

Oponent: RNDr. Alena Nováková, CSc.

Otázka:

Mohla by autorka nastínit přehled toho, jak by se mělo postupovat při nutnosti použít v biologické ochraně rostlin zcela nový biopreparát na bázi entomopatogenní houby-co vše je potřeba a v jakém sledu uskutečnit, aby mohl být preparát nově použit např. na území regionu, státu apod., čeho se vyvarovat a co není možné v žádném případě opomenout, takový vlastní přehledný návod na přípravu a zavedení nového preparátu.

Odpověď:

V současné době je celý problém komplikován obrovským zájmem o biopreparáty na bázi vláknitých hub, které jsou nezdědka ošetřeny patenty. Tudíž je při tvorbě nového preparátu nutné respektovat patentovou ochranu nebo nalézt naprosto unikátní kmen a formu preparátu. Na počátku práce je nezbytné shromáždit co nejvíce dostupných informací o daném druhu EH, jeho vlastnostech, druzích hostitelů a případně již zjištěných možnostech produkce, hodnocení a použití. Na základě zjištěných informací je zvolena metoda produkce v souvislosti s předpokládaným způsobem formulace a aplikace, která je upravována na základě dosažených výsledků (složení média, teplota, délka kultivace, atd.). U získaných spor (vzdušných spor nebo blastospor) je hodnocena jejich kvantita a zejména kvalita pomocí standardizovaných laboratorních testů.

Pokud se podaří získat dostatečné množství životaschopných spor, následuje práce na nalezení vhodného plnidla pro vytvoření stabilního preparátu (alespoň krátkodobě), které nebude snižovat kvalitu spor a v ideálním případě bude zvyšovat účinnost použitého přípravku a bude co nejvíce zjednodušovat manipulaci s přípravkem a samotnou aplikaci. Nesmí být opomenuto hodnocení virulence na zvoleném hostiteli, který by měl být v ideálním případě shodný nebo co nejvíce podobný cílovému hostiteli.

Protože se jedná o preparát na bázi živého organismu, po vytvoření a otestování preparátu v laboratorních podmínkách následují ověřovací testy, které mají za úkol prokázat vliv podmínek prostředí, stejně jako citlivost cílového organismu, který se nachází ve svém „domovském“ prostředí a není vystaven stresovým podmínkám. Ale také určit optimální načasování aplikace. Z toho důvodu se provádí pokusné aplikace a monitoring ukazující na účinnost preparátu.

Pokud se podaří vytvořit preparát, který splňuje požadavky na účinný přípravek, je možné usilovat o jeho registraci, před níž je pak nezbytné provést další analýzy spojené s nebezpečím pro člověka, případně další teplokrevná zvířata a ryby, které jsou již prováděny ve specializovaných laboratořích určených k tomuto účelu.

Oponent: doc. Ing. Bohumila Voženílková, CSc.

Otázka:

Na s. 20 autorka cituje práci autorů (Luz, Batagin 2005), kdy již přímá aplikace konidií ve formulaci oleje s vodou na hmyz, indukuje významnou mortalitu mezi larvami třetího instaru *Triatoma infestans*. O jakou biologickou metodu se jedná?

Odpověď:

V případě použití olejové formulace konidií se jedná o biologickou ochranu založenou na mikroorganismu, konkrétně entomopatogenní houby, která tvoří základ mykoinsekticidu, působícího na cílový organismus. Suspenze byla aplikována přímo na thorax a abdomen larev.

Otázka:

Proč již nejsou na trhu v ČR biopreparáty na bázi houby *B. bassiana* - Boverol a Boverosil?

Odpověď:

Oba přípravky byly registrovány v ČR menšími firmami, přípravek Boverol firmou Fytovita proti mandelinkovitým broukům, přípravek Boverosil na nosatcovité brouky a další skladištní škůdce. Přípravku Boverol však vypršela registrace 31.7.1997 a přípravku Boverosil 31.12.1996. Ani u jednoho z přípravků nebyla obnovena registrace z důvodu, že došlo ke změně registračních podmínek, jejichž splnění bylo výrazně náročnější a finančně nákladnější. Z toho důvodu nebyla opětovná registrace provedena a přípravky vypadly z nabídky na trhu v ČR.

Otázka:

Vysvětlete blíže lokální kmen Bba I101 původem z Floridy, který jste používala v biotestech.

Odpověď:

Je třeba upřesnit, že se jednalo o kmen označený USA Bba 01. Bba I101 je kódové označení pro kmen získaný v NP Šumava v roce 2004.

Kmen označený zkratkou USA Bba 01 byl v roce 2003 izolován prof. Landou z půdního vzorku získaného na Floridě pomocí selektivní živné půdy na bázi fungicidní látky dodine. Po přečištění byl ve formě alginátových pelet uložen do mykologické sbírky na katedře Rostlinné výroby a agroekologie, sekce Rostlinolékařství.

Viz. Houbové organismy používané v pokusech (Materiál a metody, str.25)

Otázka:

Proč byly larvy potměníka moučného vybírány pro biotesty podle velikosti a ne podle instaru?

Odpověď:

Larvy potměníka moučného (*T. molitor*) byly nakupovány ve specializovaných obchodech a tudíž nebylo možno získat informaci o tom, v jakém instaru se právě nalézají. Vzhledem k

tomu, že u poterníkovitých brouků se v souvislosti se způsobem chovu může vyskytovat až 20 larválních instarů, byla jediným vodítkem pro určení přibližně stejného stáří larev jejich velikost.

Otázka:

Kolik larev poterníka moučného jste sledovala v jednotlivých variantách a nedošlo k mortalitě larev při povrchovém ošetření 1% roztokem přípravku Savo?

