. bassiana* kmen Bba I101 prokázala na půdě PDA vysokou výtěžnost i vitalitu, potažmo virulenci spor. Klíčivost spor *B. bassiana* kmen Bba I101 získaných na jednotlivých médiích se pohybovala v rozmezí 29-96,5% (na V8A, resp. CMA). Hodnoty klíčivosti zjištěné u spor získaných z půdy V8A se velmi výrazně odlišovaly od ostatních hodnot. Vliv půdy se odlišně projevuje u různých kmenů téže EH. Například v testech prováděných s kmenem Bba I101 na živné půdě CZ, byla zjištěná hodnota klíčivosti 92,5%, naopak u jiného kmene hodnoceného Iskandarovem et al. (2006) byla klíčivost 83,4%. Tudíž se opět vracíme k tomu, že dosažené výsledky jsou charakteristické pro určitý konkrétní kmen a odrážejí

potřebu blíže se zabývat strategií využívání jednotlivých kmenů. Různá nutritivní média mají vliv i na následnou virulenci vyprodukovaných spor k larvám *T. molitor* (Safavi et al. 2007, Shah et al. 2005). Rodríguez-Gómez (2009) objevil zjevnou indukci vyšší virulence houby *B. bassiana* proti *T. molitor* při použití živného média SDA než u jiných mnohem komplexnějších médií.

Zdá se, že kultivační média ovlivňují i povrchové vlastnosti produkovaných konidií (Ibrahim et al. 2002). Na základě všech shromážděných informací a dat zjištěných v průběhu práce bylo pro laboratorní hodnocení houby *B. bassiana* kmen Bba I101 jako nejvhodnější umělé živné médium vybráno PDA vzhledem k vysoké výtěžnosti i vitalitě získaných spor.

Jednou z nevýhod opakovaných kultivací entomopatogenních mitosporických hub na umělých živných půdách je možná nestabilita a ztráta virulence houbových kultur (Vandenberg, Cantone 2004, Shah et al. 2007). To se však nemusí projevit vždy, některé kmeny houby *B. bassiana* jsou schopny si svou virulenci udržet i po dlouhodobé opakované kultivaci *in vitro* (Inglis et al. 2001).

Hodnocení formulací na základě uchování vitality a virulence houby *B. bassiana* v průběhu skladování

Z pohledu krátkodobého respektive dlouhodobého skladování biomasy EH je důležité vytvořit jednoduchou, ale účinnou formulaci, která by uchovala vitalitu konidií. Protože se jedná o živý organismus, je třeba zvolit takové podmínky prostředí, které umožní jeho přežití v období mezi použitím, případně zajistí krátkodobé přežití spor EH při nešetném zacházení. Ani v této části práce se nejednalo o vývoj nákladných a produkčně náročných formulací, ale spíše o ukázkou metodického postupu, jakým lze nativní kmeny uchovávat až po dobu jednoho roku. Jedním z klíčových momentů hodnocení formulace je její skladovatelnost. Z toho důvodu byly všechny testy hodnotící vitalitu a virulenci zasazeny do časové osy, která sledovala vývoj kvalitativních parametrů spor v průběhu jednoho roku. Z průběžných hodnocení vyplynulo, že vitalita skladovaných konidií houby *B. bassiana* kmen Bba I101 byla závislá stejně tak na teplotě jako na použité formulaci. Všechny sledované ukazatele vykázaly více či méně klesající trend ukazatelů vitality a virulence, která byla poměrně výrazně zmírněna nízkými skladovacími teplotami, oproti laboratorní teplotě.

Při finalizaci je jednou ze slibných variant používání inertních nosičů, na jejichž základně jsou vytvořeny práškové formulace, aplikované prášením. Může se jednat např. o drtě vzniklé z fosilií z fytoplanktonu, které se skládají většinou z amorfního oxidu křemíku, který se adsorbuje na kutikulu hmyzu a způsobuje tak usmrcení z důvodu kompletní dehydratace (Korunic 1998, Subramanyam, Roesli 2000, Athanassiou, Steenberg 2007). Je dobře prověřeno, že formulace obsahující tyto nosiče mohou být velmi efektivní proti skladovým hmyzím škůdcům (Subramanyam, Roesli 2000, Fields, Korunic 2000, Athanassiou et al. 2005). Některé inertní nosiče obecně ztrácí aktivitu při vysoké vlhkosti (Subramanyam, Roesli 2000, Vayias, Athanassiou 2004). Na druhé straně entomopatogenní houby klíčí a sporulují právě při relativní vlhkosti kolem 90% (Roberts, Campbell 1977), ačkoliv bylo prokázáno, že houby jsou schopné působit i při nižší vlhkosti, zřejmě díky vhodnému mikroklimatu v okolí hostitele (Ramoska 1984, Akbar et al. 2004). Uváděné kombinace mohou být zajímavou alternativou díky svému doplňkovému působení (Athanassiou, Steenberg 2007).

Stejně jako zkoušení práškových formulací, bylo opodstatněné i hodnocení olejových formulací. Již dříve se ukázalo, že používání olejových formulací zvyšuje účinnost v polních podmínkách a stimuluje klíčení hub nezávisle na okolní vlhkosti (Prior et al. 1998, Batta 2003). Navíc se zdá, že viskózní olejové nosiče zlepšují adhezi konidií na povrch rostlin a

redukuje jejich smyv deštěm (Inyang et al. 2000). Vzhledem k lipofilnímu charakteru spor mohou být v olejích snadněji suspendovány a dosahují vyšší účinnosti, než když se používají ve vodní suspenzi (Bateman et al. 1993, David-Henriet et al. 1998). Zlepšení účinnosti EH po použití olejových formulací bylo prezentováno pro široké množství hmyzích škůdců, včetně sarančat (Lomer et al. 1993; Milner et al. 1994), třásněnek (Van der Pas et al. 1998) a brouků (Ibrahim et al. 1999; Wraight, Ramos 2002). Předpokládá se, že olejové formulace v porovnání s vodními suspenzemi prodlužují přežívání konidií a snižují citlivost k UV záření v porovnání s vodními suspenzemi (Inglis et al. 1995) a poskytují zvýšenou ochranu konidií po aplikaci (Jenkins, Thomas 1996). Čisté oleje mají i repelentní efekt, jak uvádějí Luz a Batagin (2005) v pokusech prováděných s plošticí *Triatoma infestans*.

V předkládané práci byly spory použité do jednotlivých práškových formulací velmi vitální, jejich klíčivost se pohybovala v rozmezí 96,3-97,3%. Hodnoty zjišťované v průběžných testech se lišily podle formulace a zejména v závislosti na skladovací teplotě. V průběhu skladování se však jednotlivé formulace chovaly různě. Např. Kassa et al. (2003c) hodnotili formulace spor v mastku nebo sušeném mléce skladované 4 měsíce ve 4°C a u některých došlo dokonce ke zvýšení CFU, naopak některé ztratily výrazně vitalitu. Životnost vzorků v předkládané studii skladovaných v nízkých teplotách (4 a -20°C) zůstala víceméně nezměněná po celou dobu skladování. Posílení pozitivního vlivu na vitalitu spor kombinací nízké teploty a nutritivního nosiče (dále NN) bylo zřejmé a potvrdily ho nejvyšší hodnoty zjištěné klíčivosti. V teplotě -20°C došlo ke zvýšení klíčivosti konidií po 90 dnech skladování, ovšem ve většině ostatních ukazatelů došlo v tomto hodnoceném úseku spíše k poklesu hodnot. Mnoho autorů uvádí, že pokles teploty zvyšuje životnost konidií houby *B. bassiana* (Stathers et al. 1993, Morley-Davies et al. 1995, Hong et al. 1997), což se potvrdilo i v předkládané práci. Ovšem někteří autoři, jako např. Morley-Davies et al. (1995), varují před příliš nízkými teplotami a pro skladování hub *M. anisopliae* a *B. bassiana* doporučují teploty v rozmezí 0-20°C. Nicméně, toto vymezení skladovací teploty se neprokázalo jako opodstatněné vzhledem k faktu, že v teplotě -20°C byly dosaženy velmi dobré výsledky (klíčivost se pohybovala nad hranicí 80% u všech formulací, s výjimkou inertního nosiče 2 (dále IN2), po celou dobu hodnocení). Consolo (2003) ve své práci zjistil, že životnost konidií ve formulacích skladovaných ve 4°C byla blízko 100% a stabilní po dobu 28 dnů. Alves et al. (1996) ale uvádějí, že po dlouhodobém skladování konidiového prášku v teplotě 6±2°C došlo po 30 měsících ke zpoždění klíčení u konidií houby *B. bassiana* kmen Bb 447. Ani toto zjištění však nebylo potvrzeno v mé práci. Výsledky se naopak shodují se zjištěním Statherse et al. (1993), kteří prokázali, že životnost konidií je mnohem lepší při nízkých teplotách skladování. Hidalgo (1998) toto zjištění potvrzuje a uvádí, že při skladování konidií v práškových formulacích (mastek) nedošlo k výraznému poklesu životnosti. U spor uložených v teplotě 25°C byl po 30 dnech zaznamenán pokles z 90,7 na 83,3%, naopak u spor uložených v teplotě 4°C došlo k mírnému zvýšení klíčivosti na 91,3%. V této dílčí studii bylo zjištěno, že při krátkodobém skladování v laboratorní teplotě (22°C) je velmi výhodné využít jako hlavní součást formulace NN, ve kterém byl pokles vitality imobilizovaných spor pozvolnější. Ovšem při dlouhodobějším skladování došlo ke ztrátě vitality spor postupně ve všech použitých formulacích. Nejrychlejší pokles byl zaznamenán u neformulovaných konidií (dále NK) a IN2. Obecně však konidie skladované ve 22°C ani zdaleka nedosahovaly hodnot zjištěných v obou nízkých teplotách, nejdéle si vyšší hodnoty klíčivosti zachovaly spory formulované v NN (ještě po 60 dnech byl GI 1,55). V nízkých teplotách se při hodnocení GI projevil pozitivní vliv jakékoli formulace oproti NK téměř ve všech hodnocených časových úsecích, zvláště výrazný byl u NN. Lze tedy konstatovat, že pro konidie skladované v teplotách 4°C a nižších je výhodné použít nosič, který chrání spory před vlivem nízké teploty. Ovšem je třeba uvést, že i u NK byla zachována vysoká vitalita v průběhu celého skladování v teplotách 4 a -20°C.

Na testy sledující vliv skladovacích podmínek na vitalitu spor *B. bassiana* kmen Bba I101 navazovala studie virulence, v níž byl sledován vývoj houby *B. bassiana* a mortalita larev *T. molitor* po aplikaci různých formulací spor *B. bassiana* kmen Bba I101. Kolonizace hostitelského organismu houbou je indikována dosažením hodnoty 1,5, kdy houbové hyfy prorůstají na povrch těla hostitele. V prováděných testech byl viditelný rozdíl v účinnosti spor skladovaných ve 22°C a dalších dvou teplotách. Především v případě biotestu založeného s NK nedosáhl vývoj houby hodnoty 1,5 v žádném hodnocení, což souviselo i se zjištěnou mortalitou larev *T. molitor*, která byla v tomto případě velmi nízká (po 365 dnech skladování byla nižší než 20%). Obzvláště po skladování ve 4°C byly zjištěné hodnoty FDI vyšší než 1,8 po 8 dnech biotestu ve všech hodnocených intervalech skladování. Toto zjištění je velmi důležité při vyhodnocování schopnosti EH vyvolat infekci u hmyzu. Rychlejší vývoj houby na hostitelském organismu byl zaznamenán u spor uložených ve formulacích s nutritivním nosičem, což potvrzuje i zjištění Landy et al. (1994), kteří uvádějí, že většina živin zvyšuje hodnoty FDI. Při hodnocení FDI a mortality larev *T. molitor* byl zaznamenán celkový propad hodnot po 90 dnech skladování u všech formulací, zvláště pak při hodnocení po 4 a 6 dnech biotestu. V dalších intervalech už opět hodnoty stoupaly a po 365 dnech skladování byly po 8 dnech biotestu hodnoty na úrovni značící plnou sporulaci na povrchu hostitele prakticky ve všech variantách. V této studii byl prováděn biotest s použitím suspenze, ovšem jak uvádí Lohmeyer et al. (2006) i při použití formulace houby *B. bassiana* v podobě prášku lze dosáhnout vysoké mortality cílového organismu (moucha bodalka) již po 4 dnech.

Součástí práce bylo i hodnocení virulence různých kmenů houby *B. bassiana* formulovaných v inertním nosiči 1 (dále IN1). V těchto testech byl zaznamenán pomalejší nástup infekce vyvolané spory *B. bassiana* kmen Bba I101, v dalším průběhu biotestu se však hodnoty postupně vyrovnaly. Lord (2005) jako první popsal působení houby *B. bassiana* proti larvám menších zrnokazů, *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bruchidae), které bylo znásobeno přítomností křemeliny. Další pokusy, které prováděl Akbar et al. (2004) potvrdily tato zjištění i na larvách potměníka hnědého, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). Na základě zjištěných výsledků lze shrnout, že v případě hodnocení mortality larev potměníka moučného *T. molitor* vyvolané jednotlivými kmeny houby *B. bassiana*, nebyly mezi zjištěnými hodnotami prokazatelné rozdíly. Nejvyššího indexu vývoje FDI bylo dosaženo u kmenů *B. bassiana* NP0005 a NP0028. Ukazatele vitality byly u všech kmenů srovnatelné.

Zjištěná data ukazují na důležitost vlivů formulace a skladovacích teplot na přežívání spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101. Je nezbytné vědět, jak jsou spory ovlivňovány podmínkami skladování. Při porovnání práškových formulací uložených ve všech skladovacích teplotách je možné konstatovat, že nejlepší vliv na zachování vitality a virulence spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 měl NN a výrazně k tomu přispívaly i obě nízké teploty (4 a -20°C), které byly prakticky srovnatelné co do udržení vitality (u teploty -20°C se projevil mírně pozitivnější vliv na hodnocené parametry). Nejhorších výsledků bylo u většiny hodnocení dosaženo s IN2, který do jisté míry koreloval s NK. Co se týče skladování ve 22°C, byl klesající trend všech hodnocených ukazatelů nejstrmější. To částečně potvrzují i Daoust a Roberts (1983), kteří zjistili, že neformulované spory vykazovaly nízkou stabilitu v laboratorní teplotě. Pereira a Roberts (1990) uvádějí, že blastosporý a mycelium mnoha druhů entomopatogenních hub mohou přežít vysoušení a formulování do mikrobiálních insekticidů, nicméně po několika měsících začnou při pokojové teplotě ztrácet životnost.

Poněkud jiná situace nastala u olejových formulací spor *B. bassiana* skladovaných v teplotě 22°C. Zde byla sice počáteční klíčivost konidií o něco nižší, než tomu bylo u práškových formulací, ale spory si dokázaly udržet vyšší klíčivost i po 365 dnech skladování. Stejně jako Kassa et al. (2003a) jsme nezjistili žádné ovlivnění vitality a rychlosti klíčení spor ihned po formulaci do olejů. Spory imobilizované v sójovém oleji (dále SO) měly na počátku

nižší klíčivost v porovnání se sporami ve zbylých dvou olejích, ovšem v průběhu skladování v SO byly zjištěny nejmenší poklesy v klíčivosti a po 365 dnech byla její hodnota nejvyšší (51,5%). Stejně tomu bylo i při hodnocení GI, jehož hodnoty byly po ukončení testů v rozmezí 0,07 (ŘO) - 0,95 (SO). Mortalita larev *T. molitor* byla vysoká, po 365 dnech skladování dosáhla 93,3-100%, k čemuž výrazně přispěla mortalita způsobená samotnými oleji. Zjištěné FDI bylo minimálně 2,42 i po 365 dnech skladování. V rámci zachování virulence se tudíž neprojevil vliv druhu použitého oleje. Consolo (2003) používal pro formulaci spor 5% kerosen s kukuřičným, slunečnicovým a řepkovým olejem a nezjistil žádné statisticky průkazné rozdíly v životnosti konidií ve spojitosti s typem oleje nebo teplotou skladování, což se potvrdilo i v předkládané práci.

Při porovnání olejových a práškových formulací skladovaných v teplotě 22°C lze jednoznačně konstatovat, že při dlouhodobém skladování bez možnosti využití snížené teploty je výhodnější použít jako základ formulace olej. Vitalita po 365 dnech skladování byla srovnatelná pouze u NN a řepkového oleje, který dosáhl nejnižších hodnot klíčivosti v rámci olejů. Vývoj houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na larvách byl nesrovnatelně rychlejší a mortalita vyšší při použití olejových formulací, kde nejhorší výsledek po 8 dnech biotestu byl dosažen při použití SO (93,3%), narozdíl od práškových nosičů, kde byly nejvyšší hodnoty u NN a IN1 a to pouze 19,98%. Brito et al. (2008) rovněž uvádějí, že přídavek slunečnicového oleje výrazně zvýšil mortalitu brouků *Conotrachelus psidii* (nosatcovití) u tří ze 7 hodnocených izolátů *M. anisopliae* a *B. bassiana*, v porovnání se sporami aplikovanými pouze v suspenzi se smáčedlem Tween 80 (0,01%).

O univerzálnosti a využitelnosti formulace spor v NN svědčí i možnost ji použít pro další druhy entomopatogenních hub jako je *M. anisopliae* a *I. fumosorosea*, které vykazaly vyšší vitalitu v porovnání s komerčně dostupnými preparáty. V průběhu pokusů se tedy jednoznačně prokázalo, že vytvořené formulace jsou životaschopné a tvoří jednoduchou cestu k uchování spor původního kmene houby *B. bassiana*.

Předaplikační příprava postřikové jichy z práškové formulace spor houby *B. bassiana*

Konidie hub s hydrofobní buněčnou stěnou, jako je *B. bassiana*, *I. fumosorosea* nebo *Nomuraea rileyi* je složité rovnoměrně smáčet ve vodě. Navíc většina entomopatogenních hub infikuje hostitele přes kutikulu, tudíž je pro úspěšné ošetření nutné zasažení cílového organismu (Noma, Strickler 2000). Z tohoto důvodu byly prováděny testy na možné použití smáčedel při přípravě konidiové suspenze houby *B. bassiana*, jejíž spory byly imobilizovány v nutritivním nosiči. Základním požadavkem bylo vytvoření homogenní suspenze spor, aniž by došlo k negativnímu ovlivnění jejich vitality. Pro testy byla zvolena běžně dostupná smáčedla použitelná v ekologickém zemědělství.

Toxicita surfaktantů pro mikroorganismy je spojená s procesem, při kterém dochází k ničení membrán. Tato vlastnost může záviset na délce alkylových řetězců. Kvalitativní a kvantitativní složení mastných kyselin, které jsou součástí rostlinných olejů a surfaktanty, stejně tak jako složení hmyzí epikutikuly, ovlivňují vývoj EH (Luz, Batagin 2005). Jak uvádí Jaronski (2010), je účinnost preparátu závislá na počtu spor, které přijdou do kontaktu s hostitelem. S tímto faktem úzce souvisí i rovnoměrné rozptýlení spor v suspenzi. Mezi jednotlivými hodnocenými smáčedly existovaly rozdíly již v počátečním hodnocení homogenity vytvořené suspenze, což vedlo k vyřazení některých smáčedel z dalších testů. Požadavky na tvorbu suspenze splnilo jedno smáčedlo na bázi řepkového oleje a jedno na bázi parafinového oleje. Obě smáčedla byla testována až v 5% koncentraci a ani u jednoho nedošlo k limitujícímu poškození spor. Z důvodu zachování vyššího počtu vitálních spor a z důvodu vytvoření dokonale homogenní suspenze bylo zvoleno smáčedlo na bázi metylesteru řepkového oleje s obchodním názvem Istroekol.

Sledování kvalitativních a kvantitativních parametrů v souvislosti s produkční teplotou inokula houby *B. bassiana*

Mezi houbovými entomopatogeny i mezi izoláty téhož druhu jsou výrazné rozdíly v toleranci k teplotě (Ying, Feng 2004, Rangel et al. 2005, Bugeme et al. 2009). Z tohoto tvrzení vycházely i cíle poslední dílčí části práce, jejímž účelem bylo postihnout vliv produkčních podmínek na kmen houby *B. bassiana* Bba I101. V průběhu testů bylo prováděno několik dílčích hodnocení, která měla ukázat, zda kmen, který byl odizolován z oblasti s průměrnou roční teplotou přibližně 4°C nějakým způsobem ovlivněn svým geografickým původem. Produkce spor v rámci pěti různých konstantních teplot měla prokázat, zda lze ovlivnit kvalitativní nebo kvantitativní vlastnosti kultur. Pokud porovnáme vitalitu zjištěnou v jednotlivých variantách na základě klíčivosti spor a GI, lze konstatovat, že spory v teplotách 20, 25 a 30°C dosáhly více než 90% klíčivosti po 24 hodinách bez ohledu na teplotu, při které proběhla produkce inokula. Tyto výsledky víceméně potvrzuje i Ekesi et al. (1999), který pracoval s kmeny pocházejícími z Keni a USA.

Houba *B. bassiana* kmen Bba I101 rostla i v nejnižší testované teplotě 10°C, došlo pouze ke zpomalení vývoje oproti ostatním hodnoceným teplotám. To že spory houby *B. bassiana* jsou aktivní i v nízkých teplotách potvrzuje i Fernandes et al. (2008), který prováděl pozorování v teplotě 5°C. V případě hodnocení v 10°C však bylo i přes delší čas potřebný ke klíčení, dosaženo plné klíčivosti stejně jako u dalších variant. Důležitým bodem této studie však bylo to, že byl pozorován vliv teploty na průběhu produkce inokula a následnou rychlost vývoje spor. Spory produkované v 10°C dosáhly 100% klíčivosti a potažmo 100% sporulace po 72 hodinách od zahájení testu, zatímco při použití spor vyprodukovaných v teplotě 25°C se doba potřebná pro klíčení prodloužila až na 192 hodin. Rychlost vývoje houby *B. bassiana* kmen Bba I101 tedy prokazatelně závisela na teplotě produkce spor.

Stejný jev se opakoval i v případě GI hodnoceného v průběhu kultivace v 10 a 15°C, kde byla rychlost vývoje houby opět pozitivně ovlivněna nízkou teplotou produkce. Vyšší rychlost klíčení je v některých případech spojena s vyšší virulencí (Andersen et al. 2006). Vliv teploty produkce na termotoleranci konidií houby *B. bassiana* byl studován i dvojicí autorů Ying a Feng (2006), kteří tuto závislost demonstrovali ve své práci, kde uvádí, že nejvíce termotolerantní konidie byly získány produkcí v teplotě 25°C. Toto zjištění se ovšem úplně neshoduje s předkládanými závěry, které ukázaly, že nejpozitivnější vliv na rychlost klíčení spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 měly teploty 10 a 15°C. U vyšších kultivačních teplot, tedy 20, 25 a 30°C byly hodnoty získané s použitím spor produkovaných v různých teplotách více vyrovnané, zvláště pak v teplotě 25°C nebyl zaznamenán praktický dopad teploty produkce inokula na následný růst a vývoj. Zde se projevil fakt, který uvádí Jaronski (2010), že optimem pro klíčení a růst entomopatogenních hub je rozmezí 23 až 28°C, obecně se rychle zpomaluje při teplotách nad 30°C a úplně ustává při teplotě 34-37°C. Iskandarov et al. (2006) zaznamenali při kultivaci v teplotách 15-35°C viditelný nárůst klíčivosti oproti kultivaci v 10°C, kde po 50 hodinách klíčilo pouze 5-10% spor. U hub *B. bassiana* a *M. anisopliae* byla prokazatelná závislost optimální teploty pro klíčení na izolátu houby (Kassa et al. 2003b). Tudíž i teplotní poměry vyhovující kmeni Bba I101 nemusí splňovat nároky jiných kmenů stejného druhu.

Rozdíly mezi jednotlivými produkčními teplotami byly nejvýraznější u radiálního růstu po 21 dnech kultivace ve 20 a 25°C. Průměr kultury se pohyboval mezi 36,9 a 50,9mm ve 20°C a 40,1 a 54,0 ve 25°C (největší kultury byly získané po produkci inokula v teplotě 30°C). V ostatních teplotách byly hodnoty mnohem vyrovnanější a nelze říci, že by některá produkční teplota měla výrazně pozitivní vliv na radiální růst kultur. Odlišná situace nastala u množství vyprodukovaných spor. Hodnoty ukazující, že množství spor získaných z 1mm²

kultury byly prakticky vyrovnané v teplotách 15, 20 a 25°C bez ohledu na teplotu, ve které probíhala produkce inokula. Nejvyšší výtěžnost spor na 1mm² byla získána při použití kombinace teplot 25°C pro produkci a 20°C pro následnou inkubaci (5,73x10⁶ spor/mm²). Hallsworth a Magan (1999) rovněž uvádějí teploty 20 a 25°C jako nejvhodnější pro růst kultur houby *B. bassiana*. Při kultivaci ve 30°C bylo nejvyšších hodnot výtěžnosti dosaženo po použití spor získaných v teplotě 15°C. Obecně byl však v této teplotě velmi nízký výnos spor, což má souvislost s původem kmene, který není adaptován na vysoké teploty. V parametru hodnotícím výtěžnost spor se výsledky získané kultivací v 15°C neshodují s Ekesim et al. (1999), kteří zjistili, že růst v 15°C je pomalejší a srovnatelný s růstem ve 35°C. Shimazu (2004) rovněž uvádí jako optimální teploty pro růst mycelia houby *B. bassiana* kmen F-263 přibližně 30°C, což stejně jako předchozí autor nesouhlasí se zjištěnými hodnotami u kmene Bba I101, ale odpovídá výsledkům dosaženým u kmene USA Bba 01 pocházejícím z Floridy, který byl v testech použit pro dokázání vlivu původu kmene na jeho následné vlastnosti. Tefera a Pringle (2003) však potvrdili dosažené výsledky svým zjištěním, že interakce mezi teplotou a izolátem ovlivňující sporulaci jsou průkazné a optimální teplota pro sporulaci je v souvislosti s testovaným kmenem 20 nebo 25°C. Při porovnávání výsledků s ostatními autory je zjevně důležité hovořit o vlivu teploty na chování houby ve spojení s jejím původem. Autoři pracující s kmeny hub získanými z teplejších oblastí potvrdili, že teplotní optimum pro tyto kmeny se pohybuje ve vyšších hodnotách (Hallsworth a Magan 1999, Shimazu 2004, Jaronski 2010). Např. Kassa et al. (2003b) zjistili, že žádný z izolátů EH získaných v Etiopii (včetně 2 izolátů houby *B. bassiana*) nerostl v teplotě pod 10°C. Nelze tedy ignorovat teplotní podmínky panující v prostředí, odkud byl kmen izolován a těmto podmínkám přizpůsobit teplotu produkce, čímž lze dosáhnout zlepšení některých kvalitativních a kvantitativních parametrů.

Zjištění, že snížením teploty produkce inokula lze zvýšit následnou produkci spor je velmi důležité zvláště z pohledu samotné ekologie houby *B. bassiana* a následného využití této znalosti při produkci spor reintrodukovaných zpět do původního areálu. Luz et al. (1999) potvrzuje, že schopnost produkovat dostatečné množství konidií znamená vyšší potenciál pro šíření houby mezi hmyzem. Podaří-li se tedy zajištěním optimální teploty produkce pozitivně ovlivnit kmen houby ve směru zvýšení produkce spor, výrazně to přispěje k úspěšné introdukci a následnému šíření EH v ekosystému. Jedná se o predispozici vázanou na kmen jako klíčovou entitu a tím i o potvrzení strategie záměrné podpory lokálních kmenů. Jednotlivé druhy hub jsou schopné adaptace na měnící se podmínky prostředí pomocí regulace svého fyziologického stavu. Optimalizací podmínek produkce lze tedy zajistit navození požadovaných vlastností u houbových bioagens (Frey, Magan 2001, Ibrahim et al. 2002). Vzhledem k tomu, že množství inokula je jedním z limitujících faktorů pro vývoj houbových epizootií (Castrillo et al. 2010) je tato otázka klíčová při používání EH a následného hodnocení jejich účinnosti.

Kromě množství vyprodukovaných spor je i důležitá jejich následná účinnost (virulence). Ta byla hodnocena na larvách *T. molitor*. V průběhu byla sledována nejen účinnost jako taková, vyjádřená mortalitou larev potěmníka moučného, ale také index vývoje houbového patogena podle stupnice modifikované na základě práce Landy et al. (1994). V průběhu biotestů se objevily výrazné rozdíly ve vývoji houby související s teplotou. Ve 20 a 25°C byla sporulace na larvách viditelná po 10-16 dnech. V teplotě 10°C dosáhly plné sporulace pouze varianty založené se spory získanými z teploty 10 a 15°C po 20 dnech biotestu. Ve 30°C byl vývoj houby výrazně zpomalen vlivem teploty a hodnoty nedosáhly v žádné variantě FDI 3. Hodnoty indexu se pohybovaly mezi 1,5 (produkce ve 25 a 30°C) a 2,3 (produkce v 10°C). Vliv izolátu a teploty na mortalitu cílového organismu uvádí i Bugéme (2009) na příkladu *T. urticae*. Narozdíl od předkládaných hodnocení byly jím zkoumané izoláty z Keni vitálnější a virulentnější ve vyšších teplotách (až 35°C). U kmene Bba I101 se

z hlediska virulence projevilo jako výhodné produkovat spory v nízkých teplotách. V průběhu hodnocení floridského kmene USA Bba 01 byla zaznamenána vyšší rychlost vývoje na larvách *T. molitor* ve vyšších teplotách. Také Inglis et al. (1996) i Tefera a Pringle (2003) vyhodnotili jako nejvhodnější teploty pro rozvoj infekce 25 a 30°C. Tudíž se jasně projevuje vliv původu každého jednotlivého kmene na jeho následné vlastnosti, které lze vhodnými kultivačními podmínkami pozitivně podpořit.

V předchozích částech již bylo zmíněno, že naprosto klíčovým momentem je prorůstání mycelia na povrch těla larev *T. molitor*. Tato hodnota je označena FDI 1,5 a doba potřebná pro jeho dosažení je velmi důležitým ukazatelem konce parazitické vývojové fáze v hostiteli. Je velmi důležité zmínit, že vzhledem k tomu, že kmen Bba I101 pochází z oblasti s nízkou průměrnou roční teplotou je významné co nejvíce zkrátit dobu potřebnou pro růst a sporulaci mycelia. K tomu může přispět i produkce inokula v nízkých teplotách, což se projevilo ve všech kultivačních teplotách při použití spor získaných z 10°C, kdy byl čas potřebný pro dosažení hodnoty FDI 1,5 téměř dvakrát kratší než u inokula získaného z 20°C. Vyjádřeno pomocí mortality, účinnost ošetření byla mezi 90 a 100% v průběhu biotestu. 100% mortality bylo dosaženo již po 6 dnech u testů probíhajících ve 20 a 25°C se sporiami získanými z teplot 10 a 15°C. To, že k účinnosti EH může výrazně přispět teplota v kombinaci s použitým izolátem houby, ukázali Bugéme et al. (2009). U některých kmenů teploty pod 16°C zpomalovaly klíčivost a růst u většiny houbových entomopatogenů a omezily tak účinnost tím, že cílová populace žila déle (Inglis et al. 1999, Ihara et al. 2008). Stejně tak i teploty 35°C mohou redukovat infekci hostitele v porovnání s teplotou 25°C (Noma, Strickler 2000). Tento vývoj lze vidět v prodlužování času potřebného pro dosažení FDI 1,5.

V chování houby se mohou objevovat i výjimky spojené s jejím původem. Uma Devi et al. (2005) objevili kmen pocházející z mírného klimatu, který byl schopen krátkodobě snést teplotu až 43°C. Fernandes et al. (2008) naopak nenašli korelaci mezi vyšší teplotou a původem, ale prokázali, že kmeny houby *B. bassiana* pocházející z vyšších nadmořských výšek byly mnohem více aktivní v chladu než izoláty získané poblíž rovníku. Pro houbu *B. bassiana* je obecně teplotní optimum 23-28°C, minimum 5-10°C a maximum 30-38°C v souvislosti s hodnoceným izolátem (Müller-Kögler 1965, Roberts, Campbell 1977). Tyto výsledky jsou užitečné s ohledem na produkci bioagens se zamýšlenou aplikací do chladnějšího klimatu. V přírodě existují izoláty s vyšší tolerancí k chladu (Li, Feng 2009) a tento atribut je zvýhodňuje oproti ostatním v ochraně proti hmyzu v chladnějším prostředí. Teplotní tolerance by měla být jedním z kritérií výběru kmene pro biopesticidy (Jaronski 2010). Výběr izolátu houby tolerantního k rozmezí teplot panujících v cílovém agroekosystému je nezbytností, má-li být patogen používán v programech biointenzivní integrované ochrany rostlin. Důležitost teploty při výběru kmene zdůraznil i Fargues et al. (1997a). Na závěr lze tedy shrnout, že je velmi důležité soustředit pozornost nejen na druh houby, ale i na její kmen a na původní oblast jeho výskytu, neboť zohledněním těchto faktorů lze vytvořit produkční podmínky zvýhodňující introdukovaný preparát v prostředí, neboť jak uvádějí Quesada-Moraga et al. (2006), pro úspěšnou ochranu je důležité, aby houba byla perzistentní a infekční v prostředí, ve kterém se objevuje cílový škůdce.

Z prováděných pokusů je zřejmé, že houba *B. bassiana* kmen Bba I101 je nejen schopna růst v teplotě 10°C, ale dokonce je zde schopna dokončit celý vývojový cyklus a to jak parazitický, tak i saprotrofní. Pro podporu jejího růstu a vývoje jsou potřebné vhodné zvolené podmínky pro produkci inokula, zvláště pak teplota. Nízké teploty produkce zvýhodňují kmen v následné rychlosti vývoje a v případě použití inokula z produkce probíhající v teplotách pod 20°C bylo rovněž dosaženo vyšší mortality v kratším časovém období.

7. ZÁVĚRY

1. Schopnost saprotrofního růstu, tzn. i kolonizace prostředí, houby *B. bassiana* kmen Bba I101 byla prokázána jak na obilovinách, tak na olejnině. Mezi výtěžnostmi dosaženými na různých substrátech byly zjištěny výrazné odlišnosti. V průběhu kultivace došlo k ovlivnění kvantity a do jisté míry i kvality získaných spor.
2. Virulence spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 vůči larvám *T. molitor* nebyla ovlivněna zvoleným přirozeným substrátem. Získané spory byly schopné vyvolat infekci na larvách.
3. Nejvhodnějším substrátem pro kultivaci většího objemu biomasy 6 kmenů houby *B. bassiana* a 1 kmene houby *M. anisopliae* a *I. fumosorosea* byly kroupy, které navíc vykazaly i stabilní produkci spor v různých teplotních podmínkách a tím i univerzálnost použití.
4. Při hodnocení umělých živných půd byla demonstrována schopnost houby *B. bassiana* kmen Bba I101 kolonizovat prostředí a tvořit rozmnožovací struktury v závislosti na složení živného média.
5. Z hlediska produkce menších objemů spor byla nejvhodnější živná půda PDA, na které byly zjištěny výborné kvalitativní i kvantitativní vlastnosti spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101.
6. Uchovávání lokálních kmenů houby *B. bassiana* bylo možné úspěšně provádět nejen v práškových, ale i v tekutých formulacích. Z použitých práškových nosičů prokázal jednoznačně nejpozitivnější vliv na uchování kvalitativních vlastností spor nutritivní nosič, nejhorší hodnocení bylo zjištěno u inertního nosiče č.2, který dosahoval v mnoha hodnoceních výsledků srovnatelných s neformulovanými konidii.
7. Pro uchovávání spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 jsou velmi vhodné nízké teploty. Dlouhodobé skladování může úspěšně probíhat až v teplotě -20°C , ve které dosahovaly formulované spory v některých ukazatelích dokonce mírně lepších výsledků, než tomu bylo u skladování ve 4°C . Teplota 22°C se jeví pro dlouhodobější skladování práškových formulací jako nevhodná.
8. Olejové formulace uchovávané v laboratorní teplotě 22°C zajistily sporám houby *B. bassiana* kmen Bba I101 uchování vyšší vitality než práškové formulace. Díky olejové složce byla po jejich aplikaci zjištěna vyšší mortalita cílového organismu, rychlejší vývoj houby *B. bassiana* a její šíření v prostředí.
9. Jako smáčedlo vhodné pro přípravu suspenzí spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 byl zvolen přípravek na bázi metylesteru řepkového oleje, který umožnil vytvoření

homogenní suspenze a neprojevil se žádný negativní vliv na kvalitu spor, ani v několikanásobně vyšší koncentraci než je doporučováno výrobcem na etiketě.

10. Kmen houby *B. bassiana* Bba I101 byl schopen růst v rozmezí teplot 10-30°C. Nejoptimálnějších výsledků z hlediska kvality a kvantity spor bylo dosahováno v teplotách 20 a 25°C, což jsou teploty obecně uváděné jako optimální pro tento druh EH.
11. U houby *B. bassiana* kmen Bba I101 bylo dosaženo ovlivnění některých ukazatelů pomocí správně zvolených podmínek produkce spor korelujících s podmínkami panujícími v původním areálu rozšíření kmene. Tyto aspekty se v některých teplotách zřetelně neprojevily u kvantitativních parametrů. K ovlivnění velikosti kultur a množství spor došlo výrazněji pouze v teplotách 20 a 25°C.
12. Mnohem důležitějším zjištěním je, že u houby *B. bassiana* kmen Bba I101 bylo možné ovlivnit rychlost vývoje. Po produkci spor v nízkých teplotách (10 a 15°C) došlo k urychlení vývoje v následných testech. Ve všech kultivačních teplotách byl prokázán rychlejší vývoj Bba I101 na larvách *T. molitor* u variant, kde byly použity spory získané z 10°C.
13. Schopnost růstu a vývoje dvou různých kmenů houby *B. bassiana* byla závislá na jejich geografickém původu, což se prokázalo při porovnávání kmene Bba I101 pocházejícího z chladné oblasti Šumavy a kmene Bba USA 01, který pochází z Floridy, USA.

8. SUMMARY

Entomopathogenic fungi are very common part of environment present in soil, on plants and in the air as well. They are not obligatorily bound on insect, part of their lifecycle could be realized in a saprotrophic way. And that's the main advantage which makes them promising tool of biological control because of their possible production on natural substrates or artificial media. Wide range of fungal species is used in biological control. There is more than 100 mycoinsecticides based on entomopathogenic fungi registered in many countries of the world, but none of them is registered in Czech Republic nowadays.

In the present work, emphasis on a strategy of local strains and their origin was placed, because each strain carries information associated with adaptation to the environment of its origin. It is associated with the target site for the reintroduction, which may or may not be suitable for applied organism. For this reason, much attention was paid to the selection and evaluation of strain designed for practical application with respect to the location of its intended use. Treatment is carried out mostly by aerial conidia of entomopathogenic fungi. Conidia in vitro are produced on natural substrates, which are cheap and readily available. The mycoinsecticides should be handled and stored in different way than chemical pesticides. Production, formulation and storage, as well as the application itself has to be made in a friendly manner and using appropriate techniques to avoid damage to the qualitative property of the spores. Choosing unsuitable conditions for any sub-component of "mycoinsecticide" preparation can lead to unacceptable damage to the spores which are then not applicable in the biointensive integrated pest management (Bio-IPM). In submitted study the problems connected with production, formulation, storage and improvement of the spore quality due to the production conditions were concerned in respect to the local strain and its use in Bio-IPM. Individual parts of the work were most detailed carried out with fungus *B. bassiana* strain Bba I101 and some findings were compared to other 5 strains of this fungus or two other species *M. anisopliae* and *I. fumosorosea*. Evaluation was done by standard laboratory tests under different environmental conditions. For virulence assessment larvae of *T. molitor* were used and the evaluation proceeded according to the scale adjusted for the purposes of this organism. The topics have been formulated as follows:

1. Optimization of production of entomopathogenic fungi for use in biointensive integrated pest management.
2. Impact assessment of different formulations and storage conditions on vitality and virulence of the fungus *B. bassiana*.
3. Pre-application adjustment of *B. bassiana* spores formulated in powder carrier.
4. Monitoring of qualitative and quantitative parameters connected with the production temperature of spores of the fungus *B. bassiana*.

This study did not give the task of mass production, but only the multiplication of biomass of 6 different strains of fungus *B. bassiana*, with particular emphasis on strain Bba I101, without adversely affecting the vitality and virulence. Selected substrates meet the conditions for their easy availability and low cost. Production of *B. bassiana* spores proceeded on 6 natural substrates and 5 artificial media. Data were generated after 7 and 14 days in case of cultivation on natural substrates and after 21 days on artificial media. The substrates or media were evaluated on basis of spore vitality and production quantity. Volume of spores differed markedly among the assessed media as well as the spore vitality. Quality assessment was performed according to the standard assays. Results showed differences among media.

Based on generated data 3 substrates (peeled barley, rice and rape seed) were chosen into virulence evaluation proceeded on *T. molitor* larvae. No statistical differences appeared among variants. In this study the ability of the fungus *B. bassiana* to realize saprotrophic development in vitro was demonstrated. Regarding the quantity, vitality and virulence of harvested spores, peeled barley was selected as the most suitable substrate for low volume production. Just 3 kg of substrate is enough to produce a sufficient number of spores for treatment of 1ha surface area. Its versatility has been confirmed in testing of different strains of *B. bassiana*, and other two species of entomopathogenic fungi *M. anisopliae* and *I. fumosorosea*. Artificial media evaluated the same way as natural substrates except of virulence assessment expressed differences in quantity and quality as well. On the area of the cultures the ability to colonize and spread in the environment with different amount of nutrients was visible. PDA was chosen to be the most convenient for small scale production or activation of *B. bassiana* strain Bba I101 cultures.

In study of the impact of storage conditions on preservation of viability of *B. bassiana* spores, 4 powder formulations including non-formulated conidia together with 3 oil based formulations were assayed. Storage conditions were a combination of formulation and temperature. Evaluation was based on the ability of chosen formulation to protect the conidia of *B. bassiana* strain Bba I101 exposed to different temperatures over one year. In rated intervals vitality and virulence were assessed according to the standard methodology selected and partly modified for this purposes. Regarding temperatures visible differences appeared among them. Whilst at lower temperatures (4 and -20°C) the decline of vitality indicators was gradual, at 22°C the fall was very rapid. In general at temperature 22°C was a relatively rapid loss of vitality of the *B. bassiana* spores immobilized in powder carriers, but the same conclusions could not be applied on oil formulations where the vitality showed much higher values with exclusion of spores formulated in rape seed oil where the germination of spores was comparable to that formulated in powder nutritive carrier. Regarding the formulation very good results were obtained with nutritive carrier, which demonstrated a positive impact on the vitality of the immobilized spores especially at 22°C, but there were no meaningful differences among formulations at low temperatures. Mortality of *T. molitor* larvae was also influenced by the used formulation. Whilst within powder formulations any relevant differences were found as well as within oil formulations, between the groups of powder and oil formulations big variance appeared. It is possible to conclude, that powder formulations themselves are very practical for use and could be stored at lower temperatures without significant loss of viability, especially with content of nutritive carrier. For storage under laboratory temperature oil formulations are recommended, with particular emphasis on soybean oil. All tested storage conditions showed, that the local strains could be stored in very simple formulations for one year maybe longer which means, that there is quite long time for its multiplication and reintroduction into target ecosystem.

Pre-application mixture based on spores immobilized in nutritive carrier was carried out with few commercial wetting agents. The aim was to prepare homogenous suspension without deterioration in spore quality. One surfactant based on rapeseed oil (commercial name Istroekol) met the requirements very well even when used in much higher concentration than was recommended on label.

The last part of the work concerned on *B. bassiana* strain Bba I101 and possible shift in its development connected with production temperature. The task was to find the most suitable temperature for inoculum production to induce a better adaptation of the spores to target ecosystem. It was an attempt to prove the dependence of geographical origin on the fungal features and it was done due to the comparison of two isolates of the fungus *B. bassiana*, one originating from Šumava National Park and one from Florida. Expression of these two strains differed in many ways particularly in colony diameter in 30°C and mortality

which was faster in 30°C with strain USA Bba 01. But significance for practical use was much higher on the finding that the lower production temperature resulted in faster parasitic cycle of Bba I101 on *T. molitor* larvae when the time needed to achieve Fungus Development Index 1,5 (the critical value for demonstrable infection) shortened markedly. There was also positive influence on some production merits connected with optimization of conditions suitable to production. If we take into consideration the climatic conditions in target locality, where the strain Bba I101 is proposed to be reintroduced, acceleration of infection is contribution, because of the low average annual temperatures.

It is possible to conclude, that the methodology how to maintain local strains determined for use in Bio-IOR was demonstrated. With respect to the origin of the strain, we get better results with its application presenting in a faster development, better environment colonization and better suppressive effect.

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Anonym.(2010). [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_\(hyaline\)/Beauveria/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Beauveria/). 18.10.2010.
- Aiuchi, D., Baba, Y., Inami, K., Shinya, R., Tani, M., Koike, M. (2008). Variation in growth at different temperatures and production and size of conidia in hybrid strains of *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Appl. Entomol. Zool. 43(3): 427–436.
- Akbar, W., Lord, J.C., Nechols, J.R., Howard, R.W. (2004). Diatomaceous earth increases the efficacy of *Beauveria bassiana* against *Tribolium castaneum* larvae and increases conidia attachment. J Econ Entomol. 97(2): 273–280.
- Ali–Shtayeh, M.S., Mara, A.–B.B.M., Jamous, R.M. (2002). Distribution, occurrence and characterization of entomopathogenic fungi in agricultural soil in the Palestinian area. Mycopathologia. 156(3): 235–244.
- Al–Mazra’Awi, M., Kevan, P.G., Shipp, L. (2007). Development of *Beauveria bassiana* dry formulation for vectoring by honey bees *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to the flowers of crops for pest control, Biocontrol Sci. Technol. 17(7):733–741.
- Altieri, M.A. (1994). Biodiversity and pest management in agroecosystems. The Haworth Press. Binghamton. NY. 189 pp.
- Alves, S.B., Pereira, R.M., Stimac, J.L., Vieira, S.A. (1996). Delayed germination of *Beauveria bassiana* conidia after prolonged storage at low, above–freezing temperatures. Biocontrol Sci Technol. 6(4): 575–582.
- Anderson, T.E., Hajek, A.E., Roberts, D.W., Preisler, H.K., Robertson, J.L. (1989). Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): effects of combinations of *Beauveria bassiana* with insecticides. J. Econ. Entomol. 82(1):83–89.
- Andersen, M., Magan, N., Mead, A., Chandler, D. (2006). Development of a population–based threshold model of conidial germination for analyzing the effects of physiological manipulation on the stress tolerance and infectivity of insect pathogenic fungi. Environ Microbiol. 8(9): 1625–1634.
- Athanassiou, C.G., Kavallieratos, N.G., Economou, L.P., Dimizas, C.B., Vayias, B.J. (2005). Persistence and efficacy of three diatomaceous earth formulations against *Sitophilus oryzae* (Coleoptera:Curculionidae) on wheat and barley. J Econ Entomol. 98(4): 1404–1412.
- Athanassiou, C.G., Steenberg, T. (2007). Insecticidal effect of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) in combination with three diatomaceous earth formulations against *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera:Curculionidae). Biol Control. 40(3): 411–416.

-
- Barlett, M.C., Jaronski, S.T. (1988). Mass production of entomogenous fungi for biological control of insects. In: Burges, H.D. (Ed.). Microbial control pests and plant diseases. Academic Press. New York. 60–85.
- Bateman, R.P., Alves, R.T. (2000). Delivery systems for mycoinsecticides using oil-based formulations. Aspects of Applied Biology. Pesticide Application. 57: 163–170.
- Bateman, R.P., Carey, M., Moore, D., Prior, C. (1993). The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. Ann Appl Biol. 122(1): 145–152.
- Batta, Y.A. (2003). Production and testing of novel formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Crop Prot. 22(2): 415–422.
- Benbrook, C.H.M. (1996). Pest management at the crossroads. Consumers Union. Yonkers, NY. 288 pp.
- Bidochka, M.J., Kamp, A.M., De Croos, J.N.A. (2000). Insect pathogenic fungi: from genes to populations. In: Kronstad, J.W. (Ed.) Fungal Pathology. The Netherlands :Kluwer Academic Press. 171–193.
- Bidochka, M.J., Menzies, F., Kamp, A.M. (2002). Genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* are associated with habitat and thermal growth preferences. Arch. Microbiol. 178(6): 531–537.
- Bing, L.A., Lewis, L.C. (1991). Suppression of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae), by endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. Environ. Entomol. 20(4): 1207–1211.
- Blackwell, M. (2010). Fungal evolution and taxonomy. BioControl. 55(1): 7–16.
- Boller, E.F., Avilla, J., Jörg, E., Malavolta, C., Wijnands, F., Esbjerg, P. (2004). Integrated Production: Principles and Technical Guidelines. 3rd edition. IOBC WPRS Bull. 27(2): 50.
- Boucias, D.G., Pendland, J.C., Largo, J.P. (1988). Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. Appl Environ Mikrobiology. 54(7): 1795 – 1805.
- Boucias, D.G., Pendland, J.C. (1991). Attachment of mycopathogens to cuticle. The initial event of mycoses in arthropod hosts. In: Cole, G.T., Hoch, H.C. (Eds.). The fungal spore and diseases initiation in plants and animals. Plenum, New York. 101–128.
- Boyetchko, S.M., Roskopf, E.N., Caesar, A.J., Charudattan, R. (2002). Biological weed control with pathogens: search for candidates to applications. In: Khachatourians, G.G., Arora, D.K. (Eds.). Applied Mycology and Biotechnology Agriculture and Food Production. Vol. 2. Elsevier Science. Amsterdam. 239–274.
-

-
- Brito, E.S., Rodrigues de Paula, A., Vieira, L.P., Dolinski, C., Samuels, R.I. (2008). Combining vegetable oil and sub-lethal concentrations of imidacloprid with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against adult quava weevil *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae). *Biocontrol Sci Technol.* 18(7): 665–673.
- Browngridge, M., Costa, S., Jaronski, S.T. (2001). Effects of in vitro passage of *Beauveria bassiana* on virulence to *Bemisia argentifolii*. *J Invertebr Pathol.* 77(4): 280–283.
- Bugéme, D.M., Knapp, M., Boga, H.I., Wnajoja, A.K., Maniania, N.K. (2009). Influence of temperature on virulence of fungal isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Mycopathologia.* 167(4): 221–227.
- Burges, H.D. (1998). *Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments.* Kluwer Academic. Dordrecht. 1–6.
- Butt, T.M. (2002). Use of entomogenous fungi for the control of insect pests. In: Kempken, F. (Ed.). *The Mycota XI. Agricultural applications.* Springer-Verlag. Berlin. 110–134.
- 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.
- Butt, T.M., Harris, J.G., Powell, K.A. (1999). Microbial Biopesticides. In: Hall, F.R., Menn, J.J. (Eds.). *Biopesticides, use and delivery.* Humana Press. Totowa. New Jersey. 23–44.
- Butt, T.M., Ibrahim, L., Clark, S.J., Beckett, A. (1995). The germination behaviour of *Metarhizium anisopliae* on the surface of aphid and flea beetle cuticles. *Mycol Res* 99(8): 945–950.
- Butt, T.M., Jackson, C.H., Magan, N. (2001). Fungal biological control agents: progress, problems and potential. In: Butt, T.M., Jackson, C.W., Magan, N. (Eds.). *Fungi as biocontrol agents, progress, problems and potential.* CAB International. Wallingford. UK. 1–8.
- Castrillo, L.A.; Bauer, L.S., Liu, H., Griggs, M.H., Vandenberg, J.D. (2010). Characterization of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) isolates associated with *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) populations in Michigan. *Biol Control.* 54(2): 135–140.
- Caulder, J. (1999). Projections on opportunities for biopesticides in crop protection, The North American scenario. In: Hall, F.R., Menn, J.J. (Eds.). *Biopesticides, use and delivery.* Humana Press. Totowa. New Jersey. 13–22.
- Cliquet, S., Jackson, M.A. (1997). Comparison of air-drying methods for evaluating the desiccation tolerance of liquid culture-produced blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus*. *World J Microb Biot.* 13(3): 299–303.
-

-
- Consolo, V.F., Salerno, G.L., Beron, C.M. (2003). Pathogenicity, formulation and storage of insect pathogenic hyphomycetous fungi tested against *Diabrotica speciosa*. *BioControl*. 48(6): 705–712.
- Coombs, J., Coombs, R.F. (2003). A dictionary of biological control and integrated pest management. 3rd edition. CPLPress. Newbury. UK. 310 pp.
- Čača, Z. (1990). Ochrana polních a zahradních plodin. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 368 pp.
- Dalla Santa, H.S., Sousa, N.J., Brand, D., Dalla Santa, O.R., Pandey, A., Sobotka, M., Páca, J., Soccol, C.R. (2004). Conidia production of *Beauveria* sp. by solid-state fermentation for biocontrol of *Ilex paraguariensis* caterpillar. *Folia Microbiol.* 49(4): 418–422.
- David-Henriet, A.I., Pye, B.J., Butt, T.M. (1998). Formulation and application of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the control of crucifer pests in Europe. *Insect pathogens and insect parasitic nematodes*. IOBC Bull. 21: 89–90.
- Daoust R.A., Roberts D.W. (1983): Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: effect of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against mosquitoes, *J Invertebr Pathol.* 41(2): 143–150.
- Derakhshan, A., Rabindra, R.J., Ramanujam, B. (2008). Effect of storage conditions of formulations on viability of *Verticillium lecanii* (Zimmerman) Viegas and its virulence to *Brevicoryne brassicae* (L.). *J Biol Sci* 8(2): 498–501.
- Dirlbeková, O. (1991). Biologické zdroje pro mechanickou ochranu rostlin (I. Deuteromycetes, *Beauveria bassiana* [Bals.] Vuill.) Studie VTR, ÚVITZ, Ř. Rostl. Výr. 11: 10–21.
- Dufour, R. (2001). Bionintensive integrated pest management. ATTRA. 52 pp.
- Eapen, S.J., Beena, B., Ramana, K.V. (2005). Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. *J Invertebr Pathol.* 88(3): 218–225.
- Ekesi S., Maniania N. K., Ampong-Nyarko K. (1999). Effect of Temperature on Germination, Radial Growth and Virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. *Biocontrol Sci Technol* 9(2): 177–185.
- Elad, Y., Freeman, S. (2002). Biological control of fungal plant pathogens. In: Esser, K., Bennett, J.W. (Eds.). *The Mycota XI*. Springer-Verlag. Berlin, Germany. 93–109.
- Fargues, J., Goettel, M.S., Smits, N., Ouedraogo, A., Rougier, M. (1997a). Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. *Mycologia*. 83(3): 383–392.
-

-
- Fargues, J., Goettel, M.S., Smits, N., Ouedraogo, A., Vidal, C., Lacey, L.A., Rougier, M. (1996). Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. *Mycopathologia*. 135(3): 171–181.
- Fargues, J., Ouedraogo, A., Goettel, M.S., Lomer, C.J. (1997). Effects of temperature, humidity and inoculation method on susceptibility of *Schistocerca gregaria* to *Metarizium flavoviride*. *Biocontrol Sci Technol*. 7(3): 345–357.
- Fargues, J.F., Robert, P.H. (1983). Effect of passaging through scarabeid hosts on the virulence and host specificity of two strains of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Can J of Microbiol*. 29(5): 576–583.
- Faria, M, Wraight, S.P. (2001). Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. *Crop Prot*. 20(9): 767–778.
- Faria, M., Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol Control*. 43(3): 237–256.
- Faria, M, Hotchkiss, J.H., Hajek, A.E., Wraight, S.P. (2010). Debilitation in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and implication with respect to viability determinations and mycopesticide quality assessments. *J Invertebr Pathol*. 105(1): 74–83.
- Feng, M.G., Poprawski, T.J., Khachatourians, G.G. (1994). Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Sci Technol*. 4(1): 3–34.
- Fernandes, É.K.K, Rangel, D. E.N., Moraes, Á.M.L., Bittencourt, V.R.E.P., Roberts, D.W. (2008). Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*, *J Invertebr Pathol*. 98(1): 69–78.
- Fields, P., Korunic, Z. (2000). The effect of grain moisture content and temperature on the efficacy of diatomaceous earths from different geographical locations against stored-product beetles. *J Stored Prod Res*. 36(1): 1–13.
- Frey, S., Magan, N. (2001). Production of the fungal biocontrol agent *Ulocladium atrum* by submerged fermentation: accumulation of endogenous reserves and shelf-life studies. *Appl Microbiol Biotechnol*. 56(3-4): 372–377.
- Gaitan, A., Valderrama, A.M., Saldarriaga, G., Velez, P., Bustillo, A. (2002). Genetic variability of *Beauveria bassiana* associated with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* and other insects. *Mycol Res*. 106(11): 1307–1314.
- Goettel, M.S. (1992). Fungal agents for biocontrol. In: Lomer, C.J., Prior, C. (Eds). *Biological control of locusts and grasshoppers*. CAB International. Wallingford. UK. pp. 122–132.
- 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.
-

-
- 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. 225–282.
- Goettel, M.S., Koike, M., Kim, J.J., Aiuchi, D., Shinya, R., Brodeur, J. (2008). Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes and plant diseases. J Invertebr Pathol. 98(3): 256–261.
- Goettel, M.S., Roberts, D.W. (1992). Mass production, formulation and field application of entomopathogenic fungi. In Lomer, C.J., Prior, C. (Eds.). Biological control of locusts and grasshoppers. CAB International. Wallingford. UK. 230–238.
- Gottlieb, D., Tripathi, R.K. (1968). The physiology of swelling phase of spore germination in *Penicillium atrovenetum*. Mycologia. 60(3):571-590.
- Grimm, C. (2001). Economic feasibility of a small-scale production plant for entomopathogenic fungi in Nicaragua. Crop Prot. 20(7): 623–630.
- Hagler, J.R. (2000). Biological control of insects. In: Rechcigl, J.E., Rechcigl, N.A. (Eds.) Insect pest management, techniques for environmental protection. Lewis publishers. London. 207–241.
- Hall, R.A. (1981). The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. In: Burges, H.D. (Ed.). Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. Academic Press. London. 483-498.
- Hall, R.A. (1982). Control of whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* and cotton aphid, *Aphis gossypii*, in greenhouses by two isolates of the fungus, *Verticillium lecanii*. Ann Appl Biol. 101: 1–11.
- Hall, R.A. (1985). Whitefly control with fungi. In: Hussey, N.W., Scopes, N. (Eds.). Biological test control-the greenhouse experience. Cornell University Press. Ithaca. New York. 116–118.
- Hallett, S. G. (2005). Where are the bioherbicides? Weed Sci. 53: 404–415.
- Hallsworth, J.E., Magan, N. (1999). Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. J Invertebr Pathol. 74(3): 261–266.
- Hedgecock, D., Moore, P.M., Higgins, P. M., Prior, C. (1995). Influence of moisture content on temperature tolerance and storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in an oil formulation. Biocontrol Sci. Technol. 5(3): 371–377.
- Hirte, W.F., Glathe, I., Adam, H. (1989). Production and application of microbial preparation with *Aschersonia* spores. Zentrallbl Microbiol 144: 155–162.
- Hidalgo, E., Motore, D., Le Patourel, G. (1998). The effect of different formulations of *Beauveria bassiana* on *Sitophilus zeamais* in stored maize. J Stored Prod Res. 34(2/3): 171–179.
-

-
- Hong, T.D., Edgington, S., Ellis, R.H., de Muro, M.A., Moore, D. (2005). Saturated salt solutions for humidity control and the survival of dry powder and oil formulations of *Beauveria bassiana* conidia. *J Invertebr Pathol.* 89(2): 136–143.
- Hong, T.D., Ellis, R.H., Motore, D. (1997). Development of a model to predict the effect of temperature and moisture on fungal spore longevity. *Ann Botany.* 79(2): 121–128.
- Hong, T.D., Gunn, J., Ellis, R.H., Jenkins, N.E., Moore, D. (2001). The effect of storage environment on the longevity of conidia of *Beauveria bassiana*. *Mycol Res.* 105(5): 597–602.
- Hornák, P. (2004). Monitoring přirozeného výskytu entomopatogenních hub v půdních ekosystémech. Disertační práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta.
- Hrdý, I., Bírová, H., Havelka, J., Marec, F., Mráček, Z., Landa, V., Sehnal, F., Soldán, T., Weiser, J., Zacharda, M., Vrkoč, J., Plíva, J., Pultar, O., Veselý, D. (1991). Biopesticidy v zemědělství. Ministerstvo zemědělství ČR. 107 pp.
- Humber, R.A. (1997). Fungi: Identification. In: Lacey, L. (Ed.). *Manual of techniques in insect pathology.* Academic Press. San Diego, USA. 153–185.
- Charnley, A.K. (1997). Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In: Esser K., Lemke P.A. (Eds.). *The Mycota IV.–Environmental and Microbial Relationships.* Springer-Verlag. Berlin. 185–201.
- Chikwenhere, G.P., Vestergaard, S. (2001). Potential effects of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin on *Nechetina bruchi* Hustache (Coleoptera: Curculionidae), a biological control agent of water hyacinth. *Biol Control.* 21(2): 105–110.
- Ibrahim, L. Butt, T.M., Beckett, A., Clark, S.J. (1999). The germination of oil-formulated conidia of the insect pathogen, *Metarhizium anisopliae*. *Mycol Res.* 103(7): 901–907.
- Ibrahim, L., Butt, T.M., Jenkinson, P. (2002). Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycol Res.* 106(6): 705–715.
- Ihara, F., Toyama, M., Mishiro, K., Yaginuma, K. (2008). Laboratory studies on the infection of stink bugs with *Metarhizium anisopliae* strain FRM515. *Appl Entomol Zool.* 43(4): 503–509.
- Inglis, G.D., Duke, G.M., Kawchuk, L.M., Goettel, M.S. (1999). Influence of oscillating temperatures on the competitive infection and colonization of the migratory grasshopper by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium flavoviride*. *Biol Control* 14(2): 111–120.
- Inglis, G.D., Goettel, M.S., Butt, T.M., Strasser, H. (2001). In: Butt, T.M., Jackson, C.W., Magan, N. (Eds.). *Fungi as biocontrol agents, progress, problems and potential.* CAB International. Wallingford. UK. 23–69.
-

-
- Inglis, G.D., Goettel, M.S., Johnson, D.L. (1995). Influence of ultraviolet light protectants on persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Biol Control*. 5(4): 581–590.
- Inglis, G.D., Johnson, D.L., Goettel, M.S. (1996). Effect of bait substrate and formulation on infection of grasshopper nymphs by *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Sci Technol*. 6(1): 35–50.
- Inyang, N., McCartney, A., Oyejola, B., Ibrahim, L., Pye, B.J., Archer, S.A., Butt, T.M. (2000). Effect of formulation, application and rain on the persistence of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* on oilseed rape. *Mycol Res*. 104(3): 653–661.
- Iskandarov, U.S., Guzalova, A.G., Davranov, K.D. (2006). Effects of nutrient medium composition and temperature on the germination of conidia and the entomopathogenic activity of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Appl Biochem Microbiol*. 42(1): 72–76.
- 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.
- James, R.R. (2001). Effects of exogenous nutrients on conidial germination and virulence against the silverleaf whitefly for two hyphomycetes. *J Invertebr Pathol*. 77(2): 99–107.
- Jaronski, S. T. (2010). Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *BioControl*. 55(1): 159–185.
- Jenkins, N.E., Grzywacz, D. (2000). Quality control of fungal and viral biocontrol agents- assurance of product performance. *Biocontrol Sci Technol*. 10(6): 753–777.
- Jenkins, N.E., Thomas, M.B. (1996). Effect of formulation and application method on the efficacy of aerial and submerged conidia of *Metarhizium flavoviride* for locust and grasshopper control. *Pestic Sci* 46(4): 299–306.
- Jones, K.A., Burges, H.D. (1998). Technology of formulation and application, In: Burges, H.D. (Ed.). *Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments*. Kluwer Academic. Dordrecht. 7–30.
- Kamp, A.M., Bidochka, M.J. (2002). Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Lett Appl Microbiol*. 35(1): 74–77.
- Kassa, A., Stephan, D., Vidal, S., Zimmermann, G. (2003a). Laboratory and field evaluation of emulsions and oil formulations of *Metarhizium anisopliae* var. *Acridum* submerged and aerial conidia for the control of locusts and grasshoppers. In: Kassa, A. (Ed.) *Development and testing of mycoinsecticides based on submerged spores and aerial conidia of the entomopathogenic fungi Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for control of locusts, grasshoppers and storage pests*. Doctoral dissertation. 28-48.
-

-
- Kassa, A., Stephan, D., Vidal, S., Zimmermann, G. (2003b). Effect of temperature on spore germination and growth of entomopathogenic fungi isolated (Deuteromycotina: Hyphomycetes) from Ethiopia. In. Kassa, A. (Ed.) Development and testing of mycoinsecticides based on submerged spores and aerial conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for control of locusts, grasshoppers and storage pests. Doctoral dissertation. 74-92.
- Kassa, A., Stephan, D., Vidal, S., Zimmermann, G. (2003c). Efficacy, persistence and storability of conidia and submerged spore formulations of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for use against Coleopteran storage pests. In. Kassa, A. (Ed.) Development and testing of mycoinsecticides based on submerged spores and aerial conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for control of locusts, grasshoppers and storage pests. Doctoral dissertation. 132-152.
- Kavková, M., Čurn, V. (2005). *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a potential mycoparasite on *Sphaerotheca fuliginea* (Ascomycotina: Erysiphales). Mycopathologia. 159(1): 53–63.
- Kennedy, G.G., Sutton, T.B. (2000). Emerging technologies for integrated pest management: Concepts, research, and implementation. APS Press. St Paul. Minnesota. 526 pp.
- Khachatourians, G.G., Valencia, E.P., Miranpuri, G.S. (2002). *Beauveria bassiana* and other entomopathogenic fungi in the management of insect pests. In. Koul, O., Dhaliwal, G. S. (Eds.). Microbial biopesticides. Taylor & Francis. New York. 239–275.
- Kiffer, E., Morelet, M. (2000). The Deuteromycetes, Mitosporic Fungi, Classification and generic keys. Science publishers Inc. Enfield. NH. USA. 300 pp.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C., Stalpers, J.A. (2001). Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi. 9th Ed. CAB International. Wallingford. 650 pp.
- Korunic, Z. (1998). Diatomaceous earth, a group of natural insecticides. J Stored Prod Res. 34(2–3): 87–97.
- Koul, O., Cuperus, G.W. (2007). Ecologically based integrated pest management: Present Concept and new solutions. In. Koul, O., Cuperus, G.W. (Eds.). Ecologically based integrated pest management. CAB International. Wallingford. UK. 1–17.
- Kryukov, V.Y., Yaroslavtseva, O.N., Levchenko, M.V., Lednyov, G.R., Glupov, V.V. (2010). Phenotypic variability of environmental isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Microbiology. 79(2): 265–269
- Lacey, L.A., Fransen, J.J., Carruthers, R. (1996). Global distribution of naturally occurring fungi of *Bemisia*, their biologies and use as biological control agents. In. Gerling, D., Mayer, R.T. (Eds.). *Bemisia* 1995: Taxonomy, biology, damage, control and management. Intercept Limited. Andover. UK. 401–433.
-

-
- Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K., Vail, P. (2001). Insect pathogens as biological control agents: do they have a future. *Biol Control*. 21(3): 230–248.
- Landa, Z. (1994). Entomopatogenní houby v biologické ochraně rostlin (habilitační práce). ZF JU. České Budějovice. 204 pp.
- Landa, Z. (1998). Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub. *Agro*. 10: 7–12.
- Landa, Z., Horňák, P., Charvátová, H., Osborne, L.S. (2002). Distribution, occurrence and potential use of entomopathogenic fungi in arable soils in Czech Republic. Proceedings of International Conference ISTRO Current trends in the research of soil environment. 195–201.
- Landa, Z., Osborne, L., Lopez, F., Eyal, J. (1994a). A bioassay for determining pathogenicity of entomogenous fungi on whiteflies. *Biol Control*. 4(4): 341–350.
- Lane, B.S., Trinci, P.J., Gillespie, A.T. (1991). Endogenous reserves and survival of blastospores of *Beauveria bassiana* harvested from carbon- and nitrogen-limited batch cultures. *Mycol Res*. 95(7): 821–828.
- Lecuona, R.E., Rodriguez, J., La Rossa, F.R. (2005). Effect of constant and cyclical temperatures on the mortality of *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae) treated with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hyphomycetes). *Neotrop Entomol*. 34(4): 675–679.
- Lekimme M., Mignon B., Tombeux S., Focant C., Maréchal F., Losson B. (2006). In vitro entomopathogenic activity of *Beauveria bassiana* against *Psoroptes* spp. (Acari: Psoroptidae). *Vet Parasitol*. 139: 196–202.
- Lewis, L.C. (2007). Ecological considerations for the use of entomopathogens in integrated pest management. In: Koul, O., Cuperus, G.W. (Eds.). Ecologically based integrated pest management. CAB International. Wallingford. UK. 249–268.
- Li, J., Feng, M.–G. (2009). Intraspecific tolerance of *Metarhizium anisopliae* conidia to the upper thermal limits of summer with a description of a quantitative assay system. *Mycol Res* 113(1): 93–99.
- Lohmeyer, K.H., Miller, J.A. (2006). Pathogenicity of three formulations of entomopathogenic fungi for control of adult *Haemtovia irritan* (Diptera: Muscidae). *J Econ Entomol*. 99(6): 1943–1947.
- Lomer, C.J., Bateman, R.P., Godinou, I., Kpindou, D., Shah, P.A., Paraiso, A., Prior, C. (1993). Field infection of *Zonocerus variegatus* following application of an oil-based formulation of *Metarhizium flavoviride* conidia. *Biocontrol Sci Technol*. 3(3): 337–346.
- Lord, J. (2005). Low humidity, moderate temperature, and desiccant dust favor efficacy of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) for the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bruchidae). *Biol Control*. 34(2): 180–186.
-

-
- Luz, C., Batagin, I. (2005). Potential of oil-based formulations of *Beauveria bassiana* to control *Triatoma infestans*, Mycopathologia. 160(1): 51–62.
- Luz, CH., Silva, I.G., Cordeiro, C.M.T., Tigano, M.S. (1999). Sporulation of *Beauveria bassiana* on cadavers of *Triatoma infestans* after infection at different temperatures and doses of inoculum. J Invertebr Pathol. 73(2): 223–225.
- McCammom, S.A., Rath, A.C. (1994). Separation of *Metarhizium anisopliae* strains by temperature dependent germination rates. Mycol Res. 98(11): 1253–1257.
- McCoy, C.W., Samson, R.A., Boucias, D.H. (1988). Entomogenous fungi. In: Ignoffo, C.M. (Ed.). CRC Handbook of natural pesticides. CRC Press. Boca Raton. 5: 151–236.
- McGuire, M.R., Ulloa, M., Park, Y.H., Hudson, N. (2005). Biological and molecular characteristics of *Beauveria bassiana* isolates from California *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) populations. Biol Control. 33(3): 307–314.
- Menn, J.J., Hall, F.R. (1999). Biopesticides, present status and future prospects. In: Hall, F.R., Menn, J.J. (Eds.) Biopesticides, use and delivery. Humana Press. Totowa. New Jersey. 1–10.
- Meyling, N.V., Eilenberg, J. (2007). Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. Biol Contr 43(2): 145–155.
- Milner, R.J., Hartley, T.R., Lutton, G.G., Prior, C. (1994). Control of *Phaulacridium vittatum* (Sjostedt) Orthoptera: Acrididae) in field cages using an oil-based spray of *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal (Deuteromycotina: Hyphomycetes). J Aust Entomol Soc. 3: 165–167.
- Milner, R.J., Hunter, D.M. (2000). Recent developments in the use of fungi as biopesticides against locusts and grasshoppers in Australia. J Orthoptera Res. 10(2): 271–276.
- Montazeri, M., Greaves, M.P. (2002). Effects of culture age, washing and storage conditions on desiccation tolerance of *Colletotrichum truncatum* conidia. Biocontrol Sci Technol. 12(1): 95–105.
- Moore, D., Bateman, R.P., Carey, M., Prior, C. (1995). Long-term storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in oil formulation for the control of locusts and grasshoppers. Biocontrol Sci Technol. 5(2): 193–199.
- Moore, D., Douro-Kpindou, O.K., Jenkins, N.E., Lomer, C.J. (1996). Effects of moisture content and temperature on storage of *Metarhizium flavoviride* conidia. Biocontrol Sci Technol. 6(1): 51–61.
- Moore, D., Prior, C. (1993). Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. Ann Appl Biol. 122(1): 145–152.
-

-
- Morley–Davies, J., Motore, D., Prior, C. (1995). Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* spp. conidia with exposure to simulated sunlight and a range of temperatures. *Mycol Res.* 100(1): 31–38.
- Müller-Kögler, E. (1965). Pilzkrankheiten bei Insekten. Anwendung zur biologischen Schädlingsbekämpfung und Grundlagen der Insektenmykologie. Berlin. P. Parey Verlag. 444.
- Murillo, R., Lasa, R., Goulson, D., Williams, T., Munoz, D., Caballero, P. (2003). Effect of Tinopal LPW on the insecticidal properties and genetic stability of the nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera exitus* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol.* 96: 1668–1674.
- Namatame, I., Tomoda, H., Tabata, N., Si, S.Y., Omura, S. (1999). Structure elucidation of fungal Beauveriolide–III, a novel inhibitor of lipid droplet formation in mouse macrophages. *J Antibiot.* 52: 7–12.
- Noma, T., Strickler, K. (2000). Effects of *Beauveria bassiana* on *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding and oviposition. *Environ Ent.* 29(2): 394–402.
- Norris, R.F., Caswell–Chen, E.P., Kogan, M. (2003). Concepts in integrated pest management. Upper Saddle River. New Jersey. 586 pp.
- Osborne, L.S., Landa, Z. (1992). Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Florida Entomol.* 75(4): 456–471.
- Osborne, L.S., Storey, G.K., McCoy, C.W., Walter, J.F. (1990). Potential for controlling the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, with the fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. In: Proceedings of the Vth international colloquium on invertebrate pathology and microbial control. Adelaide. Australia. 386–390.
- Ouedraogo, A., Fargues, J. Goettel, M.S., Lomer, C.J. (1997). Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Mycopathologia.* 137(1): 37–43.
- Ownley, B., Gwinn, K.D., Vega, F.E. (2010). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl.* 55(1): 113–128.
- Parker, B.L., Skinner, M., Gouli, V., Brownbridge, M. (1997). Impact of soil applications of *Beauveria bassiana* and *Mariannaea* sp. on nontarget forest arthropods. *Biol Control.* 8(3): 203–206.
- Pell, J.K., Hannam, J.J., Steinkraus, D.C. (2010). Conservation biological control using fungal entomopathogens. *BioControl.* 55(1): 187–198.
- Pell J.K. (2007). Ecological approaches to pest management using entomopathogenic fungi; concepts, theory, practice and opportunities. In: Ekesi, S., Maniania, N. (eds.). Use of entomopathogenic fungi in biological pest management. Research Signpost. Kerala. India. 145–177.

-
- Pereira, R.M., Roberts, D.W. (1990). Dry mycelium preparations of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. J Invertebr Pathol. 56(1): 39–46.
- Phelan, L. (1997). Soil-management history and the role of plant mineral balance as a determinant of maize susceptibility to the European corn borer. Biol agric hort. 15 (1–4): 25–34.
- Poinar, G., Poinar, R. (1998). Parasites and pathogens of mites. Annu Rev Entomol. 43: 449–469.
- Posada–Flórez, F.J. (2008). Production of *Beauveria bassiana* fungal spores on rice to control the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, in Colombia. J Insect Sci. 8. Article 41.
- Prakash, A., Rao, J. (1997). Botanical pesticides in agriculture. CRC Press. Boca Raton. 461.
- Prior, C., Jollands, P., Le Patourel, G. (1998). Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). J Invertebr Pathol. 52(1): 66–72.
- Quesada–Moraga, E., Maranhao, E.A.A., Valverde–García, P., Santiago–Álvarez, C. (2006). Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity. Biol Control. 36(3): 274–287.
- Quintela, E.D., McCoy, C.W. (1998). Conidial attachment of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the larval cuticle of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) treated with imidacloprid. J Invertebr Pathol. 72(3): 220–230.
- Ramoska, W.A. (1984). The influence of relative humidity on *Beauveria bassiana* infectivity and replication in the chinch bug, *Blissus leucopterus*. J Invertebr Pathol. 43(3): 389–394.
- Rangel, D.E.N., Braga, G.U.L., Anderson, A.J., Roberts, D.W. (2005). Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. J Invertebr Pathol. 88(2): 116–125.
- Ravensberg, W.J., Malais, M., van der Schaaf, D.A. (1990). *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against glasshouse whitefly. In: Proceedings, Brighton crop protection conference. Pests and diseases. British crop protection council. Farnham. UK. 265–269.
- Reisinger, O., Fargues, J., Robert, P., Arnould, M.F. (1977). Effet de l'argile sur la conservation des microorganismes. I. Etude ultrastructurale de la biodégradation dans le sol de l'Hyphomycète entomogène *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Ann. Microbiol (Inst. Pasteur). 128: 271–287.
- Rhodes, D.J. (1990). Formulation requirements for biological control agents. Aspects Appl Biol. 24: 145–153.
-

-
- Roberts, D.W., Campbell, A.S. (1977). Stability of entomopathogenic fungi. Miscellaneous publications of the entomological society of America. 10: 19–76.
- Rodríguez–Gómez, D., Loera, O., Saucedo–Castaneda, G., Viniegra–González, G. (2009). Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*, World J Microbiol Biotechnol. 25(3): 513–518.
- Safavi, S.A., Shah, F.A., Pakdel, A.K., Rasoulia, G.R., Bandani, A.R., Butt, T.M. (2007). Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. FEMS Microbiol Lett. 270(1): 116–123.
- Sahayaraj, K., Namasivayam, R. (2008). Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products. African J of Biotechnol. 7(12): 1907–1910.
- Samson, R.A. (1974). *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. Stud Mycol. 6: 1–43.
- Shah, F.A., Pell, J.K. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. Appl Microbiol Biotechnol. 61(5-6): 413–423.
- 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(2): 259–266.
- Shah, F.A., Allen, N., Wright, C.J., Butt, T.M. (2007). Repeated in vitro subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. FEMS Microbiol Lett. 276(1): 60–66.
- Sharma, S.P., Gupta, R.B.L., Yadava, C.P.S. (2002). Selection of a suitable medium for mass multiplication of entomofungal pathogens, Indian J Entomol 14(1): 255–261.
- Shimazu, M. (2004). Effect of temperature on growth of *Beauveria bassiana* F–263, a strain highly virulent to the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus*, especially tolerance to high temperatures. Appl Entomol Zool. 39(3): 469–475.
- Shimazu, M., Sato, H., Maehara, N. (2002). Density of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in forest air and soil. Appl Entomol Zool. 37(1): 19–26.
- Shinya, R., Aiuchi, D., Kushida, A., Tani, M., Kuramochi, K., Koike, M. (2008). Effects of fungal culture filtrates of *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) hybrid strains on *Herodera glycines* eggs and juveniles. J Invertebr Pathol. 9(3): 291–297.
- Schreiter, G., Beckett, T.M., Beckett, A., Vestergaard, S., Moritz, G. (1994). Invasion and development of *Verticillium lecanii* in western flower thrips *Frankliniella occidentalis*. Mycol Res. 101: 535–541.
- Sopp, P.L., Gillespie, A.T., Palmer, A. (1990). Application of *Verticillium lecanii* for aphid control on chrysanthemums. Crop Prot. 9: 177–184.
-

-
- Sosa–Gomez, D.R., Boucias, D.G., Nation, J.L. (1997). Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezera viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. *J Invertebr Pathol.* 69(1): 31–39.
- Stathers, T.E., Moore, D., Prior, C. (1993). The effect of different temperatures on the viability of *Metarhizium flavoviride* conidia stored in vegetable and mineral oils. *J Invertebr Pathol.* 62(2): 111–115.
- Steinrauf, L.K. (1985). Beauvericin and the other enniatins. In: Sigel, H., Sigel, A. (Eds.). *Metal ions in biological systems-antibiotics and their complexes.* Marcel Dekker. New York. 139–171.
- Stowell, L.J. (1991). Submerged fermentation of biological herbicides. In: TeBeest, D.O. (Ed.). *Microbial Control of Weeds.* Chapman and Hall. New York. 225–260.
- Strasser, H., Vey, A., Butt, T.M. (2000). Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? *Biocontrol Sci Technol.* 10(6): 717–735.
- Subramanyam, B.H., Roesli, R. (2000). Inert dusts, In: Subramanyam, B.H., Hagstrum, D.W. (Eds.). *Alternatives to Pesticides in Stored-Product IPM.* Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 321–380.
- Sun, J.Z., Fuxa J.R., Henderson, G. (2003). Effects of virulence, sporulation, and temperature on *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* laboratory transmission in *Coptotermes formosanus*. *J Invertebr Pathol.* 84(1): 38–46.
- Sung, G.–H., Hywel–Jones, N.L., Sung, J.–M., Luangsa–ard, J.J., Shrestha, B., Spatafora, J.W. (2007). Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Stud. Mycol.* 57(1): 5–59.
- Tarocco, F., Lecuona, R.E., Couto, A.S., Arcas, J.A. (2005). Optimization of erythritol and glycerol accumulation in conidia of *Beauveria bassiana* by solid–state fermentation, using response surface methodology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 68(4): 481–488.
- Tefera, T., Pringle, K. (2003). Germination, radial growth, and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates and their virulence to *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) at different temperatures. *Biocontrol Sci Technol.* 13(7): 699–704.
- Tichá, K. (2001). *Biologická ochrana rostlin.* Grada Publishing. Praha. 87 pp.
- Townsend, R.J., Glare, T.R., Willoughby, B.E. (1995). The fungi *Beauveria* spp. cause epizootics in grass grub populations in Waikato. In: *Proceedings of the 48th New Zealand plant protection conference.* 237–241.
- Uma Devi, K., Sridevi, V., Mohan, CH.M., Padmavathi, J. (2005). Effect of high temperature and water stress on in vitro germination and growth in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. *J Invertebr Pathol.* 88(3): 181–189.
-

-
- Vayias, B.J., Athanassiou, C.G. (2004). Factors affecting the insecticidal efficacy of the diatomaceous earth formulation SilicoSec against adults and larvae of the confused flour beetle, *Tribolium confusum* DuVal (Coleoptera: Tenebrionidae). *Crop Prot.* 23(7): 565–573.
- Váňa, J. (1998). Systém a vývoj hub a houbových organismů. Praha. 164 pp.
- 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. *J Invertebr Pathol.* 85(1): 40–45.
- Van der Pas, R.K., Ravensberg, W.J., Cryer, E. (1998). Insect pathogenic fungi for environmentally-friendly pest control in the glasshouse. Investigating oil formulations. Insect pathogens and parasitic nematodes. *IOBC Bull.* 21: 129–132.
- Vega, F.E., Goettel, M.S., Blackwell, M., Jackson, M.A., Keller, S., Koike, M., Maniania, N.K., Monzón, A., Ownley, B., Pell, J.K., Rangel, D., Roy, H.E. (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecol.* 2: 140–159.
- Verhaar, M.A., Hijwegen, T., Zadoks, J.C. (1998). Selection of *Verticillium lecanii* isolates with high potential for biocontrol of cucumber powdery mildew by means of components analysis at different humidity regimes. *Biocontrol Sci Technol.* 8(4): 465–477.
- Vey, A., Hoagland, R., Butt, T.M. (2001). Toxic metabolites of fungal biological control agents. In: Butt, T.M., Jackson, C.W., Magan, N. (Eds). *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential.* CAB International. Wallingford. UK. 311–345.
- Vidal, C., Fargues, J., Lacey, L.S. (1997). Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: effect of temperature on vegetative growth. *J Invertebr Pathol.* 70(1): 18–26.
- Vimala Devi, P.S., Prasad, Y.G. (1996). Compatibility of oils and antifeedants of plant origin with the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *J Invertebr Pathol.* 68(1): 91–93.
- Voelz, H., Niederpruem, D.J. (1964). Fine structure of basidiospores of *Schizophyllum commune*. *J Bacteriol.* 88(5): 1497–1502.
- Waage, J.K., Mills, N.J. (1992). Biological Control. In: Crawley, M.J. (Ed). *Natural enemies: the population biology of predators, parasites, and diseases.* Blackwell Scientific Publications. Oxford. 412–431.
- Watanabe, T. (2002). Soil and seed fungi, morphologies of cultured fungi and key to species, second edition. CRC press. London. 504 pp.
- Weiser, J. (1966). Houbové onemocnění hmyzu. In: Weiser, J. (Ed.). *Nemoci hmyzu.* Academia. Praha. 232–234.
- Weiser, J. (1991). Mikrobiální insekticidy. In: Hrdý, I., Bírová, H., Havelka, J., Marec, F., Mráček, Z., Landa, V., Sehnal, F., Soldán, T., Weiser, J., Zacharda, M., Vrkoč, J.,
-

-
- Pliva, J., Pultar, O., Veselý, D. (Eds.). Biopesticidy v zemědělství. Ministerstvo zemědělství ČR. 30–43.
- Wessels, J.G.H. (2000). Hydrophobins, unique fungal proteins. *Mycologist*. 14(4): 153–159.
- Whipps, J.M., Lumsden, R.D. (2001). Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. In: Butt, T.M., Jackson, C.W., Magan, N. (Eds.). *Fungi as biocontrol agents, progress, problems and potential*. CAB International. Wallingford. UK. 9–22.
- Wraight, S.P., Carruthers, R.I. (1999). Production, delivery, and use of mycoinsecticides for control of insect pests on field crops. In: Hall F.R., Menn J.J. (Eds.). *Biopesticides: Use and delivery*. Humana Press. Totowa. New Persey. 233–269.
- Wraight, S.P., Jackson, M.A., de Kock, S.L. (2001). Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: Butt, T.M., Jackson, C.W., Magan, N. (Eds.). *Fungi as biocontrol agents, progress, problems and potential*. 253–287.
- Wraight, S.P., Ramos, M.E. (2002). Application parameters affecting field efficacy of *Beauveria bassiana* foliar treatments against Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. *Biol Control*. 23(2): 164–178.
- Wraight, S.P., Ramos, M.E., Avery, P.B., Jaronski, S.T., Vandenberg, J.D. (2010). Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests of vegetable crops. *J Invertebr Pathol*. 103(3): 186–199.
- Ye, S.D., Ying, S.H., Chen, C., Feng, M.G. (2006). New solid-state fermentation chamber for bulk production of aerial conidia of fungal biocontrol agents on rice. *Biotechnol Lett*. 28: 799–804.
- Ying, S.H., Feng, M.G. (2004). Relationship between thermotolerance and hydrophobin-like proteins in aerial conidia of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* as fungal biocontrol agents. *J Appl Microbiol*. 97(2): 323–331.
- Ying, S.H., Feng, M.G. (2006). Medium components and culture conditions affect the thermotolerance of aerial conidia of fungal biocontrol agent *Beauveria bassiana*, *Lett Appl Microbiol*. 43(3): 331–335.
- Zare, R., Gams, W. (2001). A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium*. *Nova Hedwigia*. 73: 271–292.
- Zimmermann, G. (1993). The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pestic Sci*. 37(4): 375–379.
- Zimmermann G. (1997). Entomopathogenic fungi: Industrial and application problems, Sborník Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. fytotechnická řada. 14(2): 67–74.
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci Technol*. 17(5/6): 553–596.
-

SMĚRNICE EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY 2009/128/ES ze dne 21. října 2009, kterou se stanoví rámec pro činnost Společenství za účelem dosažení udržitelného používání pesticidů.

<http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/ipm.htm> (2009) 25.4.2010

http://www.srs.cz/portaldoc/o_nas/publikace_srs/Vestnik_2010.pdf 11.5.2010

<http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/ipm/en/>, 23.8.2010

10. PŘÍLOHY

Grafický list 1 Fenotypový projev jednotlivých kmenů houby *B. bassiana* izolovaných v NP Šumava a používaných v testech.



Bba I101



Bba I101



NP 0004



NP 0005

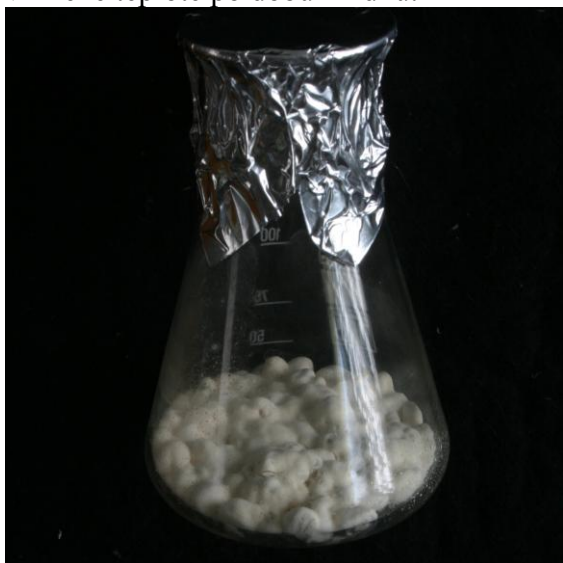


NP 0007

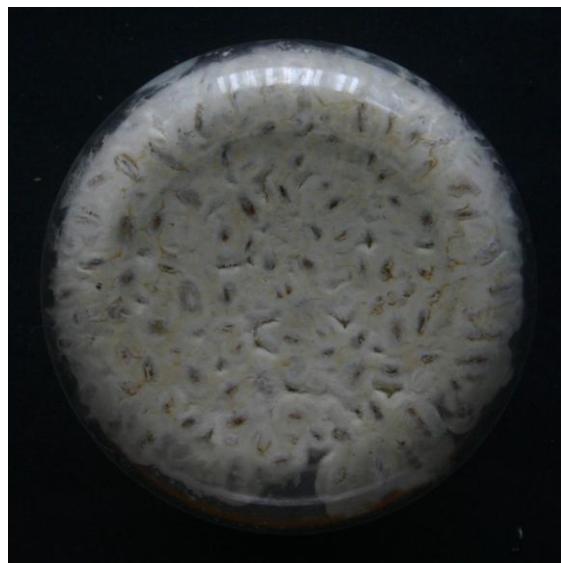


NP 0028

Grafický list 2 Kultivace spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 na přirozených substrátech v řízené teplotě po dobu 14 dnů.



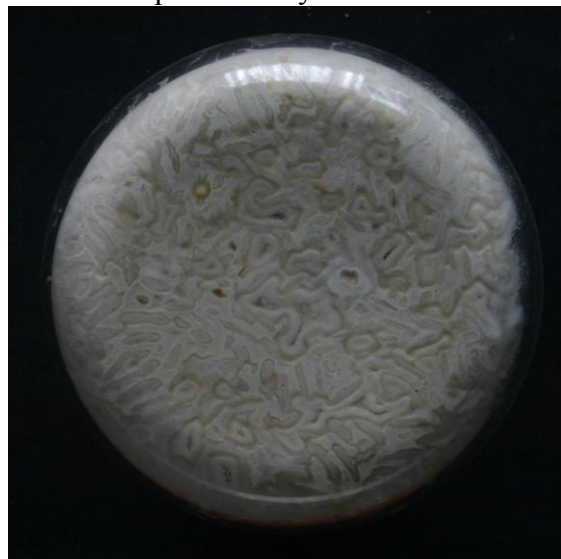
Povrchová kultura Bba I101 na kroupách.



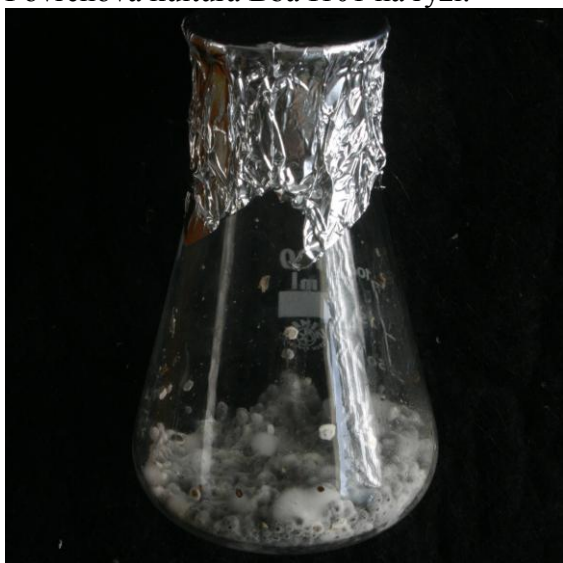
Pohled ze spodní strany.



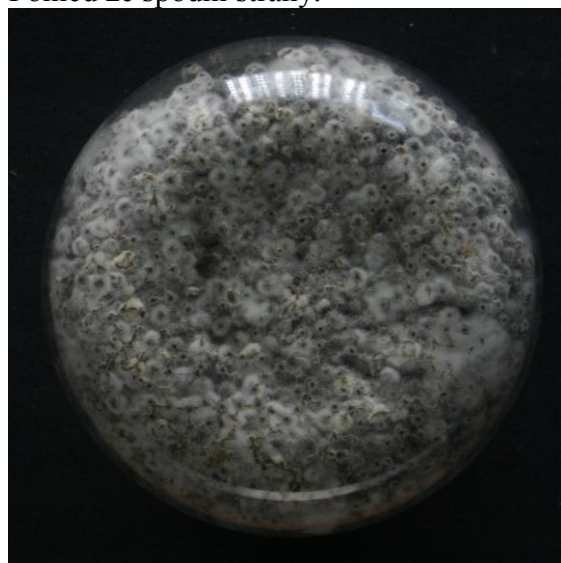
Povrchová kultura Bba I101 na rýži.



Pohled ze spodní strany.

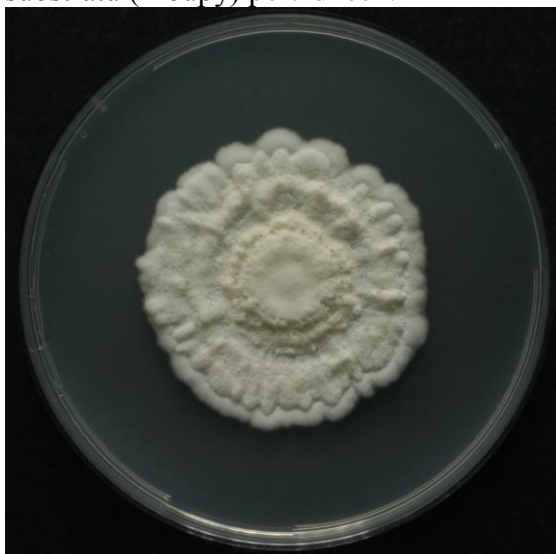


Povrchová kultura Bba I101 na řepce.



Pohled ze spodní strany.

Grafický list 3 Středové kultury používaných druhů hub a jejich kultivace na přirozeném substrátu (kroupy) po 7 dnech.



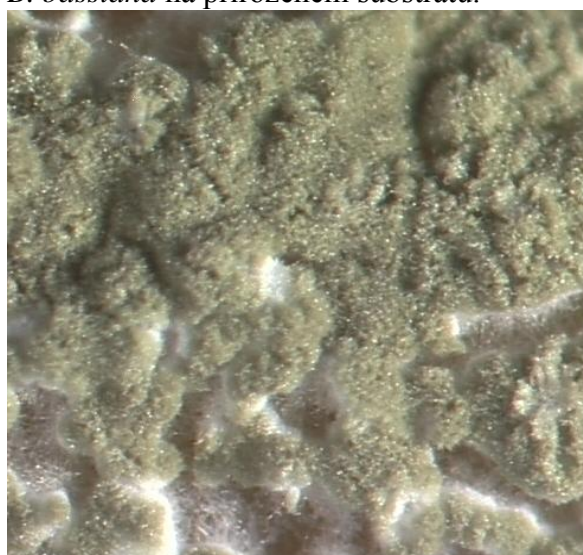
Středová kultura *Beauveria bassiana*.



B. bassiana na přirozeném substrátu.



Středová kultura *M. anisopliae*.



M. anisopliae na přirozeném substrátu.



Středová kultura *I. fumosorosea*.



I. fumosorosea na přirozeném substrátu.

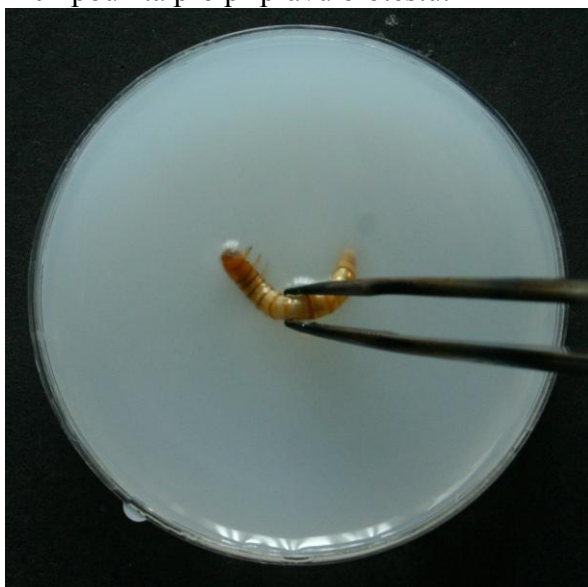
Grafický list 4 Příprava testu virulence s larvami *T. molitor* metodou „dip test“.



Plošná kultura houby *B. bassiana* kmen Bba I101 použitá pro přípravu biotestů.



Suspenze konidií *B. bassiana* kmen Bba I101 v 0,05% roztoku Tween 80, 1×10^7 spor/ml.



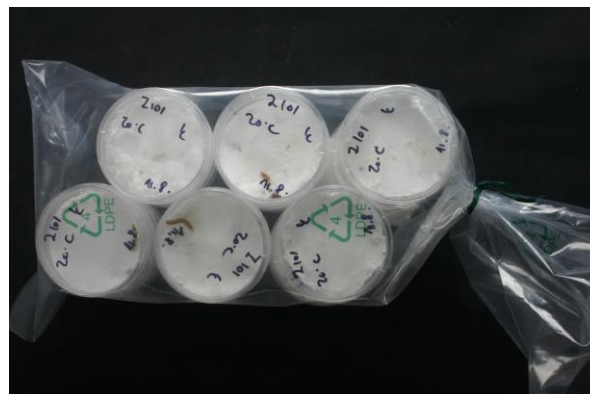
Namáčení larev *T. molitor* v suspenzi spor.



Ošetřená larva *T. molitor* ve vlhké komůrce.



Vlhké komůrky s larvami *T. molitor* připravené k uložení do termostatu.



1 varianta ošetřených larev uzavřená v ochranném plastickém sáčku.

Grafický list 5 Příprava testu virulence na larvách *T. molitor* se sporami formulovanými v IN1.



Povrchové ošetření larev sporami houby *B. bassiana* formulovanými v inertním nosiči č.1. 0,1 g preparátu promíchaný s 10 larvami *T. molitor*.



Po ošetření jsou larvy vysypány na Petriho misku a po jedné vloženy do vlhkých komůrek. Zbytek preparátu je zvážen a zjištěná hmotnost slouží pro stanovení množství spor ulpělých na larvách.



Vlhké komůrky, ve kterých jsou po jedné uloženy larvy *T. molitor*. Komůrky jsou uloženy do plastického sáčku a do řízené teploty.

Grafický list 6 Larvy *T. molitor* vykazující známky různého stupně infekce vyvolané houbou *B. bassiana*.



Melanizační skvrny, projev infekce FDI 0,5.



Melanizační skvrny mezi hrudními končetinami, FDI 0,5.



Počátek růstu mycelia mezi hrudními končetinami, FDI 1,5.



Růst kompaktnějšího mycelia, ovšem v malé míře, vývoj označovaný stupněm FDI 1,5.



Růst mycelia na hrudních končetinách, index vývoje houby 2,0.



Larva *T. molitor* kompletně porostlá myceliem houby *B. bassiana*, FDI 2,0.



Počátek sporulace mycelia, FDI 2,5.



Plná sporulace mycelia na larvě, FDI 3,0.

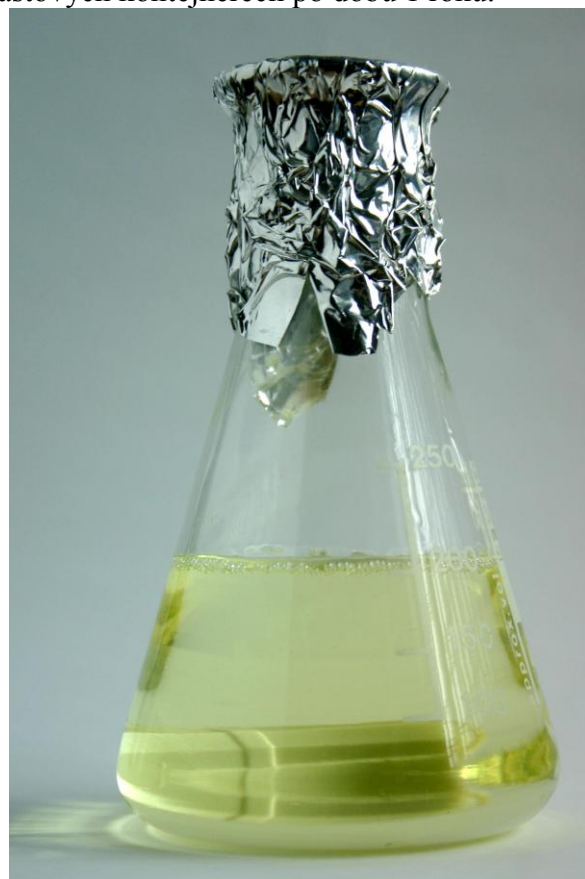
Grafický list 7 Různé formulace preparátů na bázi houby *B. bassiana* kmen Bba I101.



Práškové formulace spor Bba I101 uložené v plastových kontejnerech po dobu 1 roku.



Spory houby *B. bassiana* kmen Bba I101 formulované v nutričním nosiči.



Spory houby *B. bassiana* kmen Bba I101 po formulaci do oleje.

Grafický list 8 Vzhled středových kultur narostlých ve 20°C z inokula získaného z různých teplot (10, 15, 20, 25 a 30°C).



Kultura založená z inokula z 10°C.



Kultura založená z inokula z 15°C.



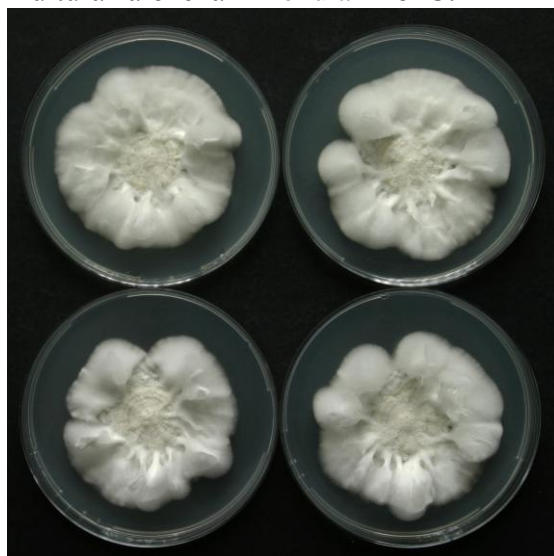
Kultura založená z inokula z 20°C.



Kultura založená z inokula z 25°C.

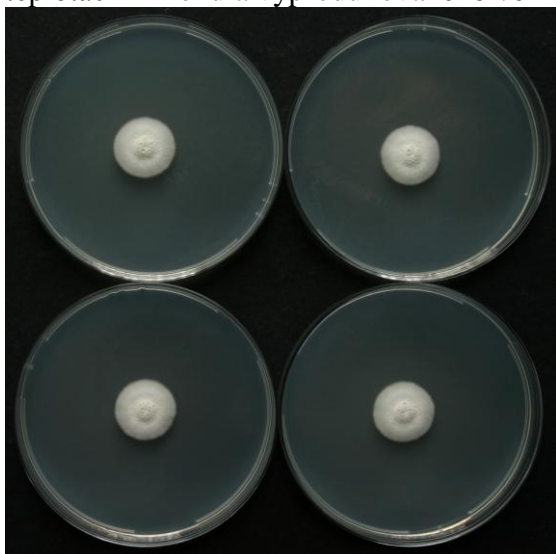


Kultura založená z inokula ze 30°C.



Vyrovnanost kultur založených z inokula ze 30°C.

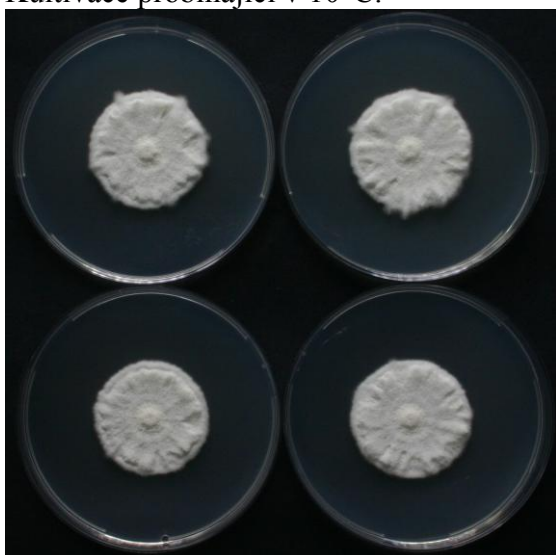
Grafický list 9 Středové kultury houby *B. bassiana* kmen Bba I101 získané v různých teplotách z inokula vyprodukovaného ve 20°C.



Kultivace probíhající v 10°C.



Kultivace probíhající v 15°C.



Kultivace probíhající ve 20°C.



Kultivace probíhající ve 25°C.

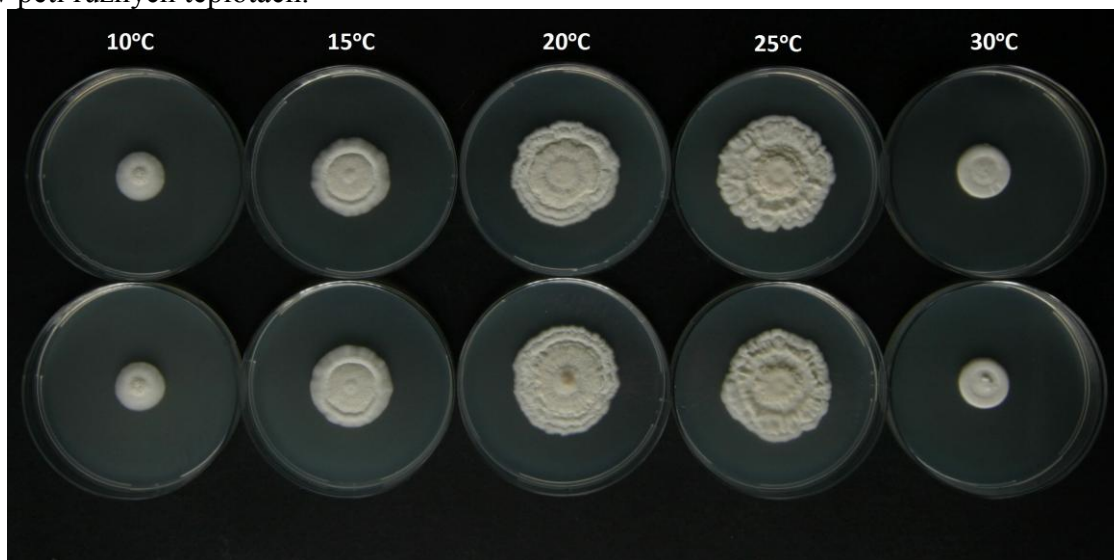


Kultivace probíhající ve 30°C.

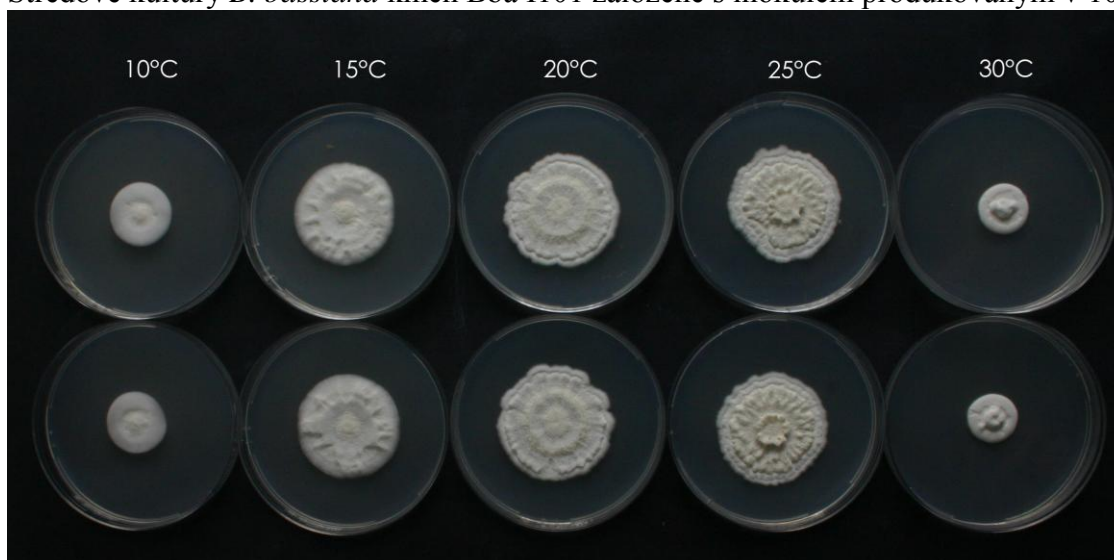


Kultivace probíhající ve 25°C.

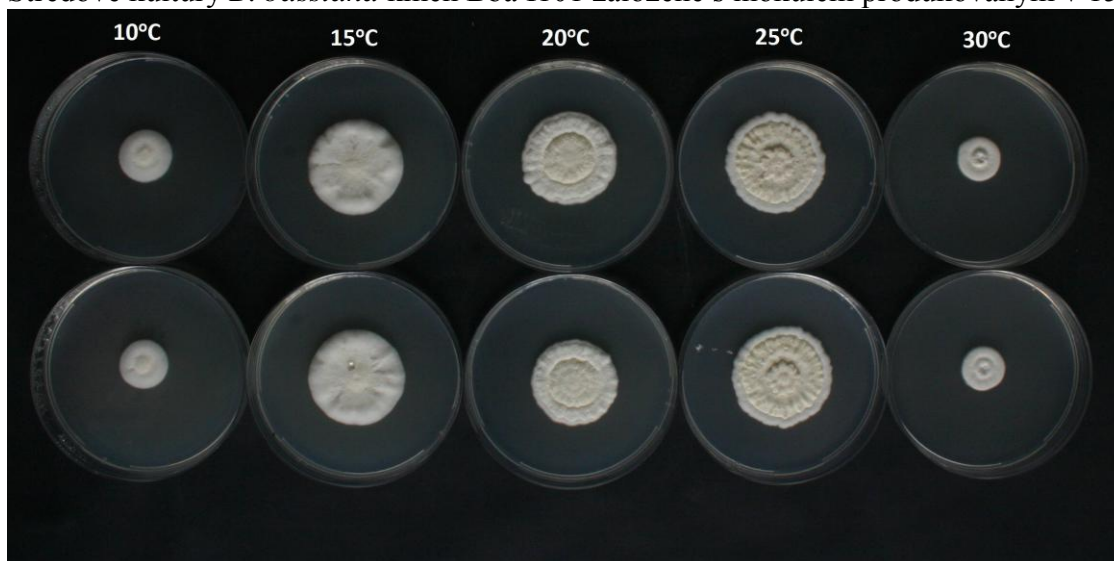
Grafický list 10 Porovnání středových kultur houby *B. bassiana* kmen Bba I101 narostlých v pěti různých teplotách.



Středové kultury *B. bassiana* kmen Bba I101 založené s inokulem produkovaným v 10°C.

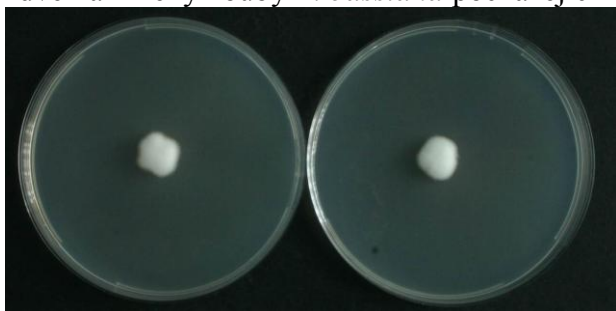


Středové kultury *B. bassiana* kmen Bba I101 založené s inokulem produkovaným v 15°C.

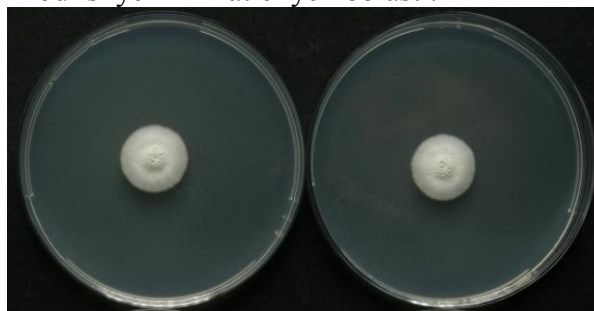


Středové kultury *B. bassiana* kmen Bba I101 založené s inokulem produkovaným ve 25°C.

Grafický list 11 Porovnání vzhledu středových kultur získaných v 5 různých teplotách se dvěma kmeny houby *B. bassiana* pocházejícími z odlišných klimatických oblastí.



Středové kultury USA Bba 01 narostlé v 10°C.



Středové kultury Bba I 101 narostlé v 10°C.



Středové kultury USA Bba 01 narostlé v 15°C.



Středové kultury Bba I 101 narostlé v 15°C.



Středové kultury USA Bba 01 narostlé ve 20°C.



Středové kultury Bba I 101 narostlé ve 20°C.



Středové kultury USA Bba 01 narostlé ve 25°C.



Středové kultury Bba I 101 narostlé ve 25°C.



Středové kultury USA Bba 01 narostlé ve 30°C.



Středové kultury Bba I 101 narostlé ve 30°C.