Odpověď:

Při hodnocení produkčního média a vlivu skladování na virulenci spor houby *B. bassiana* bylo používáno 30 larev v každé variantě, tudíž pro testování produkčních médií bylo použito celkem 120 larev (vč. kontroly), při hodnocení skladovaných přípravků to bylo 120-390 larev (vč. kontroly). Při hodnocení, které bylo součástí teplotního profilu, se používalo 20 larev v každé variantě, tzn., že celkový počet larev byl při testování 1 produkční teploty 200 larev (vč. kontrol).

Povrchová sterilace je součástí standardních postupů používaných k zamezení nežádoucích kontaminací. Při povrchové sterilaci larev nedojde k jejich úhynu, pokud jsou v dobré kondici a pokud po důkladném propláchnutí larev 1% Sava okamžitě následuje opakované propláchnutí sterilní destilovanou vodou a larvy jsou umístěny na filtrační papír, aby mohla být přebytečná voda odsáta z jejich povrchu.

Otázka:

Popište podrobněji varianty, které jste sledovala na s. 31 v laboratorních podmínkách.

Odpověď:

U této otázky se odkazuji na Materiál a metody, str. 31, kde jsou jednotlivé varianty popsány.

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.

Otázka:

Na s. 38 v tabulce č. 2 není uvedena kontrola na rozdíl od tabulky č. 3. Uveďte, o jakou kontrolní variantu se jedná.

Odpověď:

V tabulce č. 2 jsou uvedeny výtěžnosti spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101 získané z jednotlivých přirozených substrátů, u kterých není vyhodnocována žádná varianta jako kontrolní. Na rozdíl od tabulky č. 3, ve které je uvedena mortalita larev *T. molitor* zjištěná po aplikaci spor houby *B. bassiana* kmen Bba I101, kde jsou kontrolní variantou larvy ošetřené pouze 0,05 % roztokem smáčedla TW 80.

Oponent: RNDr. Zdeněk Mráček, Dr.Sc.

V posudku padl dotaz, proč pro výzkum nebyl vybrán druh *I. fumosorosea* kmen PFR 97, když měl ve srovnání s *B. bassiana* a *M. anisopliae* nejvyšší výtěžnost spor.

Výběr kmene vycházel z priorit oddělení, kde se v době zahájení práce řešil problém s lýkožroutem smrkovým a bylo cílem získat co nejvíce informací o *B. bassiana*, zejména kmenu Bba I101. *I. fumosorosea* se hodí spíše pro použití ve skleníku, které jsou v současné době u nás spíše potlačovány.

Oponent nevznesl ve vyhotoveném oponentském posudku žádný další dotaz.



Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta
Studentská 13, 370 05 České Budějovice

PROTOKOL O OBHAJOBĚ DISERTAČNÍ PRÁCE DSP

JMÉNO STUDENTA DSP: Ing. Jana Šimková
NAROZEN(A): 6.7. 1983 v Českých Budějovicích

STUDIJNÍ PROGRAM: FYTOTECHNIKA
STUDIJNÍ OBOR: Ochrana rostlin
FORMA STUDIA: prezenční
ŠKOLICÍ PRACOVISŤE: ZF JU v ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
DATUM A MÍSTO KONÁNÍ ZKOUŠKY: 27.4. 2011, ČESKÉ BUDĚJOVICE
ZKUŠEBNÍ TERMÍN Č.: PRVNÍ

NÁZEV DISERTAČNÍ PRÁCE: Vývoj formulací biomasy mitosporických hub cílené na využití v programech biointenzivní integrované ochrany rostlin

VÝSLEDEK OBHAJOBY:

Prospěl(a)

Neprospěl(a)

ZKUŠEBNÍ KOMISE:

Podpis:

Předseda: prof. Ing. Vladimír Táborský, CSc.; ČZU Praha	
Členové: RNDr. Zdeněk Mráček, DrSc.; EÚ AV ČR Č. Budějovice (oponent)	
RNDr. Alena Nováková, CSc.; ÚPB AV ČR Č. Budějovice (oponent)	
doc. Ing. Bohumila Voženílková, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích (oponent)	
Ing. Rostislav Zemek, CSc.; EÚ AV ČR Č. Budějovice	
prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích	
doc. Ing. Jana Pexová Kalinová, Ph.D.; ZF JU v Českých Budějovicích	
Školitel: prof. Ing. Zdeněk Landa, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích	



Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta
Studentská 13, 370 05 České Budějovice

OBHAJOBA DISERTAČNÍ PRÁCE DSP
PROTOKOL O HLASOVÁNÍ

JMÉNO STUDENTA: Ing. Jana Šimková
NAROZEN(A): 6.7. 1983 v Českých Budějovicích

STUDIJNÍ PROGRAM: FYTOTECHNIKA
STUDIJNÍ OBOR: Ochrana rostlin
FORMA STUDIA: prezenční

Výsledek hlasování:

počet členů komise: 7
počet platných hlasů: 6
počet neplatných hlasů: 0

počet přítomných členů komise: 6
kladných: 6
záporných: 0

ZKUŠEBNÍ KOMISE:

Podpis:

Předseda: prof. Ing. Vladimír Táborský, CSc.; ČZU Praha	
Členové: RNDr. Zdeněk Mráček, DrSc.; EÚ AV ČR Č. Budějovice (oponent)	
RNDr. Alena Nováková, CSc.; UPB AV ČR Č. Budějovice (oponent)	
doc. Ing. Bohumila Voženílková, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích (oponent)	
Ing. Rostislav Zemek, CSc.; EÚ AV ČR Č. Budějovice	
prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích	OMLUVEN
doc. Ing. Jana Pexová Kalinová, Ph.D.; ZF JU v Českých Budějovicích	
Školitel: prof. Ing. Zdeněk Landa, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích	