

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
Katedra rostlinné výroby



Diplomová práce

**OPTIMALIZACE MALOOBJEMOVÉ SUBMERZNÍ KULTIVACE VYBRANÝCH
DRUHŮ ENTOMOPATOGENNÍCH HUB**

Autorka DP: Michala Suchanová

Obor studia: Všeobecné zemědělství

Specializace: Rostlinolékařství

Vedoucí DP: Prof. Ing. Zdeněk Landa CSc.

Katedra rostlinné výroby ZF JU

Sekce rostlinolékařství

Květen

2007

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, na základě vlastních zjištění a materiálů, které uvádím v seznamu použité literatury.

V Českých Budějovicích dne: 1. května 2007

.....

Poděkování:

Děkuji vedoucímu diplomové práce Prof. Ing. Zdeňku Landovi, CSc. za odborné vedení, všestrannou pomoc, cenné rady a připomínky, které mi poskytl v průběhu zpracování této diplomové práce. Dále děkuji Ing. Lukáši Leitnerovi a pracovnícím Katedry rostlinné výroby, oddělení ochrany rostlin, Marii Nýdlové a Olze Divišové za technickou a praktickou pomoc při zakládání a vyhodnocování pokusů.

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. LITERÁRNÍ REŠERŠE	2
2.1. Integrovaná ochrana rostlin	2
2.2. Bio-intenzivní integrovaná ochrana rostlin	2
2.3. Biologická ochrana rostlin	3
2.3.1. Delimitace přirozených nepřátel	4
2.4. Entomopatogenní mikroorganismy	6
2.4.1. Entomopatogenní houby	12
2.4.2. Vztah entomopatogenních hub k hostitelům	15
2.4.3. Vývoj entomopatogenních hub	17
2.4.4. Faktory ovlivňující účinnost entomopatogenních hub	19
2.5. Charakteristika nejvýznamnějších rodů a druhů entomopatogenních hub	25
2.6. Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub	31
3. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	35
4. MATERIÁL A METODIKA	36
4.1. Kmeny entomopatogenních hub používané v pokusech	36
4.2. Kultivační media	37
4.3. Obecné metodické aspekty	38
4.4. Charakteristika metodických aspektů hlavních studií projektu	38
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY	41
5.1. <i>Beauveria bassiana</i>	41
5.2. <i>Lecanicillium lecanii</i>	50
5.3. <i>Metarhizium anisopliae</i>	56
5.4. <i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	58
5.5. Změny pH živné půdy v závislosti na submerzní kultivaci	62
5.6. Středněobjemové produkce submerzní biomasy vybraných kmenů entomopatogenních hub	67
6. DISKUZE A ZÁVĚRY	72
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	76
8. PŘÍLOHA – FOTODOKUMENTACE	82

1. ÚVOD

V současné době jednoznačně převládá v ochraně rostlin snaha o využití všech metod tzv. *integrované ochrany*. Záměrem integrované ochrany je udržet četnost populací škůdců a patogenů na tolerovatelné úrovni, při záměrném preferování a vědomém využívání přirozených metod regulace populace škůdců. Integrovaná ochrana je soubor vzájemně se doplňujících agrotechnických, biologických, chemických a fyzikálních metod, které bez vedlejších negativních ekologických a toxikologických vlivů, ve svém komplexu dlouhodobě regulují populace škůdců pod ekonomickým prahem škodlivosti. Klasická chemická ochrana se stala součástí komplexu všech uvedených ochranných opatření.

Dříve se úsilí fytopatologů a pěstitelů soustředilo na úplné vyhubení patogenních agens. Cílem bylo dosáhnout takového stavu, aby se na pěstovaných rostlinách vůbec nevyskytovali. Vycházelo se z mylné představy, že procesy v biosféře se mohou bez fytopatogenů (nebo alespoň bez některých z nich) obejít. Negativní stránky rozsáhlého používání pesticidů si ale vynutily zásadní změnu ve strategii ochrany rostlin. Dospělo se k názoru, že totální vyhubení škodlivých činitelů je nereálné a rutinní používání pesticidů je nevhodné a škodlivé. Od rutinního používání pesticidů se tedy přešlo k tzv. usměrněné (cílené) ochraně rostlin.

V posledních letech se v biologické ochraně rostlin začínají prosazovat biologické přípravky na bázi entomopatogenních mikroorganismů, jako jsou viry, bakterie, hlístice a houby. V sortimentu druhů, na jejichž bázi jsou koncipovány současné mykopreparáty mají největší význam zástupci rodů *Aschersonia*, *Beuveria*, *Lecanicillium*, *Metarhizium* a *Paecilomyces*. Mezi entomopatogenními houbami jsou zastoupeni jak druhy úzce specializované, tak i druhy polyfágní, parazitující na širokém spektru hmyzích hostitelů. Řada druhů entomopatogenních hub je asociovaná i se skupinami hmyzu, u kterých se jiné druhy patogenů prakticky nevyskytují (např. mšice, molice, červci, aj.). Biotechnologie masové produkce hub využívají buď sporulace na vzdušném myceliu (povrchové kultury), nebo produkce blastospor na tekutém živném médiu (submerzní kultivace).

2. LITERÁRNÍ REŠERŠE

2.1. *Integrovaná ochrana rostlin*

Základní principy IOR byly definovány na počátku 60.let minulého století jako teoretická a praktická alternativa vůči explozivnímu nárůstu spotřeby a globální aplikaci syntetických pesticidů, zejména nové generace organických insekticidů. Klasická definice FAO z roku 1967 charakterizuje integrovanou ochranu rostlin jako „*Komplexní systém opatření, zaměřených na regulaci četnosti populací škůdců s ohledem na ekologické, ekonomické, toxikologické a hygienické požadavky, se záměrem udržet četnost populací škůdců na tolerovatelné úrovni, při záměrném preferování a vědomém využívání přirozených metod regulace populace škůdců*“ (Landa 2002).

Z definice IOR je zřejmý trvale udržitelný charakter této strategie, který je současným pojetím tzv. bio-intenzivní IOR ještě více zvýrazněn. Mezi nejvýznamnější obecné charakteristiky a principy IOR patří :

- tolerance přítomnosti škůdců jako principiálně funkční složky agrobiocenóz (alternativa vůči eradikačnímu principu chemické ochrany rostlin),
- záměrná diverzifikace metod preventivní (proaktivní) i kurativní (reaktivní) regulace četnosti populací škůdců (alternativa proti metodicky zjednodušené chemické ochraně rostlin),
- praktickou jednotkou IOR je plodinově specifický program mající charakter informačně-expertního systému,
- v procesu rozhodování a výsledného hodnocení se uplatňují i jiné faktory a kritéria než samotná účinnost (např. ekologické aspekty, hygienická a toxikologická kritéria ... aj.) (Landa 2002).

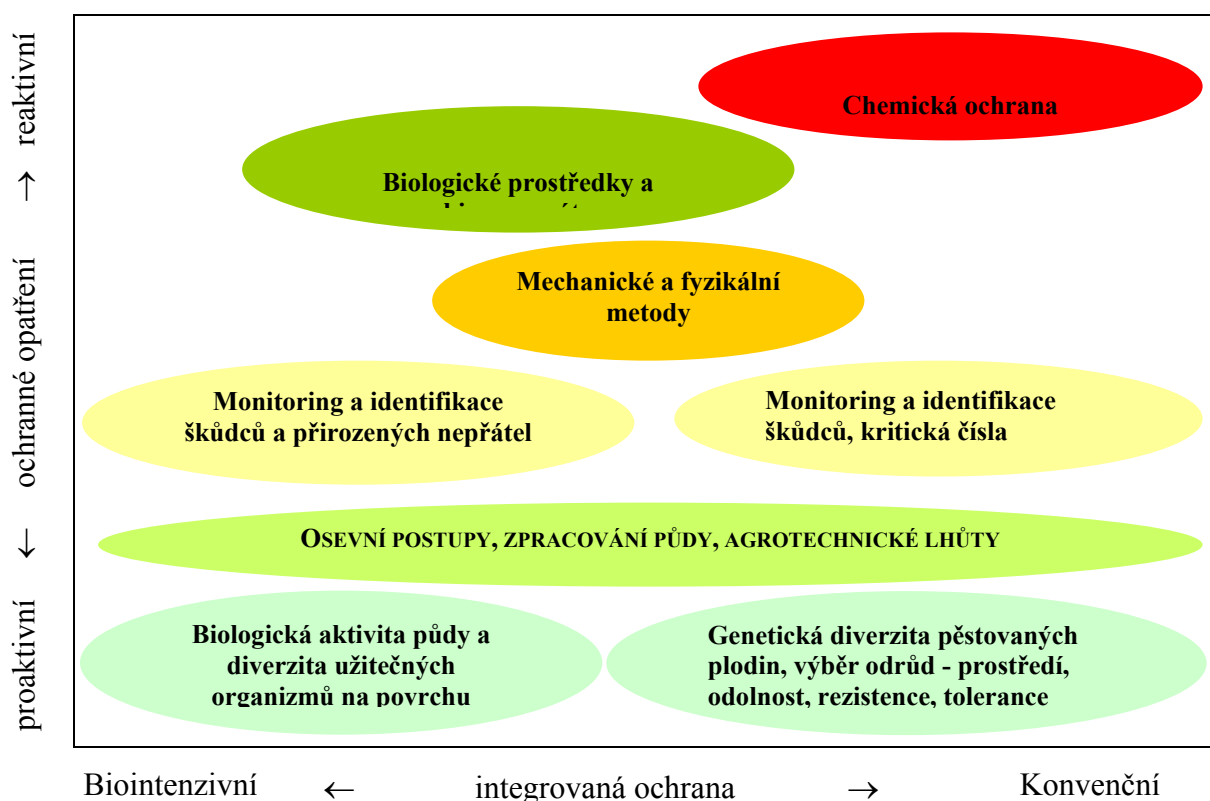
Současné definice IOR zvyšují důraz na záměrné využívání biologických a bio-rationálních metod regulace populací škůdců, což je reakce na skutečnost, že IOR je již zcela běžně zaměňována a prezentována jako „*usměrněná aplikace pesticidů*“ resp. „*cílená chemická ochrana*“. V současnosti je používáno definiční kontinuum IOR oscilující do integrované ochrany konvenční až po integrovanou ochranu bio-intenzivní (Landa 2002).

2.2. *Bio-intenzivní integrovaná ochrana rostlin*

Teorie i praxe konvenční IOR akceptuje používání syntetických pesticidů a v programech konvenční IOR je aplikace pesticidů pravidelně jediným způsobem regulace

četnosti populací škůdců a suprese vývoje a šíření chorob kulturních rostlin. Bio-intenzivní IOR používání syntetických pesticidů bez výjimky vylučuje a jen v krajních a jasně definovaných případech připouští omezené využívání přípravků bio-rationálních. Prioritním cílem programů bio-intenzivní IOR je udržení četnosti populací škůdců a frekvence výskytu chorob na tolerovatelné úrovni. K dosažení tohoto cíle jsou vypracovávány plodinově specifické programy, které jsou jednoznačně orientovány na prevenci a biologické metody ochrany rostlin (Landa 2002).

Schematické znázornění hlavních rozdílů mezi konvenční a biointenzivní integrovanou ochranou rostlin (*upraveno podle Defour 2001*)



2.3. Biologická ochrana rostlin

Biologickou ochranu je možno definovat velmi úzce jako „*záměrné využívání přirozených nepřátel s cílem regulovat populace škůdců, chorob a plevelných rostlin*“ až velmi široce, kdy spolu s přirozenými nepřáteli a antagonisty jsou zahrnovány i metody agrotechnické (např. zpracování půdy, osevnické postupy), bioracionální (např. feromony, analogy hormonů ovlivňující vývoj škůdců, syntetické látky indukující a navozující rezistenci rostlin) a genetické (např. rezistentní resp. tolerantní odrůdy, introdukce sterilních samců). Současné definice více inklinují k velmi úzkému pojetí a biologickou ochranu vymezují jen

jako „*záměrné využívání a cílenou podporu přirozených nepřátel*“, ale explicitně i jako záměrné využívání a podpora systémů v interakcích „živý proti živému“ (Landa 2002).

Biologická ochrana proti živočišným škůdcům představuje informačně ucelený systém zahrnující nejen definice základních kategorií, ale i aspekty koncepční, technologické, metodické a čistě aplikované. Mezi hlavní aspekty teoretických základů biologické ochrany proti škůdcům patří *delimitace přirozených nepřátel a základní strategie biologické ochrany*. Ke klíčovým prvkům aplikované biologické ochrany patří obecné i specifické charakteristiky biologických prostředků a přípravků, které v současnosti představují nejvýznamnější složku racionálních programů biologické ochrany rostlin proti živočišným škůdcům, zejména pak proti fytofágnímu hmyzu (Landa 2002).

2.3.1. *Delimitace přirozených nepřátel*

Na základě taxonomických, bionomických a trofických charakteristik jsou přirození nepřátelé škůdců členěni do tří základních kategorií :

Predátor (=dravec)

Z této kategorie se v aplikované biologické ochraně uplatňuje výhradně dravý hmyz a draví roztoči. Tyto skupiny dravců mají obdobné obecné vlastnosti jako predátoři patřící do jiných skupin živočichů. Predátoři jsou zpravidla stejně velcí nebo větší než jejich oběť, na kterou jsou vázáni pouze potravně. Vývoj predátorů probíhá volně bez přímé vazby na oběť. V průběhu svého vývoje konzumují dravci více jedinců oběti. Mezi predátory jsou zastoupeny jak druhy nesespecializované, predují na širokém druhovém spektru hostitelů, tak i druhy potravně úzce specializované. Predátoři jsou zastoupeni v mnoha řádech třídy hmyz (*Insecta*) a v některých čeledích roztočů (*Acarina*). Komerční biologické prostředky jsou převážně konstruovány na bázi dospělců predátorů krátkodobě imobilizovaných do kontejnerů s inertním nosičem (Landa 2002).

Parazitoid

Parazitoidi patří mezi parazity, nicméně tvoří zvláštní podskupinu této bionomické kategorie. Parazitoidi se s pravými parazity shodují v mnoha aspektech, zároveň však vykazují i řadu významných odlišností. Praví paraziti jsou zpravidla výrazně menší než jejich hostitelé a v průběhu vývoje hostitele pouze oslabují a jen zcela výjimečně jej usmrcejí. Naproti tomu, velikost parazitoidů je blízká rozměrům jejich hostitelů a úspěšný vývoj parazitoida vždy končí usmrcením hostitele. Parazitoidi i praví paraziti jsou na svého hostitele

vázání jak potravně tak i alespoň částí svého vývoje. Většina parazitoidů je na hostitele vázána celým vývojem a potravní vazbu na hostitele mohou mít i dospělci. Vývoj parazitoidů probíhá buď uvnitř hostitele (enroparazitoid) nebo na jeho povrchu (ektoparazitoid). Larvy se živí tkáněmi a tělními tekutinami a hostitele „konzumují“ pozvolna, takže se může dále vyvíjet. K usmrcení hostitele dochází nejčastěji v souvislosti dokončení vývoje parazitoida (kuklení uvnitř, na povrchu nebo v blízkém okolí hostitele). Většina parazitoidů patří mezi velmi úzce specializované druhy. Úzká specializace parazitoidů se projevuje nejen na vazbě na konkrétní druh hostitele, ale i v jejich synchronizaci s určitým vývojovým stádiem hostitele. Nejčastěji parazitovaným vývojovým stádiem bývá larva resp. nymfa fytofágního hmyzu. Velký praktický význam mají parazitoidi vázaní na vajíčka hmyzu (např. vaječní endoparaziti z čeledi *Trichogrammatidae*). Na rozdíl od predátorů, kteří jsou zastoupeni v mnoha řádech třídy *Insecta* je naprostá většina parazitoidů zastoupena v řádu *Hymenoptera*. Obecně se jedná o desítky tisíc druhů drobných parazitických vosiček. Standardní biologické prostředky na bázi parazitoidů obsahují převážně kukly, méně často imága konkrétního druhu parazitoida. Současné technologie a kapacity masových chovů některých druhů parazitoidů představují špičkové biotechnologie dosahující produkce řádově stovek milionů jedinců ročně (např. parazitoidi rodu *Trichogramma* spp., parazitická vosička *Encarsia formosa*) (Landa 2002).

Patogenní mikroorganismus

Do této kategorie přirozených nepřátel škůdců patří viry, mikroorganismy (bakterie, houby, prvoci) a zcela výjimečně makroorganismy (entomopatogenní hlístice), které jsou schopny vyvolat primární onemocnění hmyzu, roztočů nebo háďátek. K nejčastěji využívaným patří tzv. *entomopatogenní mikroorganismy*, které jsou přímo asociovány s hmyzem a mohou vyvolávat primární onemocnění u různých stádií, nejčastěji však u larev hmyzu. Významné druhy entomopatogenních mikroorganismů jsou zastoupeny ve všech výše uvedených skupinách patogenních mikroorganismů. Podstatně méně časté je záměrné využívání akarifágních a nematofágních mikroorganismů. Standardní biologické přípravky na bázi entomopatogenních virů, bakterií, vláknitých hub (*Deuteromycotina*, *Hyphomycetes*) a parazitických hlístic, ale i biopreparáty používané s cílem biologické suprese původců houbových a bakteriálních onemocnění rostlin, představují nejvýznamnější prvek konverze konvenčních technologií na technologie trvale udržitelné (Landa 2002).

2.4. Entomopatogenní mikroorganizmy

Entomopatogenní viry

Entomopatogenní viry tvoří velmi významnou, nicméně v praktické biologické ochraně dosud jen sporadicky využívanou skupinu hmyzích patogenů. V současnosti je evidováno více než 1600 druhů virů přímo asociovaných s hmyzími hostiteli. Primární infekce způsobené viry byly zaznamenány již na více než 1000 druzích hmyzích hostitelů. Zastoupení druhů schopných vyvolat primární onemocnění hmyzích hostitelů bylo prokázáno ve více než 15 čeledích virů. V některých čeledích jsou entomopatogenní viry zastoupeny jen zcela ojediněle (např. čeleď *Birnaviridae* s jediným známým zástupcem – *Drosophila X virus*), v jiných čeledích jsou entomopatogenní viry přítomny zcela běžně (např. *Entomopoxviridae*, *Rhabdoviridae*, *Iridoviridae* a *Parvoviridae*). Z hlediska zastoupení entomopatogenních druhů je však jednoznačně nejvýznamnějším taxonem čeleď *Baculoviridae* (tzv. bakuloviry), sestávající téměř výhradně z druhů asociovaných s hmyzem a jen zcela výjimečně zahrnuje viry vykazující patogenní vazbu i na jiné druhy členovců (např. roztoče) (Landa 2002).

Bakuloviry jsou velké, tyčinkovité, DNA obsahující viry, které jsou buď samostatně nebo ve skupinách ohraničeny bílkovinnou membránou a uloženy v proteinových kapslích. Proteinová matrice chrání virové částice (viriony) proti negativním vlivům prostředí. Bakuloviry tvoří několik morfologických podskupin, z nichž nejvýznamnější jsou (Zvára a kol., 1998):

- *Nucleopolyhedrus* – tento rod reprezentují druhy souhrnně nazývané NPV (*Nuclear Polyherdosis Viruses*) tzv. „viry jaderné polyedrie“ nebo též „polyedrické viry“. NPV mají infekční viriony uloženy ve skupinách v matici z krystalické bílkoviny (*polyhedrin*). V jednom polyedru je vždy více membránových obalů opouzdřujících jednu nebo více DNA – obsahujících virových částic. Polyedry jsou formovány v jádře buněk napadených tkání a v jednom polyedru může být až několik set virionů. NPV vyvolávají onemocnění běžně označováno jako „polyedrózy“ nebo „jaderné polyedrie“ (Landa 2002).
- *Granulovirus* – druhy zastoupené v tomto rodu jsou označovány jako GV (*Granulosis Virus*), tj. „granulózní viry“. GV mají vždy pouze jeden infekční virion opouzdřený bílkovinným obalem uloženým v sekundární ochranné matici (bílkovina *granulin*). GV zprvu replikují v jádře napadené buňky, nicméně jejich replikace probíhá i v cytoplasmě. GV vyvolávají onemocnění souhrnně označována jako granulózy (Landa 2002).

Pouze výjimečně jsou mezi bakuloviry přítomny i druhy, které tvoří partikule nezapouzdřené v ochranné bílkovinné matici (tzv. NOV – *Non Occluded Viruses*) (Landa 2002).

Bakuloviry jsou zpravidla přísně selektivní a jednotlivé GV nebo NPV viry mohou vyvolávat nákazu pouze u jednoho druhu hostitele. Vyvolávají onemocnění převážně u larev hmyzu a ostatní vývojová stádia buď nenapadají vůbec (vajíčko, kukla) nebo jen zcela výjimečně (dospělec). Virová onemocnění jsou známá u larev mnoha druhů hmyzu různých řádů (např. *Coleoptera*, *Hymenoptera*, *Diptera*), nicméně jednoznačně největší význam mají virová onemocnění u larev motýlů (*Lepidoptera*) (Zvára a kol., 1998).

Virové onemocnění iniciují virové granule (GV) nebo polyedry (NPV), které se do těla larev dostávají pasivně s potravou. V alkalickém prostředí zažívacího traktu larev se rozpouští bílkovinný obal a uvolněné viriony napadají buňky epitelu středního střeva (tzv. primární infekce). Po replikaci v jádru buněk jsou produkovány nové viriony, které atakují okolní buňky nebo pronikají do tělní dutiny, kde spolu s hemolymfou cirkulují a způsobují systemické onemocnění tělních orgánů a tkání (tzv. sekundární infekce). K opětné tvorbě granulí a polyedrů dochází až v konečné fázi vývoje nákazy. Průběh infekce uvnitř hostitele je doprovázen typickými vnějšími symptomy (snížený až zastavený příjem potravy, omezená pohyblivost, disfunkce tkání a orgánů, barevné změny – krémově žluté zbarvení korelující s postupnou tvorbou granulí nebo polyedrů, tzv. *mléčná nemoc*). Letálně se nákaza projeví nejčastěji 5. – 14. den po proniknutí bakuloviru do zažívacího traktu hostitele. Tkáně usmrcené larvy jsou zcela desintegrovány a hemolymfa je vyplněna masou granulí nebo polyedrů. Nákaza se v populaci škůdců šíří prostřednictvím potravy kontaminované granulemi nebo polyedry, které se do okolí uvolňují z usmrcených larev. K vyvolání nákazy postačuje 1 – 100 granulí nebo polyedrů na jednu larvu (Zvára a kol., 1998).

Aktivní složku komerčních biopreparátů na bázi virů tvoří virové granule nebo polyedry vyprodukované pomocí velkokapacitních biotechnologií, ve kterých je v řízených a plánovitých „in vitro“ systémech na specifickém hostiteli imitován přirozený průběh nákazy. Formulace biopreparátů na bázi virů jsou obdobné formulacím syntetických pesticidů (DP-WP, SK) (Zvára a kol., 1998).

Biopreparáty na bázi virů jsou aplikovány ve formě vodních suspenzí, granulí nebo polyedrů. Pro aplikaci lze použít standardní aplikační techniku. Při aplikaci je nutno respektovat skutečnost, že tyto přípravky působí výhradně perorálně a jejich účinnost je v přímé úměře s kvalitou aplikace (J.Zvára a kol., 1998).

Entomopatogenní bakterie

Dosud bylo izolováno více než 90 druhů bakterií prokazatelně vykazujících statut fakultativních nebo obligátních patogenů hmyzu. K významným druhům entomopatogenních bakterií patří jak Gram-negativní tyčinkovité bakterie z čeledi *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas aeuriginosa*, *P. fluorescens*) a *Enterobacteriaceae* (*Serratia marcescens*, *S. entomophila*), tak i Gram-pozitivní bakterie z čeledi *Deinococcaceae* (*Melissococcus pluton*). Z hlediska praktického využití v biologické ochraně rostlin však v sortimentu entomopatogenních druhů sehrávají jednoznačně bezkonkurenční úlohu bakterie z čeledi *Baccillaceae* (Gram+, tyčinkovité bakterie formující endospory), zejména pak zástupci rodů *Clostridium* (*C. bifermentans*) a *Bacillus*. Rod *Bacillus* reprezentuje přibližně 70 druhů, z nichž více než 20 je běžně izolováno z různých druhů hmyzích hostitelů. K běžným entomopatogenním zástupcům tohoto rodu patří *Bacillus alvei*, *B. cereus*, *B. larvae*, *B. laterosporus*, *B. popilliae*, *B. sphaericus*, *B. subtilis* a svým významem zcela unikátní druh *Bacillus thuringiensis* (Landa 2002).

Bacillus thuringiensis (dále též *Bt.*) je sporulující, gram-pozitivní tyčinkovitá bakterie, která se běžně vyskytuje v půdě. V průběhu tvorby spor vytváří *Bt.* nejen vegetativní buňku, ale i intracelulární krystal, který sehrává klíčovou úlohu v patogenezi této bakterie. Toxicita a druhová nebo skupinová specifita *Bt.* je dána složením proteinového krystalu. Toxigenní krystal většiny izolátů *Bt.* obsahuje různé kombinace 3 – 5 různých toxinů, které vykazují schopnost interakce se specifickými receptory středního střeva zažívacího traktu larev některých druhů hmyzu. V současnosti je známo více jak 20 různých bílkovinných toxinů (tzv. Cry proteinů), jejichž kombinace se vyskytují v krystalech různých izolátů *Bt.* Pro kategorizaci izolátů *Bt.* jsou využívány H antigeny, pomocí kterých jsou izoláty *Bt.* zařazovány do sérotypových skupin a následně i do specifických kmenů. Významnou charakteristikou jednotlivých sérotypů a kmenů *Bt.* je skupinově selektivní účinek. K nejznámějším patří kmen *Bt. kurstaki* (sérotyp H 3a3b3c), jehož izoláty vykazují vynikající účinek na larvy motýlů, kmen *Bt. israeliensis* (H 14), selektivně účinkující na larvy komárů a jiných dvoukřídlých a kmen *Bt. tenebrionis* (H 8) selektivně účinkující na larvy některých brouků, včetně mandelinky bramborové (Zvára a kol., 1998).

Patogeneze *Bt.* probíhá výhradně v larvách vnímavých druhů hmyzu a má dvě konsekventní fáze:

- *toxikémie* - oslabení až usmrcení hostitele v důsledku působení toxických δ -endotoxinů parasporálního krystalu na buňky epitelu středního střeva hostitele.
- *septikémie* - invaze spor *Bt.* do tělní dutiny doprovázená kolonizací a utilizací tkání a

dezintegraci hostitele v důsledku namnožení bakterií (Landa 2002).

V obecné rovině lze základní posloupnosti v patogenezi *Bt.* charakterizovat následovně. Krystaly *Bt.* jsou v principu agregáty velkých proteinů (polypeptidy, 130 – 140 kDa), které fungují jako protoxiny a musí být nejprve aktivovány. Krystaly *Bt.* jsou velmi stabilní (nerozpustné v neutrálním a kyselém prostředí) a v zaživacím traktu většiny živočichů (včetně člověka) proto nedochází k aktivaci protoxinů. V alkalickém prostředí střeva hmyzích proteinů (pH zpravidla > 9,5) dochází k rozpuštění krystalu a aktivaci protoxinů. Protoxin sám o sobě toxicky nepůsobí, ale v důsledku působení proteolytických enzymů jsou postupně degradovány na toxiny (proteiny o průměrné velikosti 60 kDa), které se vážou na specifické receptory na povrchu buněk epitelu středního střeva a indukují tvorbu mikroskopických pórů v buněčných membránách. V důsledku poškození buněčných membrán dochází k narušení jejich semipermeability, což v důsledku vede k neusměrněnému pohybu iontů. Epiteliální buňky poškozené toxiny *Bt.* bobtnají a následně odumírají (praskají, lyzují). V důsledku paralýzy a rozpadu buněk dochází k rychlé imobilizaci až desintegraci celé střední části zaživacího traktu napadeného hostitele, larva přestává přijímat potravu, produkuje tekuté výkaly, není schopna pohybu a často již v této fázi hyne (letální toxikémie). V narušeném středním střevě dochází k výraznému snížení pH, což způsobuje aktivaci spor *Bt.* (případně i jiných nepatogenních druhů bakterií), které klíčí, pronikají do tělní dutiny hostitele a po namnožení způsobují letální septikémii. V této fázi infikovaná larva v důsledku vnitřní dekompozice postupně měkne, ztekuceje a mění barvu na hnědočernou. Příznaky septikémie jsou na larvách zpravidla zjevné 3 – 5 dnů od iniciace infekce (Landa 2002).

Biopreparáty na bázi *Bt.* jsou produkovány pomocí velkokapacitních fermentačních biotechnologií, které využívají schopnost *Bt.* formovat kompletní spory i v saprofytickém cyklu při kultivaci na tekuté živné půdě. V současnosti jsou dostupné dvě finální formy biopreparátů na bázi *Bt.*. Tradiční finální formou je biomasa vitálních spor finalizovaných spolu s pevným nebo tekutým inertním nosičem. Nově jsou vyráběny i biopreparáty obsahující pouze toxigenní krystal (vegetativní buňka *Bt.* je inaktivována teplem nebo ultrazvukem). V obou případech jsou biopreparáty aplikovány ve formě vodních suspenzí spor resp. toxigenních krystalů. Při aplikaci je nutno respektovat požerový účinek přípravku. Biopreparáty na bázi *Bt.* jsou široce využívány v ochraně polních plodin a zahradních a lesních kultur proti larvám mnoha druhů motýlů a brouků. V menší míře jsou biopreparáty na bázi *Bt. israeliensis* využívány i při regulaci populací komárů a muchniček (Zvára a kol., 1998).

Entomopatogenní hlístice

Entomoparazitické hlístice tvoří běžnou součást půdní fauny. Z více než deseti čeledí hlístic (*Nematoda*), ve kterých jsou zastoupeny entomoparazitické druhy jsou pro účely praktické biologické ochrany přednostně využívány hlístovky (*Rhabditida*) z čeledí *Steinernematidae* a *Heterorhabditis*, zejména pak různé druhy zastoupené v rodech *Steinernema* (syn. *Neoplectana*) a *Heterorhabditis* (Zvára a kol., 1998). Ty představují dynamicky se rozvíjející skupinu bioagens, jejichž význam v praktické biologické ochraně rostlin rok od roku stoupá. Hlavní důvody stoupajícího významu entomoparazitických hlístic jsou především technologické. Zavedení dvoufázových fermentačních technologií vyřešilo problém masové produkce biomasy infekčních larev a nové formulace zpřístupnily biopreparáty na bázi hlístic i pro rutinní a velkoplošné používání (Landa 2002).

Entomoparazitické hlístovky lze obecně charakterizovat jako nesespecializované parazity, kteří mohou napadat různá vývojová stádia (larvy, kukly i dospělé) mnoha druhů hmyzu. (Zvára a kol., 1998). Polyfagie hlístic souvisí s jejich parazitizmem. Spolupůsobením symbiotického komplexu „bakterie - hlístice“ dochází k velmi rychlému usmrcení napadeného jedince, což prakticky znemožňuje vytvoření vzájemných vysoce specializovaných adaptací, které jsou jinak pro systém „parazit - hostitel“ typické. Za těchto podmínek je potenciálně vhodným hostitelem prakticky každý hmyzí druh, který:

- osidluje vhodnou ekologickou niku,
- umožňuje vytvoření potřebné biomasy symbiotických bakterií,
- svou velikostí umožňuje kolonizaci, vývoj a reprodukci hlístic v tělní dutině (Landa 2002).

Mezi vhodné hostitele proto patří spíše větší až velké druhy hmyzu, které jsou alespoň částí svého vývoje vázány na půdu. Nejčastěji jsou hlísticemi napadána juvenilní stádia hmyzu (tj. larvy, případně kukly), méně často dospělci, vajíčka hmyzu hlísticemi napadána nejsou. K běžným hostitelům patří larvy a kukly nosatcovitých (*Curculionidae*, např. lalokonosci – *Otiorrhynchus* ssp., rýhonosci – *Bothynoderes* ssp.) nebo vrubounovitých brouků (*Scarabeidae*, chrousti a chroustci), housenky a kukly motýlů (např. různé druhy osenic, drvopleňů, zavíječů, obalečů, aj.), housenice a kukly některých blanokřídlých (pilatky, ploskohřbetky) a dvoukřídlých (např. muchnice, tiplice, vrtalky, vrtule, květilky, mouchy, aj.). Mezi významné hostitele patří také nymfy a dospělci krtonožek (např. zástupci rodů *Gryllotalpa*, *Scapteriscus*), švábů (*Blatella germanica*) a mnoha dalších druhů hmyzu (Landa 2002).

Účinnost entomoparazitických hlístic výrazně ovlivňují i některé prvky v jejich chování. Některé druhy hlístic (např. *S. carpocarpis* a *S. scapterisci*) mají tendenci usadit se v povrchové vrstvě půdy, vyčkávat na pohybujícího se hostitele a napadat jej „ze zálohy“ (vyhledávací strategie nazývaná „sit & wait“ tj. „sedět a čekat“). Odlišnou strategii používají středně (*S. feltiae*, *S. riobravis*) až velmi pohyblivé hlístice (*S. glaseri*, *H. bacteriophora* a *H. megidis*), které aktivně vyhledávají hostitele v hlubokém profilu půdy. Tyto hlístice distančně detekují a aktivně vyhledávají hmyz pomocí druhově specifických látek produkovaných hostiteli. Strategie aktivního pohybu a vyhledávání je vynikající adaptací ve vazbě na málo pohyblivé až nepohyblivé druhy resp. stádia hmyzích hostitelů (např. beznohé larvy nosatců, ponravy chroustů a chroustků, kukly hmyzu a pod.) (Landa 2002).

Vývoj entomoparazitických hlístic je nepřímý a probíhá postupnou proměnou přes kvalitativně odlišná vývojová stádia (vejíčko, larva, dospělec) resp. stupně (larvy 1. – 4. stupně). Ve vývojovém cyklu hlístic sehrává unikátní úlohu larva 3. stupně (L3), která je vzhledem ke svým specifickým vlastnostem a funkcím označována buď jako *invazní larva* nebo častěji jako *infekční larva* (*infective juvenile* = IJ). Infekční larva je jediným vývojovým stupněm hlístic, který nepřijímá potravu a je schopen aktivně vyhledat a napadat hmyzího hostitele, do kterého zpravidla proniká prostřednictvím přirozených otvorů (ústní, řitní otvor, dýchací otvory). Infekční larva může kolonizovat hostitele i aktivně penetrací stěnou zažívacího traktu nebo trachejí. Méně častá je invaze IJ přímo do tělní dutiny aktivní penetrací a průnikem přes kutikulu. Označení *infekční larva* je odvozeno od funkce těchto larev po invazi do tělní dutiny. V infekční fázi je u L3 hlístic v přední části zažívacího traktu vyvinuta zvláštní bakteriální komůrka, ve které je uchovávána zárodečná kultura symbiotických bakterií. Po proniknutí vypouštějí IJ symbiotické bakterie do hemolymfy. Nainokulované bakterie jsou oběhovým systémem hmyzu roznášeny do všech tělních odstavců, rychle se namnožují a během 24 – 48 hodin způsobují usmrcení napadeného hostitele. Působení bakterií se projevuje rychlou desintegrací tělních tkání a orgánů hostitele, nicméně primární příčinou usmrcení napadeného hmyzu bývá masivní septikémie. Po úspěšné invazi IJ je další vývoj hlístic vázán na tělní dutinu hostitele. Infekční larva dokončuje vývoj a po svlékání se mění na larvu posledního stupně (L4). Vývoj končí proměnou L4 v dospělce první generace (G1). Další vývoj v systému „hlístice - hostitel“ závisí na velikosti biomasy symbiotických bakterií. V usmrceném hmyzu mohou být realizovány i 2 – 3 kompletní vývojové cykly, které lze označit za neparazitické, protože ani jindy invazní L3 stupeň nemigruje a nenapadá nového hostitele (Landa 2002).

Symbiotické bakterie nejsou primárně patogenní, protože postrádají schopnost aktivně

pronikat do tělní dutiny hmyzu, a to i v případech, kdy proniknou do zažívacího traktu spolu s potravou. Klíčovým mechanismem této zvláštní verze parazitizmu je symbiotická asociace entomopatogenních hlístic se specifickými bakteriemi (druh, kmen). IJ v tomto systému působí jako „vektor“ zajišťující transport bakterií do vhodného hostitele a symbiotické bakterie vytvářejí podmínky potřebné pro vývoj, přežívání a namnožení asociovaného druhu hlístice (Landa 2002).

Všechny druhy entomoparazitických hlístic rodu *Steinernema* jsou asociovány s bakteriemi rodu *Xenorhabdus* a hlístice rodu *Heterorhabditis* jsou symbioticky asociovány s bakteriemi rodu *Photorhabdus*. Každý druh hlístic vykazuje přirozenou symbiotickou vazbu pouze vůči jednomu druhu symbiotické bakterie, nicméně určitý druh bakterie může být symbioticky vázán s více druhy hlístic (např. druh *Xenorhabdus bovienii* je asociován s hlísticemi *Steinernema affinis*, *S. feltiae*, *S. intermedia* a *S. kraussei*, obdobně pak symbiotický druh bakterie *Photorhabdus luminiscens* byl detekován u *Heterorhabditis bacteriophora*, *H. megidis* a *H. zealandicus*) (Landa 2002).

2.4. 1. Entomopatogenní houby

Houby patří mezi nejdéle známé a nejčastěji determinované mikroorganismy asociované s hmyzem (Landa 2002). Jsou polygeneticky rozmanitou skupinou eukaryotických heterotrofních mikroorganismů rozmnožujících se buď sexuálně nebo asexuálně (Ignis a kol. 2001, Goettel a kol. 2000). Mnoho entomopatogenních hub je v přírodě relativně běžných. Často vyvolávají přirozené epizootie v populacích hmyzu, čímž se řadí mezi významné mikroorganismy regulující hmyzí populace (Butt, Goettel 2000). Nejčastěji jsou parazitické mykózy zjišťovány na druzích patřících do řádů ploštice (*Hemiptera*), rovnokřídlí (*Orthoptera*), třásnokřídlí (*Thysanoptera*), stejnokřídlí (*Homoptera*), motýli (*Lepidoptera*), brouci (*Coleoptera*) a dvoukřídlí (*Diptera*) (Weiser 1991, Ferron 1975, Tanada, Kaya 1993). Entomopatogenní houby mohou napadat všechna vývojová stádia hmyzu, nicméně nejčastěji se vyskytují na larvách a kuklách, méně často jsou houbami infikováni dospělci a vajíčka hmyzu (Landa 2002).

Klasifikace entomopatogenních hub

V systému hub jsou entomopatogenní druhy zastoupeny v mnoha řádech různých kmenů. Nejvýznamnější zastoupení mají entomopatogenní houby v kmenech Mastigomycotina (*Chytridiomycetes: Blastocladales*), Zygomycotina (*Zygomycetes: Entomophthorales, Mucorales*), Ascomycotina (*Pyrenomycetes: Spaeriales, Laboulbeniales*) a

Deuteromycotina (*Hyphomycetes: Moniliales*) (Gäumann 1964, Ainsworth 1973, McCoy a kol. 1988, Samson a kol. 1988). Velmi významnou a poměrně známou skupinu entomopatogenních hub představují houby z řádu Entomophthorales (*Zygomycotina, Zygomycetes*). Entomopatogenní houby zastoupené v tomto řádu (např. houby patřící do rodů *Conidiobolus, Entomophaga, Entomophthora, Erynia, Neozygites* a další) (Pell a kol. 2001) reprezentují převážně obligátně parazitické druhy, jejichž vývojový cyklus je vázán výhradně na živého hostitele. Biotrofní charakter však de facto znemožňuje praktické využívání těchto hub. Převážnou většinu těchto hub z řádu *Entomophthorales* je možno produkovat pouze v „in vivo“ systémech na přirozených hostitelích, což prakticky znemožňuje jejich masovou produkci, která je nezbytným předpokladem komercializace standardních biopreparátů (Papierok, Hajek 1999, Pell a kol. 2001).

Z hlediska praktické biologické ochrany mají největší význam vláknité deuteromycety (*Deuteromycotina, Hyphomycetes, Moniliales*). K nejnámějším patří houby rodů *Aschersonia, Beauveria, Hirsutella, Lecanicillium (Lecanicillium), Metarhizium, Nomuraea, Paecilomyces* a *Tolypocladium*. V těchto rodech je zastoupena řada druhů, z nichž přibližně 25 je v současnosti již využíváno ve formě standardních biopreparátů v biologické regulaci populací škůdců zemědělských plodin a kultur. Na rozdíl od obligátně parazitických *Entomophthorales*, představují vláknité deuteromycety parazity fakultativní. 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) (Landa 2002).

Základní charakteristiky Entomophthorales a Hyphomycetes

Charakteristika	Entomophthorales	Hyphomycetes
Velikost a množství konidií na mrtvého jedince	>10µm, relativně málo konidií	< 10µm, relativně mnoho konidií
Šíření konidií	aktivní, kromě <i>Massospora</i> spp., <i>Strongwellsea</i> spp. a některých <i>Neozygites</i> spp.	není aktivní
Přítomnost mucilagenních kapek na konidiích	přítomný	nepřítomný, kromě <i>Lecanicillium</i> spp., <i>Hirsutella</i> spp. a <i>Aschersonia</i> spp.
Rhizoidy	existují u mnoha druhů	nepřítomny
Schopnost změnit chování hostitele	mohou změnit chování, např. <i>Entomophora muscae</i> , <i>Entomophaga grylli</i>	nemají vliv na chování, kromě <i>Sorospora</i> spp.
Sporulace před usmrcením	u některých druhů, např. <i>Entomophora thripidum</i> ,	u některých druhů: <i>Lecanicillium lecanii</i>

	<i>Strongwellsea castrans</i> a <i>Massospora</i> spp.	
Epizootie	běžné u foliárního hmyzu	běžné u půdního hmyzu
Hostitelské spektrum	obvykle úzké	obvykle široké, mimo <i>Lecanicillium lecanii</i> a <i>Hirsutella thompsonii</i>
Produkce toxinů	neznámá	zaznamenána u mnohých druhů
Saprophytismus	neznámý, kromě <i>Conidiobolus</i> spp.	známý u mnoha druhů
Odpočinkové spory	u mnoha druhů	nepřítomny, mimo chlamydo- spor <i>Sorospora</i> spp.
Virulence	málo konidií nezbytných pro infekci	mnoho konidií nezbytných pro infekci, mimo <i>Lecanicillium lecanii</i>
Sporulace a rychlost klíčení	rychlá	pomalá
Produkce konidií vyššího řádu	u všech druhů	pouze u <i>Aschersonia</i> spp.

Přehled klasifikace entomopatogenních hub (upraveno podle McCoy a kol. 1988 , Samson a kol. 1988 , Humber 1999)

SUBPHYLUM	CLASSIS	ORDO	GENUS
Mastigomycotina	Chytridiomycetes	Chytridiales	<i>Coccolomyces</i> <i>Myiophagus</i>
	Chytridiomycetes	Blastocladales	<i>Coelomomyces</i>
	Oomycetes	Laganidiales	<i>Laganidium</i>
	Oomycetes	Saprolegniales	<i>Leptolegnia</i> <i>Couchia</i>
Zygomycotina	Zygomycetes	Mucorales	<i>Sporodiniella</i>
	Zygomycetes	Entomophthorales	<i>Conidibolus</i> <i>Entomophaga</i> <i>Entomophthora</i> <i>Erynia</i> <i>Massospora</i> <i>Meristacrium</i> <i>Neozygites</i>
Ascomycotina	Hemiascomycetes	Endomycetales	<i>Blastotendron</i> <i>Metschnikowia</i> <i>Mycoderma</i> <i>Saccharomyces</i>
	Plectomycetes	Ascopherales	<i>Ascophaera</i>
	Pyrenomycetes	Sphaeriales	<i>Cordyceps</i> <i>Torrubiella</i> <i>Nectria</i> <i>Hypocrella</i> <i>Callonectria</i>
	Laboulbeniomycetes	Laboulbeniales	<i>Filariomyces</i> <i>Hesperomyces</i>

	Laculoascomycetes Loculoascomycetes	Myriangiales Pleosporales	<i>Trenomyces</i> <i>Myriangum</i> <i>Podonectria</i>
Deuteromycotina	Hyphomycetes	Moniliales	<i>Akanthomyces</i> <i>Aspergillus</i> <i>Beauveria</i> <i>Culicinomyces</i> <i>Engyodontium</i> <i>Fusarium</i> <i>Gibellula</i> <i>Hirsutella</i> <i>Hymenostilbe</i> <i>Lecanicillium</i> <i>Metarhizium</i> <i>Nomuraea</i> <i>Paecilomyces</i> <i>Paraisaria</i> <i>Pleurodemospora</i> <i>Polycephalomyces</i> <i>Pseudogibellula</i> <i>Sorosporella</i> <i>Sporothrix</i> <i>Stibella</i> <i>Tilachlidium</i> <i>Tolypocladium</i> <i>Aschersonia</i> <i>Tetranacrium</i> <i>Aegerita</i>
	Coelomycetes	Sphaeropsidales	<i>Mycelia sterilia</i>
Basidiomycotina	Phragmobasidiomycetes	Septobasidiales	<i>Filobasidiella</i> <i>Septobasidium</i> <i>Uredinella</i>

2.4.2. Vztah entomopatogenních hub k hostitelům

Entomopatogenní houby působí převážně jako ektoparaziti hmyzu. Endoparazitický status entomopatogenních hub je poměrně výjimečný (pouze některé druhy z Deuteromycotina a převážná část zástupců z řádu Laboulbeniales). Hmyzí hostitel je zpravidla infikován sporami nebo konidiiemi (Zygomycotina), konidiiemi nebo blastosporami (Deuteromycotina), zoosporami (Mastigomycotila) a askosporami (Ascomycotina) (McCoy a kol. 1988). Vstupní branou infekce je převážně kutikula hmyzu. V některých případech proniká patogen do těla hostitele prostřednictvím přirozených otvorů (ústní orgány, tracheální systém, řitní otvor). Transovariální přenos hub nebyl dosud prokázán s výjimkou *Coelomycidium stimuii* u muchniček a v případě některých mutualistických kvasinek (Tarrant, Soper 1986).

Parazitická valence entomopatogenních hub se pohybuje v rozmezí od druhové

specializace (některé druhy z Entomophthorales) až po širokou polyfagii (Deuteromycotina). Většina druhů široce polyfágních entomopatogenních hub (např. *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Paecilomyces farinosus*, *Lecanicillium lecanii* a další) může obecně parazitovat na velmi širokém spektru hostitelů. S širokou polyfagií je často spojena tvorba druhově identických, nicméně značně různorodých kmenů (izolátů), které mohou vykazovat i úzkou hostitelskou specializaci (McCoy a kol. 1988). Typickým příkladem je tvorba velmi specifických patotypů u polyfágních hub *B. bassiana*, *M. anisopliae* a *L. lecanii*, u kterých je hostitelské spektrum kmene výrazně predeterminováno druhem hostitele, z kterého byl konkrétní patotyp izolován (Fargeus 1976). Druhovú specifitu entomopatogenních hub ve vztahu k hostitelům je nejčastěji podmíněna fyziologickým stavem hostitele, vlastnostmi kutikuly hostitelského druhu a nutritivní specializací (nároky) patogena (McCoy a kol. 1988). Druhovú specifika entomopatogenních hub je nepřímo ovlivněna i biotickými faktory, které jsou typické pro ekologickou niku hostitele. V komplexu interakcí, které podmiňují šíři spektra hostitelských druhů sehrávají významnou úlohu i obranné systémy hostitele. Z obranných systémů hmyzu se v obraně proti houbovým nákazám nejčastěji uplatňují tři typy obranných reakcí, které byly pozorovány v hmyzím hemocelu: 1) fagocytóza, 2) buněčná enkapsulace a 3) humorální enkapsulace (Charnley 1984).

Některé řády hmyzu jsou s entomopatogenními houbami asociovány velmi intenzívně a v porovnání s ostatními skupinami entomopatogenních mikroorganismů a virů tvoří entomopatogenní houby jednoznačně nejvýznamnější skupinu patogenů. Příklad takovéto asociace představuje řád Homoptera. Některé skupiny stejnokřídých (např. mšice, molice) jsou asociovány s širokým sortimentem druhů entomopatogenních hub a to včetně úzce specializovaných druhů entomopatogenních hub, které mohou vyvolávat nákazy na velmi úzkém sortimentu hostitelů. Příkladem mohou být úzce specializované houby rodu *Aschersonia*, které jsou asociovány téměř výhradně s molicemi (Homoptera, Aleyrodidae). V následujícím přehledu je uveden stručný výčet druhů hub, které byly doposud izolovány z různých druhů molic.

Příklady druhů entomopatogenních hub zjištěných na molicích (Fransen 1990, Landa 1994)

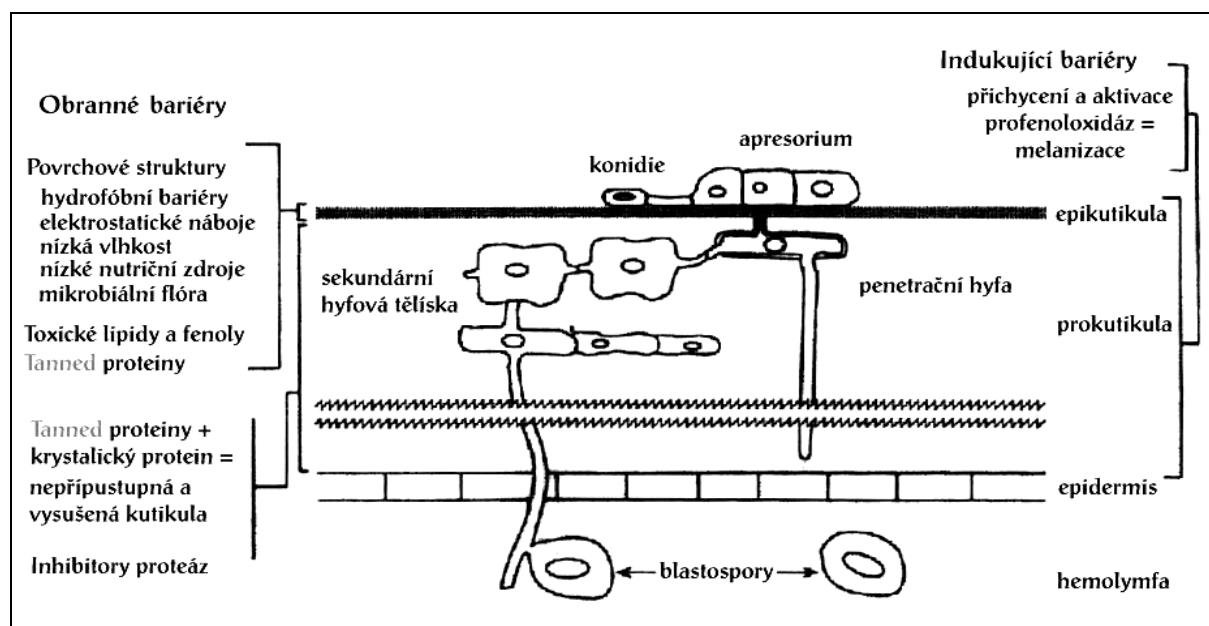
Rod/druh patogena	Rod/druh hostitele
<i>Acremonium sp.</i>	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>
<i>Aegeria webberi</i>	<i>Dialeurodes citri</i> , <i>D. citrifolii</i>
	<i>Aleurocanthus spiniferus</i> , <i>A. woglumi</i>

<i>Aphanocladium album</i>	<i>T. vaporariorum</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>T. vaporariorum, D. citri</i>
<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Aleurodicus cocois</i>
<i>Cladosporium aphidis</i>	<i>Aleurochitron aceris</i>
<i>Erynia radicans</i>	<i>Bemisia tabaci</i>
<i>Fusarium scripi (F. aleyrodis)</i>	<i>Dialeurodesn sp.</i>
<i>Fusarium verticilloides</i>	<i>T. vaporariorum</i>
<i>Microcera sp.</i>	<i>D. citrifolii, D. citri</i>
<i>Paecilomyces cinnamomeus</i>	<i>D. citri</i>
<i>Paecilomyces farinosus</i>	<i>B. tabaci</i>
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	<i>T. vaporariorum, B. tabaci</i>
<i>Sporotrichum sp.</i>	<i>D. citri</i>
<i>Trichothecium rozšum</i>	<i>T. vaporariorum</i>
<i>Lecanicillium fusisporum</i>	<i>T. vaporariorum</i>
<i>Lecanicillium lecanii</i>	<i>D. citri, B. tabaci, T. vaporariorum</i>

2.4.3. Vývoj entomopatogenních hub

Houbové onemocnění zpravidla iniciují vitální a virulentní konidie uchycené na těle hostitele. Konidie některých druhů hub jsou pro přichycení na tělo hostitele vybaveny adhezivními substancemi (mucilageny), pomocí kterých vytvářejí pevnou vazbu s kutikulou hostitele již při prvním kontaktu (např. houby *Lecanicillium lecanii*, *Aschersonia aleyrodis*, *Hirsutella thompsonii*) (Boucias a kol. 1988, Boucias, Pendland 1991, Wraight a kol. 1990, Vestergaard a kol. 1999). Jiné druhy entomopatogenních hub (např. *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Metarhizium anisopliae*) produkují suché, silně hydrofobní konidie s rozmanitě strukturovaným povrchem. Primární adheze takovýchto konidií je zajištěna přímou interakcí mezi dvěma hydrofobními povrchy, prostřednictvím elektrostatických sil, případně i molekulární interakcí mezi látkami, které jsou přítomny na povrchu konidií a kutikuly hostitele (např. hemaglutiny, N-acetylglucosamin, glykoproteiny, steroly, polární lipidy aj.) (Boucias a kol. 1988, Sosa-Gomez a kol. 1997, Altre a kol. 1999, Vestergaard a kol. 1999, Malsam a kol. 2002). Interakce mezi konidií, povrchem těla vhodného hostitele a následný vývoj patogena znázorňuje schéma modelového interakčního systému – parazitická část vývojového cyklu entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae*

(Hajek, St Leger 1994).

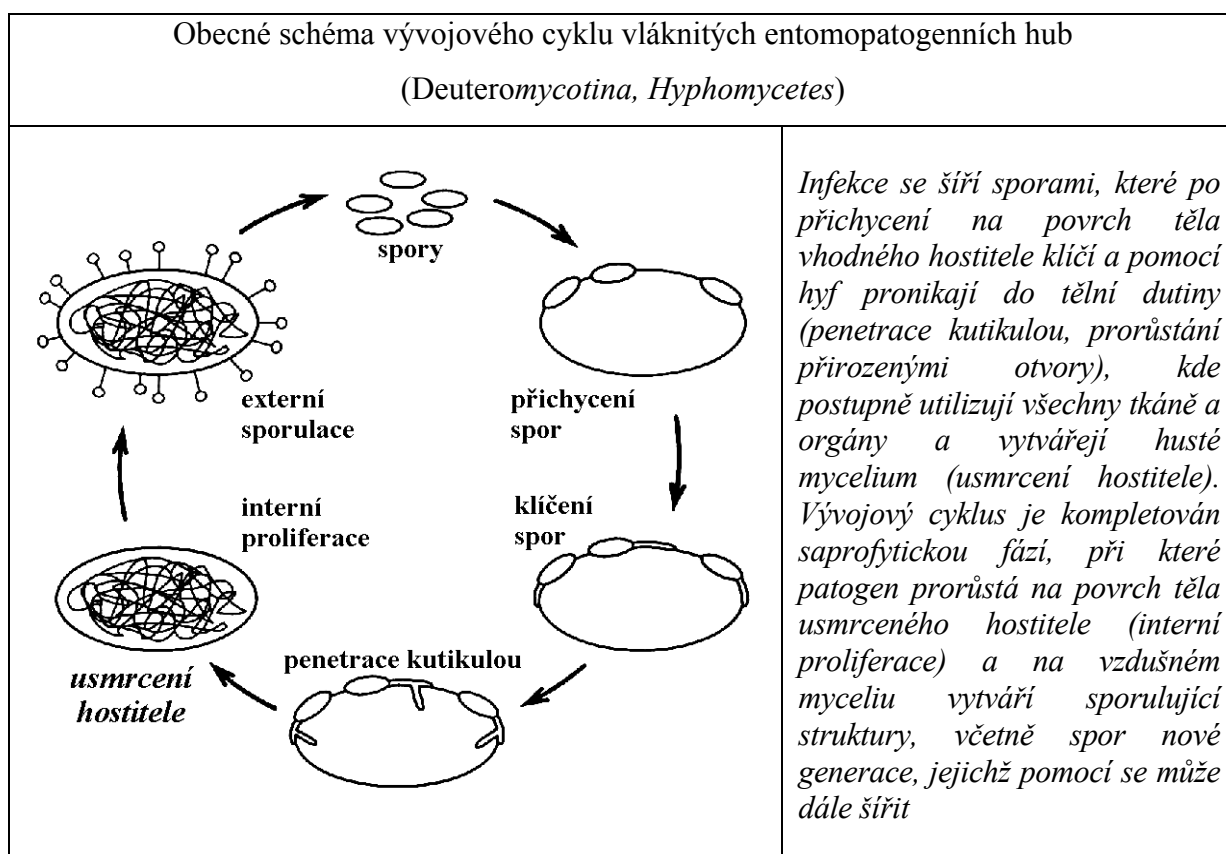


Klíčící konidie může na konci klíčku vytvářet penetrační struktury (např. zduřelá špička klíčku, apresorium nebo extracelulární pouzdro). Z těchto struktur se dále formuje penetrační hyfa, která proniká do těla hostitele. I v případě, že dojde ke klíčení konidie, nemusí být houba (kmen houby) schopna proniknout přes kutikulu hmyzu. Na procesu penetrace se podílí řada faktorů. V nemalé míře se na penetraci podílejí faktory prostředí a přítomnost inhibičních látek, jako jsou mastné kyseliny nebo melaniny, které jsou obsaženy v hmyzí kutikule. Při penetraci uplatňuje patogen kombinaci biochemických (enzymy) a fyzikálně mechanických (tlak penetrující hyfy) mechanismů. Mezi enzymy podílejícími se na penetraci patří endoproteázy, esterázy, lipázy, chitinázy a chitobiázy, přičemž nejvýznamnější roli hrají exoproteázy (Sosa-Goméz a kol. 1997, Butt a kol. 1998, Gillespie a kol. 2000). Na povrchu těla navázané a naklíčené konidie penetrují kutikulu hyfami buď přímo nebo se nejdříve rozrůstají všemi směry po povrchu těla hostitele (Vilcinskas, Götz 1999). Hyfy prorůstají do těla hostitele přirozenými otvory, mezitělními segmenty, nebo aktivní penetrací konidiálního klíčku do těla hostitele (Osborne, Landa 1992).

Po proniknutí invazní hyfy do těla hostitele patogen zpravidla rychle kolonizuje tělní dutinu, kde vytváří buď jedno nebo vícebuněčná hyfová tělíska (blastospory), která postrádají buněčnou stěnu, nicméně jsou pokryty tenkou fibrilózní vrstvou na plazmatické membráně. Předtím, než se patogen rozroste v hemocelu, musí překonat imunitní obranné mechanismy hmyzu. Imunitní obranné mechanismy překonává patogen produkcí toxinů, reaguje prostřednictvím humorálních (např. fenoloxidázy, lektiny, obranné proteiny a peptidy) nebo

buněčných (např. fagocytóza, buněčná i humorální enkapsulace) obranných mechanismů. Usmrčení hostitele patogenem je způsobeno kombinací několika dějů, včetně potravní deficiencí hostitele, invazí patogena do tělních tkání hostitele a jejich destrukcí (Inglis a kol. 2001).

Smrtí hostitele dochází k ukončení parazitické fáze patogena a začíná fáze saprotrofní. Za vhodných podmínek dochází bezprostředně po usmrčení hostitele k prorůstání houby na povrch těla usmrčeného hostitele (tzv. proliferace) a na vzdušném myceliu se vytvářejí fruktifikační orgány charakteristické pro daný druh. Saprotrofní fáze patogena končí úplnou sporulací. K šíření patogena dochází pomocí konidií šířených nejčastěji pasivně (voda, proudění vzduchu) nebo přímým kontaktem zdravých jedinců s jedinci infikovanými (Osborne, Landa 1992)



2.4.4. Faktory ovlivňující účinnost entomopatogenních hub

Infekce hmyzu způsobené entomopatogenními houbami jsou podmíněny faktory biotickými (fyziologické podmínky hostitele a patogena, hostitelská rostlina) a faktory abiotickými (teplota, relativní vzdušná vlhkost, sluneční záření) (Gindin a kol. 2000). Významné rozdíly byly zaznamenány nejen mezi jednotlivými druhy entomopatogenních

hub, ale i mezi jejich jednotlivými kmeny. V rámci jednoho druhu entomopatogenní houby existuje široké spektrum kmenů, které jsou různě tolerantní k odlišným podmínkám prostředí, mohou se vyznačovat různou rychlostí klíčení, vitalitou, patogenitou i schopností růstu a sporulace na povrchu mrtvého hostitele, včetně odlišné virulence vůči jednotlivým druhům hostitelů. Na základě těchto charakteristik jsou porovnávány a následně vybírány kmeny vhodné pro výrobu biopreparátů určených pro praktickou biologickou ochranu rostlin (Butt, Goettel 2000)

Biotické faktory ovlivňující účinnost entomopatogenních hub

Patogen

Patogenita je schopnost patogena vyvolat onemocnění v hmyzí populaci a jako taková je závislá na mnoha různých faktorech jako je fyziologie daného hostitele (např. obranné mechanismy), fyziologie entomopatogenní houby (např. produkce enzymů a sekundárních metabolitů) a na podmínkách vnějšího prostředí. Houby, oproti ostatním entomopatogenním mikroorganismům, mají zpravidla poměrně široké spektrum hostitelů (McCoy 1988; Inglis a kol. 2001). Hostitelské spektrum entomopatogenních hub se významně liší v závislosti na druhu houby. Například houba *Aschersonia aleyrodis* infikuje pouze zástupce z čeledi Aleyrodidae a *Nomuraea rileyi* téměř výhradně infikuje housenky motýlů čeledi Noctuidae. Naproti tomu druhy patřící do rodů *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*, *Paecilomyces* a *Tolypocladium* jsou zpravidla široce polyfágní a mohou parazitovat na zástupcích patřících do různých řádů hmyzu.

S širokou polyfágií je často spojena tvorba druhově identických, nicméně značně různorodých kmenů (izolátů), které mohou vykazovat i úzkou hostitelskou specializaci, která je dána jejich virulencí (McCoy a kol. 1988). Pro úspěšnou kontrolu hmyzí populace je nezbytný výběr vhodného kmene, který je schopný penetrovat a infikovat jedince. Důležitost vybraného kmene spočívá zejména: 1) v snadné kultivaci a vysoké a rychlé sporulaci na umělé živné půdě, 2) ve vysoké virulenci vybraného kmene proti cílovému škůdci, 3) ve schopnosti kmene odolávat podmínkám prostředí, ve kterém se cílový škůdce nachází (Meekes a kol. 2002; Gindin a kol. 2000). U mnoha kmenů entomopatogenních hub může při jejich opětovné kultivaci na umělých živných půdách nebo při dlouhodobějším skladování docházet ke snižování virulence k cílovému škůdci nebo v horším případě může dojít až k úplné ztrátě této vlastnosti (Brownbridge a kol. 2001; Goettel 1992).

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. *Beauveria bassiana* (Inglis a kol. 2001), *L. lecanii* (Hall 1980), *P. farinosus* (Hayden a kol. 1992), zatímco jiné kmeny hub mohou virulenci úplně ztratit již po několika málo kultivacích na umělé živné půdě (Butt 2002). Nagaich (1973) uvádí, že kmen houby *Lecanicillium lecanii* virulentní k mšicím ztratil svou virulenci již po druhé pasáži přes umělou živnou půdu. Za účelem zachování nebo navýšení virulence použitého kmene je proto často zdůrazňována nutnost udržovat virulenci kmenů pasážováním přes přirozeného hmyzího hostitele (Hirte a kol. 1989). Souhrn faktorů ovlivňujících vznik onemocnění indukovaného entomopatogenní houbou specifikoval pomocí následujícího schématu (Butt 2002).

Hostitel

Mezi významné fyziologické a morfologické faktory, které ovlivňují rozvoj onemocnění způsobených entomopatogenními houbami v populaci hmyzích hostitelů, patří populační hustota, chování a bionomie hostitele, vývojové stádium, dostupnost potravy, genetický základ, možné mechanické či chemické poranění nebo poranění způsobené parazity nebo predátory. Jeden z nejdůležitějších aspektů průběhu houbového onemocnění představuje stres. Stresovaný organismus je více náchylný k onemocnění vyvolanému jedním nebo více faktory (přemnožení populace, nedostatek potravy, vystavení chemickým stresorům, nepříznivé podmínky prostředí nebo ztráta imunity)(Inglis a kol. 2001).

Vývojové stádium hmyzu představuje významný prvek predeterminace průběhu houbového onemocnění. Ne všechna vývojová stadia hmyzu mohou být infikována entomopatogenními houbami. V mnoha případech jsou juvenilní stadia hmyzu (larvy, nymfy) více náchylná k infekci než dospělci (Butt, Goettel 2000; Inglis a kol. 2001). Například, mladé larvy *Ostrinia nubilalis* jsou více náchylné k infekci vyvolané houbou *Beauveria bassiana*, než je tomu u larev starších (Feng a kol.1985). Vyšší instary nymf molice skleníkové *Trialeurodes vaporariorum* jsou méně náchylné k infekci vyvolané houbou *A. aleyrodinis* než larvy mladší a dospělci jsou tímto druhem houby infikováni jen zřídkakdy (Osborne, Landa 1992). Na druhou stranu, imága třásněnky *Fankliniella occidentalis* vykázali vyšší náchylnost k infekci způsobené houbou *Lecanicillium lecanii*, než tomu bylo u nymfálních stádií (Vestergaard a kol. 1995). *Entomophthoraceae* infikují často starší imága, která jsou po vykladení oslabená, a tím jsou méně odolná oproti mladším jedincům (Weiser 1966).

Hustota populace hmyzu je obzvláště důležitá na počátku a v průběhu epizootie choroby, neboť zvyšuje pravděpodobnost kontaktu jedinců zdravých s jedinci infikovanými (Steinhaus 1958). Navíc, při vyšší populační hustotě dochází uvnitř populace škůdce k vytvoření specifického mikroklimatu (teplota a RH%) a možnému urychlení vývoje patogena (Gindin a kol. 2000).

Hostitelská rostlina

Mnohé vlastnosti (produkce chemických látek, růst, morfologie) hostitelských rostlin mohou mít přímý nebo nepřímý vliv na přežívání propagulí entomopatogenních hub a jejich účinnost (Elliot a kol. 2000). Rostliny produkují široké spektrum chemických látek, které v závislosti na jejich charakteru, koncentraci a biologické aktivitě mohou ovlivnit životnost konidií nebo náchylnost škůdců entomopatogenním houbám (Vega a kol. 1997; Butt 2002). Experimentálně bylo prokázáno, že nymfy 3. instaru molice *T. vaporariorum* jsou vysoce náchylné k infekci vyvolané houbami *B. bassiana* a *P. fumosoroseus* na okurkách, zatímco stejné stádium na listech rajčat bylo k infekci náchylné podstatně méně. Pravděpodobný důvod spočívá v obsahu tomatinu v listech rajčete. Bylo prokázáno, že tomatin vykazuje antimikrobiální (včetně antifugálních) účinky (Poprawski a kol. 2000). Poprawski, Jones (2001) zjistili, že molice (*Bemisia argentifolii*) chované na rostlinách bavlníku vykazovaly menší náchylnost vůči infekci houbou *B. bassiana* a *P. fumosoroseus* než molice chované na listech melounu. Pravděpodobnou příčinou je skutečnost, že rostliny bavlníku produkují látku gossypol, u které byly prokázány inhibiční účinky na růst hub.

Abiotické faktory ovlivňující vývoj a účinnost entomopatogenních hub

Abiotické faktory mají velmi významný vliv na účinnost entomopatogenních hub, a tím i na průběh infekce v populacích škůdců. V pořadí klesající relevance se nejvýrazněji uplatňují vlhkost a teplota, menší význam mají ostatní faktory prostředí (složení a proudění vzduchu, světlo a fotoperioda). Faktory prostředí ovlivňují zejména šíření konidií, klíčení konidií, penetraci invazní hyfy kutikulou a sporulaci patogena na mrtvém hostiteli (Drummond a kol. 1987; Tanada, Kaya 1993; Inglis a kol. 2001).

Teplota

Teplota prostředí představuje důležitý faktor, který působí nejen samostatně, ale současně určuje i nasycení vzduchu vodními parami (Weiser 1966). Optimální teplota pro řadu entomopatogenních hub se pohybuje v rozmezí od 20°C do 25°C, nicméně infekce a

následná nákaza se může vyskytovat v rozmezí 15°C až 30°C. Při teplotách nad 30°C běžně dochází k inhibici růstu mycelia a růst je obvykle zastaven při teplotách vyšších než 37°C. Teplotní tolerance může být ovlivněna existencí genotypů, které mohou vykazovat i kmenově specifickou teplotní valenci, predeterminovanou geografickou oblastí původu kmene. To znamená, že kmen který byl odizolován v tropické nebo subtropické oblasti může být k vyšším teplotám tolerantnější, na rozdíl od kmene získaného z chladnějších oblastí, který se naopak může lépe a rychleji vyvíjet i při nízkých teplotách (Fargues a kol. 1997a; Inglis a kol. 2001). Vidal a kol. (1997a) se zabývali vlivem teploty na rychlost růstu a účinnost různých izolátů houby *P. fumosoroseus* proti molici *B. argentifolii*. Použité kmeny byly získány z různých hmyzích hostitelů v odlišných geografických oblastech (jih USA, Evropa, Pákistán, Nepál a Indie). Teplotní rozmezí pro izoláty získané z oblastí jihu USA (vlhké i suché subtropické oblasti) a z oblasti západní Asie (vlhká tropická oblast) bylo široké (8-35°C) s optimálním růstem izolátů při teplotě 25°C, 25-28°C nebo 28°C. Indické kmeny vykazovaly nejvyšší toleranci k vysokým teplotám (32°C a 35°C).

Vlhkost

klíčovým faktorem pro rozvoj nákazy v populaci škůdce je vlhkost, zejména pak relativní vzdušná vlhkost (RH%). Vysoká relativní vzdušná vlhkost je nezbytná pro klíčení, neboť většina konidií entomopatogenních hub klíčí při vlhkosti vyšší než 90% (Hall 1981). V přirozeném prostředí dochází k vytvoření těchto vlhkostních podmínek během dne několikrát, při poklesech a vzestupech teploty, přičemž si každý živý organismus vytváří na povrchu pokožky vrstvičku nasycenou vodními parami (Weiser 1966). Nároky na relativní vzdušnou vlhkost zpravidla výrazně stoupají i v období sporulace. Většina entomopatogenních hub dobře sporuluje při relativní vzdušné vlhkosti nad 95% (Hall 1981). Například, bylo prokázáno, že entomopatogenní houba *B. bassiana* sporulovala na vzdušném myceliu na povrchu těla mumifikovaného hostitele (*Rhodnius prolixus*) až při relativní vzdušné vlhkosti 97% (Fargues, Luz 2000). V případě nevhodných podmínek vytváří většina entomopatogenních hub uvnitř těla infikovaného hostitele pouze hyfy (resp. mycelium) a saprotrofní fázi vývoje houba kompletizuje až za vhodných podmínek (Gottwald, Tedders 1982; Drummond a kol. 1987). Desintegrace infikovaného jedince může probíhat i za méně příznivých vlhkostních poměrů. V důsledku produkce chitinolytických enzymů může docházet k desintegraci kutikuly (Milner a kol. 1997) a za příznivých podmínek pak mycelium snáze prorůstá z tělní dutiny na povrch mrtvého hostitele a při dostatečné vlhkosti

tvorí typické morfologické struktury související se sporulací (konidiofor, fialida ... apod.) (Arthurs, Thomas 2001).

Podmínky ovlivňující sporulaci jsou klíčovými faktory, které ovlivňují šíření hub. Sekundární infekce je limitována dostatečně vysokou vlhkostí prostředí (Arhurs, Thomas 2001). Nižší vlhkost je vyhovující především ve fázi šíření konidií, zejména pak u těch druhů hub, které produkují konidie s hydrofobním povrchem bez mucilagenního pokryvu (Hall 1981; McCoy 1981; Gtottwald, Teders 1982). Studium podmínek nezbytných pro sporulaci umožňuje pochopení dynamiky průběhu houbové epizootie a také optimalizaci podmínek prostředí tak, aby byl umožněn rozvoj sekundární infekce po aplikaci mykoinsekticidů (Arhurs, Thomas 2001).

Vliv vlhkosti na vývoj entomopatogenních hub lze v omezené míře cíleně ovlivňovat. Přidání olejových substancí do suspenze konidií napomáhá překlenout kritické období klíčení konidií entomopatogenních hub. Olej nejen umožňuje lepší přilnavost konidií na povrchu hostitele, ale vytváří i vhodné vlhkostní podmínky pro klíčení. Olej pravděpodobně snižuje nezbytnost vysoké vzdušné vlhkosti, která je normálně potřebná pro vyvolání infekce (Butt 2002). Zároveň zabraňuje rychlému odumírání konidií a také je chrání proti UV záření (Prior a kol. 1988; David-Henriet a kol. 1998; Malsam a kol. 2002).

Sluneční záření

Konidie všech entomopatogenních hub mohou být poškozeny vlivem slunečního záření, zejména pak podílem ultrafialových paprsků UVB spektra (285-320 μ m) a UVA spektra (320-400 μ m). Viditelné a infračervené záření je méně škodlivé než UV záření (Fargues a kol. 1997b). Významné rozdíly v citlivosti k záření byly zaznamenány i mezi jednotlivými druhy entomopatogenních hub. Konidie *M. flavoviridae* byly k umělému záření odolnější než konidie hub *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *P. fumosoroseus* (Fargues a kol.1993).

Půda

Půda představuje extrémně složité prostředí, ve kterém se vůči entomopatogenním houbám prosazuje řada faktorů. K nejvýznamnějším faktorům podmiňujícím výskyt a působení entomopatogenních hub patří půdní typ (textura půdy, obsah organické hmoty, pH), vlhkost (vodní kapacita) a půdní mikroflóra (Inglis a kol. 2001). Tyto faktory mohou ovlivňovat životnost, perzistenci i účinnost hub, které jsou využívány v biologické ochraně rostlin jako regulující mikrobiologická agens (Studdert, Kaya 1990). Pro aplikace entomopatogenních hub do půdy jsou záměrně vyvíjeny různé formulační formy (WP, WDG,

lyofilizované mycelium, myceliální granule) a používají se i rozmanité formy aplikace (postřik, injektáž, moření, introdukce granulí a pelet). Půda představuje pro mnoho druhů entomopatogenních hub zcela přirozené prostředí a v různých typech půd lze zaznamenat přítomnost a přirozený výskyt mnoha druhů hub, zejména *B. bassiana*, *M. anisopliae* a *P. farinosus* (Landa a kol. 2002). Konidie hub přetrvávají v půdě mírného klimatu déle než blastosporý (Butt 2002). Mnoho entomopatogenních hub je schopno v půdě snášet rozdílné teploty i podmínky vysoké vlhkosti a sucha (Inglis a kol. 2001). Mnoho studií prokázalo, že konidie aplikované na povrch půdy nebo konidie zapravené do půdy vykazují značnou stálost v podmínkách mírného klimatu (Storey a kol. 1989). V půdě mohou houby přežívat na částech organické hmoty i jako saprotrofové (Tanada, Kaya 1993).

2.5. Charakteristika nejvýznamnějších rodů a druhů entomopatogenních hub

V *Deuteromycotina* je zastoupena převážná část rodů/druhů entomopatogenních hub, které mají praktický nebo potenciální význam v biologické ochraně rostlin. S ohledem na praktické využití jsou jednoznačně nejvýznamnější skupinou *deuteromycet* druhy patřící do třídy *Hyphomycetes*, řádu *Moniliales*. Nákazy vyvolané těmito houbami se obecně nazývají „muskadriny“. Druhou nejvýznamnější skupinu entomopatogenních hub tvoří druhy patřící do řádu *Entomophthorales* (*Zygomycotina*, *Zygomycetes*). V porovnání s předchozí skupinou však jde převážně o obligátní patogeny hmyzu a jejich praktické využití naráží na problém umělých kultur (Landa 1994).

Rod *Aschersonia* Weber

Houby rodu *Aschersonia* představují anamorfní stádia, jehož perfektní teleomorfní stádia patří do rodu *Hypocrella* (*Ascomycotina*, *Sphaeriales*). V rámci rodu *Aschersonia* je evidováno přes 50 druhů hub úzce specializovaných na červce a molice. Přirozený výskyt těchto hub je vázán na subtropické a tropické oblasti. V souvislosti s úzkou specializací jsou v rámci rodu *Aschersonia* odlišovány rody, které parazitují výhradně na červcích (skupina *Lecaniicolae*) a druhy parazitující výhradně na molicích (skupina *Aleyrodicolae*) (Procenko 1967, Fransen 1990). Do skupiny *Aleyrodicolae* patří kromě nejrozšířenějšího druhu *A. aleyrodis* i druhy *A. flava*, *A. goldiana*, *A. flavocitrina*, *A. placenta*, *A. viridans* a další. Z hlediska potenciálního využití v biologické ochraně proti molicím je jednoznačně nejvýznamnějším a nejstudovanějším druhem houby *A. aleyrodis*, která je běžnou součástí entomopatogenní mykoflóry v agroekosystémech citrusových sadů (Fransen 1990). Poprvé byla zjištěna a popsána na počátku století po izolaci z molice citrusové (*Dialeurodes citri*)

v průběhu přirozené epizootie v citrusových sadech na Floridě (Fawcett 1908, Pech 1921). Kromě molice citrusové byla následně zjištěna i na dalších druzích molic, z nichž mezi nejznámější patří *T. vaporariorum*, *T. abutiloneus*, *B. tabaci*, *B. giffardi*, *D. citrifolii*, *Aleurocanthus woglumi* a *Tetraleurodes acaciae* (Farsen 1990). Pyknostry *A. aleyrodis* jsou jednobuněčné, fusiformní, vřetenovitého tvaru, se zřetelnými inkluzemi v protoplasmě (3 – 5 inkluzních kapek uvnitř vyzrálých pyknostry) a jsou produkovány fialidami ve formě mucilagenní masy. Fialidy jsou uloženy v pyknidách, které se formují v hustém myceliálním stromatu na povrchu usmrceného hostitele (Samson, Rombach 1985). Běžnou součástí mucilagenní masy pyknostry je β – karoten, který způsobuje nejen typické zbarvení samotné masy pyknostry, ale je i příčinou načervenalého zbarvení infikovaných larev (Landa a kol. 1989). Význam β – karotenu v mucilagenní masě pyknostry není dosud uspokojivě vysvětlen. Pravděpodobná úloha β – karotenu je v ochraně pyknostry proti negativním účinkům slunečního záření (Osborne, Landa 1992).

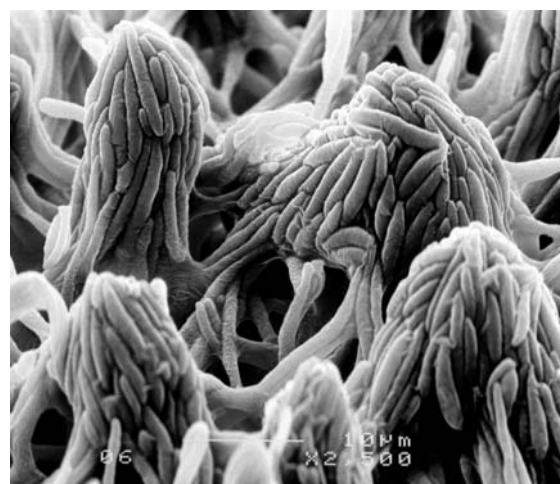
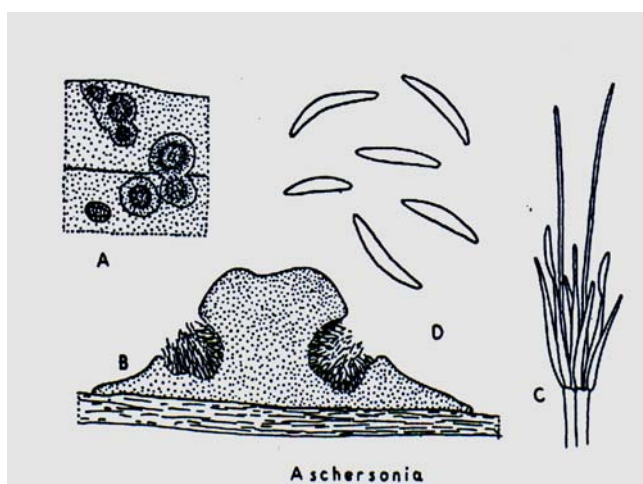


Schéma vývojového cyklu *A. aleyrodis* na larvě molice (A, B) a tvorba a tvar pyknostry (C, D) (Procenko 1967)

Masa pyknostry *A. aleyrodis* na povrchu infikované larvy molice skleníkové (SEM, archiv KRV ZF JU)

Rod *Beauveria* Vuillemin

Nejvýznamnější zástupci rodu *Beauveria* jsou *B. bassiana* (Bals.) Vuil., *B. brongniartii* (Bals.) Vuil. a *B. tenella* (Bals.) Vuil. (Landa 1998). *B. bassiana* je široce polyfágní entomopatogenní houba, která je typickým představitelem entomopatogenní mykoflory půdy (Weiser 1966). Parazituje na půdním hmyzu, resp. na stádiích hmyzu, která se vyskytují v půdě (např. při přezimování) (Landa 1998). Její výskyt na škůdcích kolonizujících výhradně nadzemní části rostlin je velmi řídký (Weiser 1966). V sortimentu

hostitelů jsou zastoupeni zástupci z řádu rovnokřídlí (např. krtonožky), brouci (např. larvy a kukly chroustů a chroustků, mandelinky bramborové, lalokonosců a mnoho dalších druhů), larvy a kukly motýlů, dvoukřídlého a stejnokřídlého hmyzu (Landa 1998).

Průběh infekce je v podstatě stejný jako u ostatních entomopatogenních hub. Za optimální teplotu pro růst a vývoj bylo stanoveno teplotní rozmezí 23 – 26°C při relativní vzdušné vlhkosti nebo vlhkosti substrátu 80 – 100%. Minimální teplota pro růst mycelia je 5-8°C, maximální teplota pro růst mycelia je 28 – 31°C (Dirlbeková 1991). Nepříznivé období přetrvává houba ve formě spor na chráněných místech (v půdě) nebo v infikovaném hmyzu (Schwarz a kol. 1996).

Na umělých živných půdách i na přirozeném substrátu vytváří mycelium mléčně bílé barvy. Konidie jsou globoidního až subgloboidního tvaru o velikosti 2,0 – 3,0 x 2,0 – 2,5µm. Konidiogenní struktury tvoří husté hroznovité shluky (Dirlbeková 1991).

Ve střední Evropě jsou komerčně produkovány tři preparáty a bázi hub rodu *Beauveria*. Na bázi *B. bassiana* je to český přípravek BOVEROL. Ve Švýcarsku je produkován přípravek na bázi *B. brongniartii*, kmene Bb 96, používaný proti larvám chroustů. V rakousku byly z půd s hojným výskytem ponrav chroustů izolovány kmeny IMBST 95.031 a 95.041 používané v preparátu MELOCONT PILZGESTE také proti ponravám chroustů (Rod a kol. 2005). BOVEROL se dodává ve formě suchého prášku obsahující vzdušné konidie. Tento prášek se před aplikací v menším množství vody rozetře v husou kaši, poté se doplní vodou na předepsaný objem postřikové kapaliny a aplikuje se postřikem. Podmínkou dobré účinnosti je, aby hmyz s konidiami na povrchu byl delší dobu v prostředí s velmi vysokou vlhkostí (Rod a kol. 2005). Přípravky ENGERLINGSPILZ a MELOCONT-PILZGERSTE jsou formulovány jako obilná zrna porostlá myceliem houby. Tyto přípravky se při aplikaci zapraví do půdy (secím strojem, rotavátorem), kde dojde ke styku s houbou a tím k infekci hmyzu (např. ponravy chroustů).

Podmínkou dobré účinnosti je dostatečná vlhkost půdy po dobu několika týdnů po aplikaci (Rod a kol. 2005).

Rod *Metarhizium* Sorokin

M. anisopliae (Metsch.) Sorok., *M. flavoviridae* W. Gams & Rozsypal reprezentují široce polyfágní houby, které jsou převážně vázány na půdní hmyz (rovnokřídlí, brouci a dvoukřídlí) (Landa 1998). Vedle *Beauverie* je *M. anisopliae* druhým nejrozšířenějším entomopatogenním druhem napadajícím až 200 druhů hmyzu (Veen a kol. 1968). Nákazy vyvolané *M. anisopliae* jsou označovány jako „zelené muskardiny“, protože infikovaný

jedinec porůstá hustou, tmavě zelenou masou konidií (Hrdý a kol. 1991).

Tyto houby se běžně vyskytují v půdách oblasti mírného pásma, subtropů a tropů. Podobně jako *B. bassiana* jsou běžnou složkou půd na území ČR, kde působí jako přirození regulátoři v populacích půdního hmyzu (Landa 1998). *M. anisopliae* je houba ekologicky vázaná na vlhké, teplé prostředí, proto je nejčastěji u zemních stádií hmyzu (Weiser 1966). Její teplotní optimum leží při 20 až 25 °C. Termofilita *M. anisopliae* je nesporná ve srovnání s *B. bassiana* a *P. farinosus*. Při 10°C potřebuje *M. anisopliae* téměř dvojnásobek času na zahájení sporulace než *B. bassiana* (Vänninen a kol. 1995).

Nákaza u hmyzu probíhá 4 – 6 dní, podle velikosti a druhu hmyzu a infekční dávky. Hyfy prorůstají pokožkou ven a na povrchu tvoří bílé až narůžovělé mycelium. Radiálně vyrůstají z povlaku hyf krátké konidiofory těsně přimknuté k sobě do nápadnějších svazečků. Z nich se vyvíjejí konidie. Jsou tyčinkovité, 3,5 µm široké a 6,5 až 7,2 µm dlouhé, jsou v řetězcích přimknuty k sobě, takže na povrchu hostitele tvoří nápadné špalíčky. Jsou zelenošedé až olivově zelené (Weiser 1966).

Velkokapacitní kultivace na pevných substrátech je možná na otrubách, řepných řízcích, na mlátu i na pilinách impregnovaných sladinou. Materiál se sterilizuje v plechových krabicích a rozprostírá se v předem fumigací vysterilizovaných komorách na sterilní plechové lísky (Weiser 1966).

Biopreparáty na bázi *Metarhizium anisopliae* jsou velkoplošně aplikovány zejména v zemích Jižní Ameriky (Brazílie, Argentina, Kolumbie) (Landa 1998). Markova (1987) uvádí přípravek na bázi *M. anisopliae* METARHIZIN jako preparát využívaný v bývalém SSSR. Hrdý a kol. (1991) se zmiňuje o použití *M. anisopliae* jako mykoinsektiidu ve Francii v dávce 1 – 2 kg/ha proti ponravám, plošticím a broukům.

Rod *Paecilomyces* Bainier

P. fumosoroseus (Wize) A. H. S Brown & G. Sm., *P. farinosus* (Holm ex Gray) A. H. S Brown & G. SM., *P. lilacinus* (Thom) Samson reprezentují široce polyfágní entomofágní, akarifágní a nematofágní druhy hub, které iniciují nákazy na zástupcích z mnoha řádů hmyzu (*Orthoptera*, *Thysanoptera*, *Homoptera*, *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Diptera*), fytofágních roztočích (např. sviluškovití – *Tetranychidae*) a některých druzích háďátek (cystotvorná háďátka z rodu *Globodera*, *Heterodera*) (Landa 1998).

Houba *P. fumosoroseus* (dále PFR) vykazuje nejen status entomopatogenní a akarifágní houby, ale za určitých okolností vykazuje i status mykoparazita. Patogen se jako

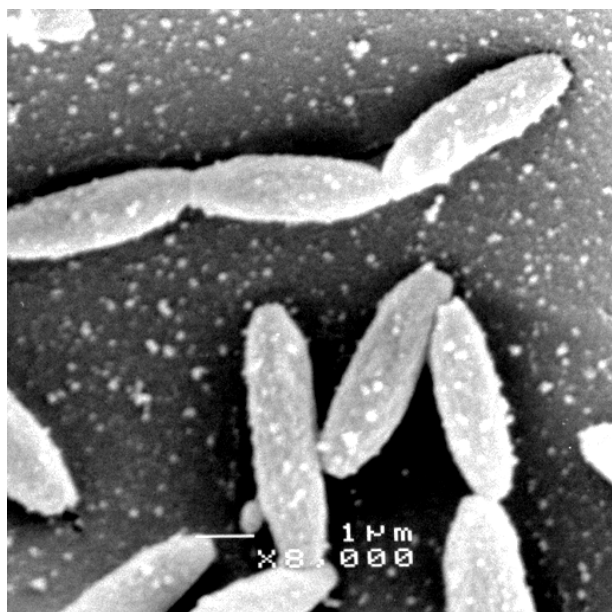
ektoparazit může vyvíjet na rzích a na různých druzích padlí, např. na konidiích padlí okurkového (Landa 1998).

Na přirozeném hostiteli i na umělých živných půdách vytváří PFR zprvu bílé vatovité kolonie, které později mění barvu do odstínů narůžovělé, nařafialové až šedofialové barvy. Změna barvy kolonií přímo koreluje 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. V jednom řetízku konidií přichyceném na konidiogenní phialidě může být přítomno i více než 50 konidií (Landa 1994).

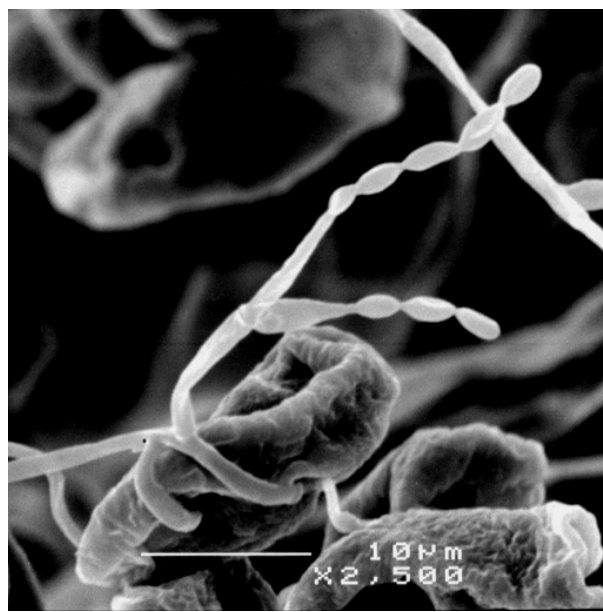
Tento druh je již využíván v praktické ochraně rostlin. Americká firma ThermoTrilogy Corporation vyrábí a distribuuje biopreparát PFR 97WDG – AOPKA, který je pod obchodním názvem PREFERAL distribuován také belgickou firmou Biobest v Evropě. Tento preparát je používán v ochraně rychlené zeleniny a okrasných květin proti širokému sortimentu škůdců (mšice, molice, červci, třásněnky a další). V ČR je pokusně používán v ochraně jehličnanů proti kůrovcům z rodu *Ips* (např. *I. typographus*) a v ochraně brambor proti mandelince bramborové (Landa 1998).

Rovněž houba *P. farinosus* je často izolována z určitých stádií hmyzu žijícího v lesní půdě, kde jsou pro rozvoj mykóz zvláště příznivé abiotické podmínky (Prenerová 1991).

P. farinosus se u nás používá v přípravných aplikacích proti vajíčkům a housenkám pilatek, ale má poměrně široký záběr na nejrůznější škůdce, pokud jsou v prostředí dosti vlhkém, aby se houby mohla na povrchu škůdce uchytit (Hrdý a kol. 1991).



Spory houby *Paecilomyces fumosoroseus*



Sporulující *P. fumosoroseus* – spory v řetízcích se formují na koncích lahvicovitých konidiofor (foto archiv KRV ZF JU)

Rod *Lecanicillium* (= *Verticillium*) Zare & W. Gams

L. lecanii (Zimm.) Viegas. představuje široce polyfágní entomopatogenní druh patogena, který je používán v biologické ochraně proti drobným savým škůdcům (například třásněnkám, mšicím a molicím škodícím na rychlené zelenině a okrasných květinách pěstovaných ve sklenicích) (Landa 1998). V přirozených podmínkách, se můžeme s *V. lecanii* setkat kromě řádu *Homoptera* i u jiných druhů patřících do řádu *Coleoptera*, *Hymenoptera*, *Heteroptera*, *Lepidoptera* a *Diptera* (Landa 1983). Kromě parazitické asociace s uvedenými skupinami členovců bylo zjištěno, že se *V. lecanii* vyskytuje i jako ektoparazit na některých druzích fytopatogenních hub. Příkladem je výskyt na uredosporách různých druhů rzí (např. *Uromyces dianthi*, *U. appendiculatus*, *Puccinia graminis* aj.) (Landa 1994)

Zdrojem infekce je půda, ze které jsou konidie houby roznášeny půdním hmyzem a roztoči. V koloniích mšic a molic se nákaza po prvním přenesení šíří při vzájemném kontaktu jedinců tvořících kolonie, nebo se konidie šíří větrem a vodou (Landa 1983).

Hlavním determinačním znakem *V. lecanii* je typická forma sporulace. V průběhu konidiogeneze se na vzdušném myceliu vytvářejí dlouhé lavicovité konidiofory na jejichž koncích se postupně tvoří elipsoidní konidie o rozměrech 3,5 - 5,0 μm a 1,0 - 1,5 μm . Konidiofory jsou na myceliu umístěny v přeslenech a z jedné zóny protilehlé vyrůstají 2, 3 až 4 konidiofory. Na koncích hyf může být přeslen tvořen i více konidiofory. Konidiospory jsou vytvářeny z postupně se tvořícího shluku, který má podobu kuličky. V závěrečné fázi sporulace se kuličky pokrývají mucilagenní hmotou, která udržuje kompaktní tvar finálního útvaru (Landa 1983).

Ze základní charakteristiky vztahů *V. lecanii* k abiotickým faktorům je zřejmé, že využití tohoto agens v praktické ochraně rostlin je těmito faktory predeterminováno pouze pro teplé a vlhké mikroklima skleníků (Landa 1994).

V sortimentu dostupných biopreparátů mají již tradiční místo biopreparáty firmy Koppert (Nizozemí), které jsou známy pod obchodními názvy MYCOTAL (určen k ochraně skleníkových plodin proti molici skleníkové a molici bavlníkové), VERTALEC (kmen vysoce virulentní na různé druhy mšic) a TRIPTAL (kmen *V. lecanii* s vysokou účinností na hmyz třásnokřídly, např. třásněnka zahradní *Thrips tabaci* a třásněnka západní *Frankliniella occidentalis*) (Landa 1998).

Rod *Hirsutella* Patouillard

je demonstrativně zastoupen druhem *H. thompsonii*. Tato houba je příkladem tzv. akarifágní houby, která může vyvolávat primární nákazy v populacích některých druhů fytofágních roztočů, včetně svilušky chmelové *Tetranychus urticae* a vlnovníka *Phyllocoptruta oleivora*. Některé druhy patřící do rodu *Hirsutella* patří i mezi houby nematofágní, parazitující zejména na v půdě se vyskytujících sedentérních háďátcích (cystotvorná a hálkotvorná háďátka) (Landa 1998)

Na trhu v USA byl k dispozici biopreparát (MYCAR), který byl využíván v ochraně ovocných dřevin včetně citrusů proti některým druhům fytofágních roztočů (Landa 1998)

Rod *Nomuraea*

Tento rod sestává pouze ze dvou druhů : *N. rileyi* a *N. atypicola*. *N. rileyi* představuje poměrně úzce specializovaný druh patogena, který je svou parazitickou verzí vývoje vázán na larvy mnoha druhů motýlů. V USA byl vyvinut biopreparát na bázi *N. rileyi*, který v současnosti prochází registračním procesem a je určen pro ochranu kukuřice (zavíječ kukuřičný), brukvovité zeleniny (bělásek zelný, mūra zelná a další), lesních dřevin (bekyně) a pro ochranu řady dalších hostitelských rostlin (Landa 1998).

2.6. Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub

Účinnou složkou většiny biopreparátů na bázi entomopatogenních hub tvoří spory nebo blastospory. Spory jsou produkovány v „*in vitro*“ systémech kultivací na povrchu pevných nebo tekutých živných půd, případně na přirozených substrátech (Grajek 1994, Wright, Carruthers 1999). Tenkostěnné blastospory jsou produkovány pomocí fermentačních biotechnologií (submerzní kultivace v tekutém živném médiu) (Goettel, Roberst 1991, Wright, Carruthers 1999).

Z hlediska kvantitativního je největší množství biopreparátů na bázi spor entomopatogenních hub produkováno pomocí *in vitro* produkčních systémů využívajících různé přirozené pevné substráty, nejčastěji semena různých druhů rostlin (rýže, proso, kukuřice, pšenice, ječmen a další) (Vyas, Yadav, Patel 1991). Příkladem jsou velko i nízkoobjemové produkce hub *Beauveria bassiana* a *Metarhizium anisopliae* v Číně a zemích Jižní Ameriky (Brazílie, Venezuela) (Charnley 1989, Wright, Carruthers 1999). Tyto technologie jsou zpravidla dvoufázové. V první fázi je vyprodukováno čisté, koncentrované inokulum, kterým je ve druhé fázi ošetřen sterilní nebo semisterilní substrát. Produkt je k jednoduché finalizaci připraven po 2 – 3 týdnech kultivace a formulaci tvoří různě upravený

(např. mletý) komplex „patogen - substrát“ (Feng, Poprawski, Khachatourians 1994, Grimm 2001). Tyto technologie produkce vláknitých hub jsou v současnosti upřednostňovány i proto, že jsou často koncipovány na bázi záměrného využívání obnovitelných přirozených zdrojů, případně i odpadních organických produktů (Dangar a kol. 1991, Rani, Susamma-Mathai 1999, Gopalakrishnan, Anusuya, Narayanan 1999).

Takto konstruované biopreparáty jsou zpravidla dostatečně funkční a finančně dostupné, nicméně bývají zpravidla nestandardní v klíčových kvalitativních a kvantitativních parametrech a jejich registrace ve vyspělých zemích je vzhledem k vysokým nárokům registračních procesů prakticky nemožná (Domsch, Gams, Anderson 1980, Butt a kol. 1999).

Podstatně standardnější biopreparáty lze získat pomocí povrchových kultivačních technologií (Ibrahim, Low 1993), z nichž k nejpropracovanějším a nejrozšířenějším patří tzv. „pytlová metoda“ (u nás známá také jako „Kybalova metoda“), při které jsou masy spor entomopatogenních hub produkovány v aerobním prostředí na myceliu porůstajícím povrch sterilního tekutého živného média, které je uzavřeno ve sterilních PVC pytlích. Kompletní biomasa (mycelium a spory) je po usušení finalizována mletím a smísením s inertním nosičem (siloxid, jemně mletá křemelina) do ve vodě suspendovatelných prášků. Touto metodou byl i v ČR produkován doposud jediný tržně dostupný biopreparát houby *B.bassiana* mající obchodní název BOVEROL (Šimšáková a kol. 1981, Weiser 1991).

Některé druhy entomopatogenních hub je možno produkovat jako submerzní kultury. Submerzní kultivace entomopatogenních hub lze v principu považovat za technologické analogie přirozených procesů vývoje entomopatogenních hub na hmyzích hostitelých, kdy v klíčové parazitické části vývojového cyklu patogena proniká do tělní dutiny hostitele a v semi-aerobních podmínkách v tekutém prostředí (hemolymfa) vytváří zvláštní tenkostěnné, jednobuněčné, tvarově i velikostí poměrně nestabilní útvary nazývané blastospory (Charnley 1984, Humber 1997). Fermentační technologie umožňují produkovat velké množství uniformní biomasy tvořené převážně blastosporymi, s příměsí myceliálních částic a fragmentů (Lopez a kol.2000). Submerzní kultury se poměrně snadno finalizují a formují do standardní formy biopreparátů. Vývoj biotechnologií orientovaných do oblasti velkokapacitních submerzních kultivací vláknitých hub lze bez nadsázky považovat za nejvýznamnější fenomén vývoje standardních mykoinsekticidů a mykofungicidů. Většina v současnosti komerčně dostupných preparátů na bázi hub je konstruována na bázi blastospor, resp. biomasy získané pomocí submerzních kultivací (Wright, Carruthers 1999).

Standardní biopreparáty na bázi entomopatogenních hub musí splňovat řadu kvalitativních a kvantitativních kritérií a obdobně jako syntetické pesticidy podléhají

kompletnímu registračnímu procesu (Neale, Newton 1999, Jenkins, Grzywacz 2000). Mezi klíčové parametry kvalitativní povahy patří garance druhu a patogena, specifikace podílu aktivní a doplňkové složky v biopreparátu a maximální přípustná kontaminace (zastoupení cizorodých biotických příměsí, např. bakterií, v 1g/ml přípravku). Mezi hlavní kvantitativní a kvalitativní parametry houbových preparátů patří (Menn, Hall 1999, English a kol. 2001):

- *počet infekčních jednotek* – garantovaný minimální počet konidií, resp. blastospor, zpravidla se pohybuje v rozmezí od $1,0 \times 10^8$ – $1,0 \times 10^{10}$ konidií v 1 g / ml biopreparátu
- *klíčivost konidií* – garantovaná vitalita konidií nebo blastospor udávaná v %
- *počet jednotek tvořících konidie* (CFU – colony forming units) – specifický údaj kvalitativní povahy, udávající z kolika jednotek patogena přítomných v 1 g / ml biopreparátu se při kultivaci na umělé živné půdě vytvoří samostatná kolonie

Zvláštní skupinu houbových biopreparátů představují přípravky jejichž aktivní složku tvoří buď neinfekční formy biomasy hub (mycelium) nebo infekční jednotky imobilizované v organických nebo anorganických nosičích. Tyto formule byly cíleně vyvinuty pro účely půdních aplikací proti původcům onemocnění a škůdcům vyskytujícím se v půdě. V podstatě jsou známy dvě základní (a v principu značně podobné) verze těchto formulací:

- *biopreparáty na bázi myceliových granulí* – patogen je finalizován do formy sušených myceliových fragmentů, které po aplikaci do půdy jímají vodu a postupně regenerují do standardní formy mycelia, na kterém se tvoří konidie, které mohou infikovat hmyzího hostitele (Andersch a kol. 1990)
- *biopreparáty na bázi alginátových pelet* – smíšená biomasa (mycelium, blastospor, konidie) patogena je spolu s nutritivní složkou imobilizována do drobných pelet, které po aplikaci do půdy jímají vodu, imobilizovaná houba regeneruje a s využitím živin, které jsou součástí pelety realizuje kompletní saprofytický cyklus, jehož výsledkem je tvorba nové generace konidií (Pereira, Roberts 1991, Eyal a kol. 1994)

Příklady biopreparátů na bázi vláknitých entomopatogenních hub registrovaných pro potřeby biologické ochrany proti živočišným škůdcům (upraveno podle Wright, Carruthers 1999).

Druh patogenní houby	Obchodní název	Výrobce	Země registrace
<i>Beauveria bassiana</i>	Naturalis-L TM	Troy Biosciences	USA, státy EU
	Naturalis-H&G TM	Troy Biosciences	
	Naturalis-T&O TM	Troy Biosciences	
	Ostrinil TM	Natural Plant Protect.	

	Mycotrol™	Mycotech	
	Mycotrol-O	Mycotech	
	Botanigard22WP™	Mycotech	
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Bio-Blast™	EcoScience	USA
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	PFR 97™20%WDG	Certis	USA, státy EU
	PreFeRal	Biobest NV	Japonsko
<i>Paecilomyces Lilacinus</i>	Paecil	Technol. Innovation Corporation	Austrálie
	Bioact		
<i>Lecanicillium lecanii</i>	Vertalec™	Koppert B. V.	USA, státy EU
	Mycotal™		

3. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Tato diplomová práce byla zaměřena na studium vlivu podmínek submerzní kultivace vybraných druhů entomopatogenních hub v tekutém živném médiu s důrazem na optimalizaci klíčových prvků procesu tohoto způsobu produkce uniformní biomasy mitosporických hub – blastospor. Experimentální část práce byla koncipována s ohledem na následující okruhy problémů:

1. Vlivu složení živné půdy na produkci blastospor
2. Porovnání schopnosti různých druhů a kmenů entomopatogenních hub produkovat blastospor v submerzní kultuře.
3. Vliv podmínek submerzní kultivace na produkci a výtěžnost blastospor
4. Ověřit možnost produkce uniformní biomasy blastospor v rozsahu použitelném pro velkoplošné aplikace

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Kmeny entomopatogenních hub používané v pokusech

Beauveria bassiana

V pokusech byly použity dva kmeny houby *Beauveria bassiana* – Bba PM a kmen Bba 01. Kmen Bba PM byl odizolován v průběhu monitoringu výskytu hub v ČR v roce 2004, z půdy odebrané z porostu ozimé pšenice, v obci Pěňčín (Morava). Kmen Bba 01 byl odizolován z červců ve výzkumné stanici MFREC (Mid – Florida Research and Education Center) na Floridě (USA). Je to velmi spirálující plošná kultura na živné půdě PDA (Potato Dextrose Agar).

Lecanicillium lecanii

V pokusech byly použity kmeny – I9 a LLE 06. Kmen I9 byl odizolován z dospělců lýkožrouta smrkového (*Ips typhographus*) odchytených feromonovými lapači v oblasti NP a CHKO Šumava. Kmen LLE 06 byl izolován ze silné epizoozie červců (*Coccus hesperidum*) na ibišcích, rostoucích volně v areálu výzkumné stanice Floridské univerzity v Gainesville, Florida (Mid Florida Research & Educational Centre, Apopka, Florida). Tento kmen silně spiráluje na živné půdě PDA. Tvoří krátké konidiofory a husté mycelium béžové barvy.

Metarhizium anisopliae

V pokusech bylo použit kmen *Metarhizium anisopliae* M 192, který byl odchyten v průběhu monitoringu přirozeného výskytu entomopatogenních hub v půdách v regionu Jižní Čechy. Tento kmen byl izolován z půdního vzorku odebraného na pozemku s pšenicí ozimou na lokalitě v okolí Tábora. Kmen byl odizolován pomocí metody „živých pastí“ – expozice půdního vzorku larvám zavíječe voskového *Galleria mellonella*.

Paecilomyces fumosoroseus

Kmen PFR BM, je kmen PFR 97 Apopka (Apopka – jméno oblasti na Floridě, kde byl kmen v roce 1987 izolován, referenční typový kmen je uložen v americké sbírce mikroorganismů pod označením ATCC 20874). Kmen PFR 97 je od roku 1994 využíván jako účinný agens PFR 97TM 20% WDG a biopreparátu, který je zejména v Evropě registrován pod obchodním názvem PreFeRalTM. Oba biopreparáty obsahují 20% submerzní biomasy (blastospory) kmene PFR 97 ($2,0 \times 10^9$ CFU/g⁻¹) a 80% interních přísad. Kmen PFR 97

Apopka použitý v pokusech je kmen, který byl reizolován z epizoocíí vyvolaných roztočem *Polyphagotarsonemus latus* , na rostlinách bazalky, ve sklenících výzkumné stanice MFR&EC.

Základní charakteristiky kmenů hub použitých v pokusech

DRUH	Kód	Oblast	Plodina	Zdroj
<i>Beauveria bassiana</i>	PM	Pěnčín	ozimá pšenice	půda
<i>Beauveria bassiana</i>	Bba 01	Florida	ibišek	červci
<i>Lecanicillium lecanii</i>	I9	Šumava	smrk, kůra	kůrovec
<i>Lecanicillium lecanii</i>	LLE 06	Florida	ibišek	červci
<i>Metarhizium anisopliae</i>	M 192	Jižní Čechy	ozimá pšenice	půdní
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	PFR 97	Florida	bazalka	roztoči

4.2. Kultivační media

Pro porovnání množství vyprodukovaných konidií jednotlivých kmenů byly použity různé druhy živných půd.

Složení živných půd použitých v pokusech

ŽIVNÁ PŮDA	ZKRATKA	SLOŽENÍ
<i>Sabouraud Dextrose Broth</i>	SA	pepton 10g dextrosa 20g
<i>Potato Dextrose Broth</i>	PDB	bramborový extract 200g dextrosa 20g
<i>YM Broth</i>	YM	kvasničný extrakt 3g sladinový extrakt 3g pepton 5g dextrosa 10g
<i>Malt Extract Bbroth Base</i>	MEB	sladinový extrakt 17g pepton 3g
<i>Agar se sladinkovým extraktem</i>	SL	sladinový extrakt

4.3. Obecné metodické aspekty

Příprava konidiové suspenze

Konidiové suspenze byly připravovány pomocí sterilního roztoku 0,05% Tween 80. Konidiová suspenze byla získána přelitím povrchu plně sporulujících kultur sterilním roztokem Tween 80. Koncentrace konidií byla určována pomocí hemacytomu (počítací komůrka) a následně adjustována na požadovaný titr, zpravidla na hodnotu $1,0 \times 10^7$ konidií /1ml nebo $1,0 \times 10^5$ konidií/1ml. Následně byla suspenze nainokulována do jednotlivých živných půd v množství 1ml do 100ml živné půdy.

Stanovení výtěžnosti na umělém živném médiu

Cílem testu je stanovit množství vyprodukovaných konidií při submerzní kultivaci entomopatogenních hub do různých živných médií. Dalšími sledovanými vlivy na výtěžnost konidií jsou : porovnání výtěžnosti při různé rychlosti otáček na orbitální třepače - 150 a 250 otáček za minutu, zjišťování vlivu způsobu třepání – orbitální a lineární pohyb a vliv různých objemů suspenze.

Stanovení výtěžnosti se provádí pomocí hemacytomu (Neubauerova vylepšená komůrka). Výtěžnost byla zjišťována na těchto živných médiích : SA, YM, MEB, PDB a SL.

Stanovení pH

Pro měření pH byl použit pH – metr PH 340 – B/SET 2 s elektrodou SEN TIX 50. Před použitím byl pH meter vždy kalibrován pomocí dvoustupňové kalibrace.

4.4. Charakteristika metodických aspektů hlavních studií projektu

Výtěžnost konidií *B.bassiana* po kultivaci na různých typech půd

V první sérii pokusů byla stanovována výtěžnost *B.bassiana* ze submerzní kultury kmenů Bba 01 a Bba PM původní na tekutých živných půdách SA, YM, MEB, PDB a SL. Tento test byl proveden za účelem zjištění množství konidií vyprodukovaných na různých živných půdách a za účelem porovnání produkce blastospor obou kmenů. Výtěžnost byla vyhodnocována 3., 5. a 7.den kontinuální submerzní kultivace. Při hodnocení byl pomocí hemacytomu stanoven počet blastospor v submerzní kultuře. Výsledkem byl výběr produktivnějšího kmene entomopatogenní houby *Beauveria bassiana*.

Výtěžnost konidií různých kmenů entomopatogenních hub B.bassiana, L. lecanii, M. anisoplyae a P.fumosoroseus při rozdílné agitaci submerzní kultury

Výtěžnost blastospor byla zjišťována u kmenů Bba 01 (*Beauveria bassiana*), M 192 (*Metarhizium anisoplyae*), LLE 06, I9 (*Lecanicillium lecanii*) a PFR BM (*Paecilomyces fumosoroseus*) na tekutých živných půdách SA, YM, MEB, PDB a SL při rychlosti třepání 150 a 250 otáček/minutu na orbitální třepače. Výtěžnost byla stanovena pomocí hemacytomtru stanovením počtu blastospor 3., 5. a 7.den kultivace. Výsledkem bylo zjištění vlivu rychlosti třepání na produkci konidií.

Výtěžnost konidií různých kmenů entomopatogenních hub B. bassiana, L. lecanii a P. fumosoroseus při rozdílném způsobu třepání (orbitální versus lineární)

V pokusech byl sledován vliv typu pohybu (=aerace) submerzní kultury na výtěžnost blastospor vybraných kmenů Bba 01 (*Beauveria bassiana*), I9 (*Lecanicillium lecanii*) a PFR BM (*Paecilomyces fumosoroseus*) na tekutých živných půdách při orbitálním a lineárním pohybu třepačky. Výtěžnost blastospor byla opět stanovována pomocí hemacytomtru 3., 5. a 7.den kultivace. Cílem pokusů bylo stanovit vliv typu třepání na výtěžnost blastospor.

Výtěžnost blastospor B. bassiana po kultivaci v různých objemech tekutých živných půd

Výtěžnost blastospor kmene Bba 01 houby *Beauveria bassiana* byla sledována na půdách MEB, MEB 2x a SL, v suspenzích o objemu 100 ml, 500ml a 1000ml. Půda MEB 2x má dvojnásobný obsah živin než půda MEB v tomtéž množství a zároveň má obdobné množství živin jako půda SL. Tento pokus byl také zaměřen na to, zda je možné půdu SL nahradit půdou MEB 2x aniž by došlo k zásadní změně ve výtěžnosti konidií. Výtěžnost blastospor byla stanovována pomocí hemacytomtru a to 3., 5. a 7.den. Výsledkem také bylo prokázání vlivu objemu suspenze na produkci konidií.

Středněkapacitní produkce entomopatogenních hub pomocí optimalizovaných submerzních kultivací

Vybrané kmeny hub *B. bassiana*, *L. lecanii* a *P. fumosoroseus* byly produkovány pomocí standardního systému submerzní kultivace v tekuté živné půdě PDB, ve 2000 ml erlenmayerových baňkách (=1000 ml živné půdy na 1 kultivační jednotku), kultivace pod dobu 7 dní při 250 otáčkách, amplituda výkyvu 5, v místnosti temperované na 23±2°C. Každý kmen byl produkován ve 3-8 opakováních, celkem bylo vyprodukováno více než 40 litrů submerzních kultur (19,25 litrů submerzních kultur kmenů houby *P. fumosoroseus*, *L. lecanii*

– 6.6 litrů, *B. bassiana* – 15 litrů). Všechny submerzní kultury vyprodukované v těchto pokusech byly použity pro ověřovací pokusy ve sklenících.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

Produkce blastospor entomopatogenních hub v různých typech tekutých půd

5.1. *Beauveria bassiana*

Pokus č. 1: Porovnání výtěžnosti blastospor kmenů Bba 01 a Bba PM entomopatogenní houby *Beauveria bassiana*.

Cílem tohoto testu bylo stanovení produkce blastospor kmenů Bba 01 a Bba PM. na různých typech půd, jejich porovnání a výběr produktivnějšího kmene entomopatogenní houby *Beauveria bassiana*. Výtěžnost byla vyhodnocována 3., 5. a 7. den.

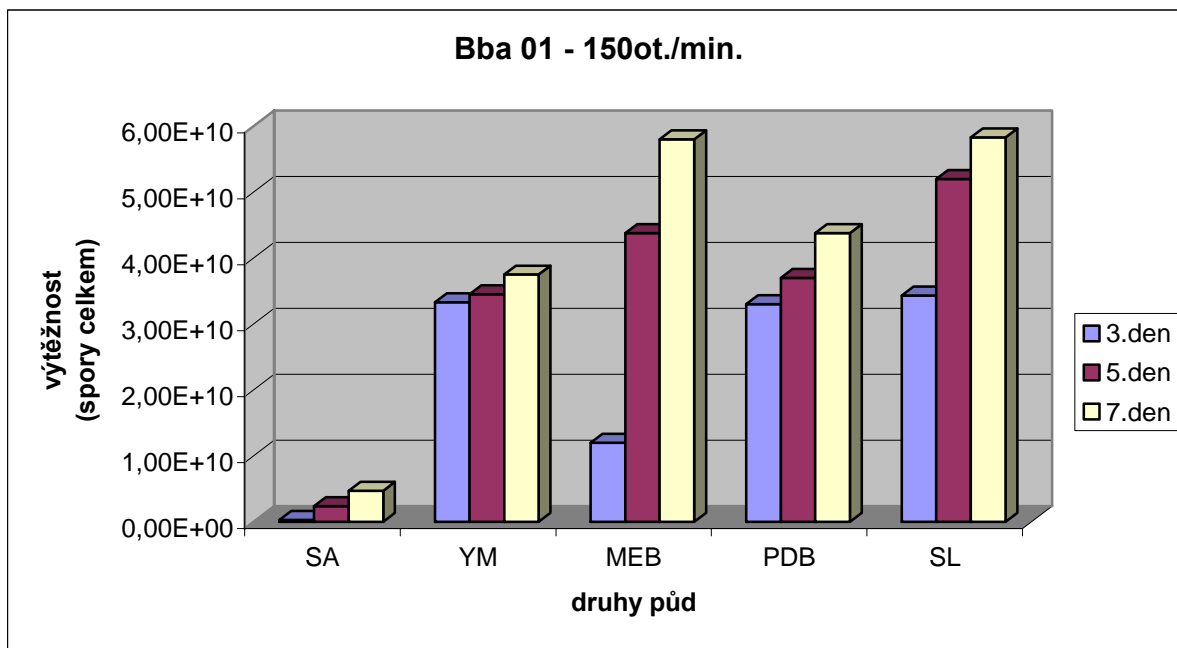
Tabulka č. 1. Porovnání výtěžnosti blastospor *Beauveria bassiana* kmene Bba 01 na různých typech standardních živných půd (150 ot./ min, orbitální pohyb).

Půda	Počet blastospor ve 100 ml živné půdy		
	3.den	5.den	7.den
SA	3,18E+08	2,38E+09	4,73E+09
YM	3,33E+10	3,45E+10	3,75E+10
MEB	1,20E+10	4,38E+10	5,80E+10
PDB	3,30E+10	3,70E+10	4,38E+10
SL	3,43E+10	5,20E+10	5,83E+10

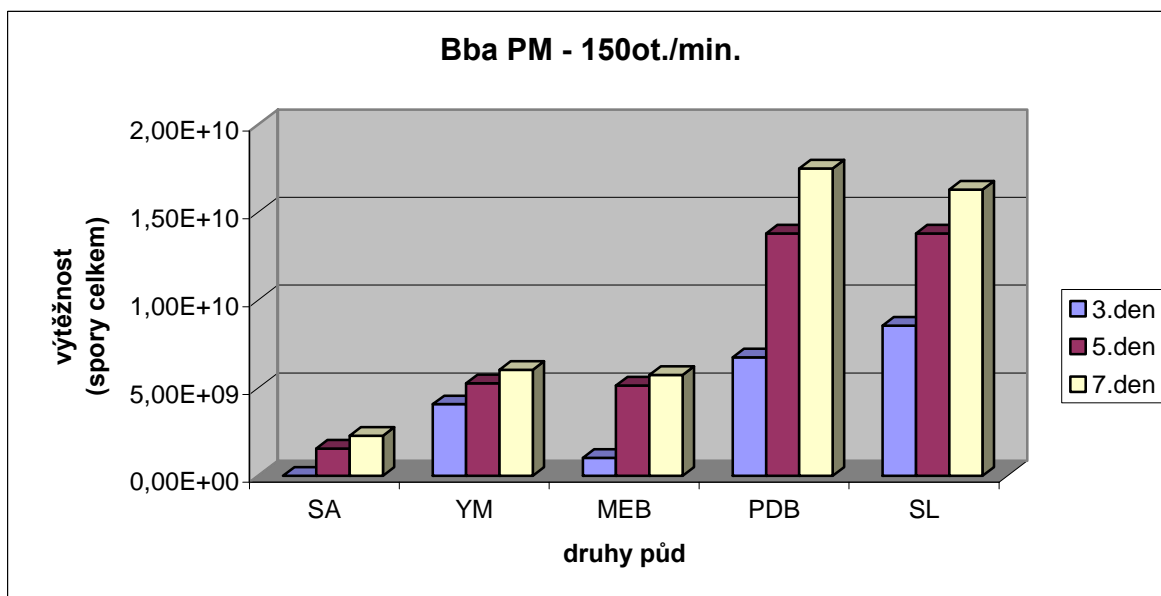
Tabulka č. 2. Porovnání výtěžnosti blastospor *Beauveria bassiana* kmene Bba PM na různých typech standardních živných půd (150 ot./ min, orbitální pohyb).

Půda	Počet blastospor ve 100 ml živné půdy		
	3.den	5.den	7.den
SA	0,00E+00	1,55E+09	2,28E+09
YM	4,08E+09	5,28E+09	6,03E+09
MEB	1,02E+09	5,15E+09	5,75E+09
PDB	6,75E+09	1,38E+10	1,75E+10
SL	8,55E+09	1,38E+10	1,63E+10

Graf č. 1. Porovnání výtěžnosti blastospor *Beauveria bassiana* kmene Bba 01 na různých typech standardních živných půd (150 ot./ min, orbitální pohyb).



Graf č.2. Porovnání výtěžnosti *Beauveria bassiana* kmene Bba PM na různých typech standardních živných půd (150 ot./min, orbitální pohyb).



Zhodnocení pokusu:

U kmene Bba 01 se jako nejlepší živné médium projevila půda SL a MEB .U kmene Bba PM byly jako nejlepší vyhodnoceny půdy SL a PDB. Jako jednoznačnějméně produkční byla živná půda , na které bylo dosaženo nejnižších výtěžností u obou kmenů, byla

vyhodnocena půda SA. Z porovnání schopnosti produkce blastospor je zřejmé, že kmen Bba 01 je více produktivnější než kmen Bba PM, a to na všech typech půd.

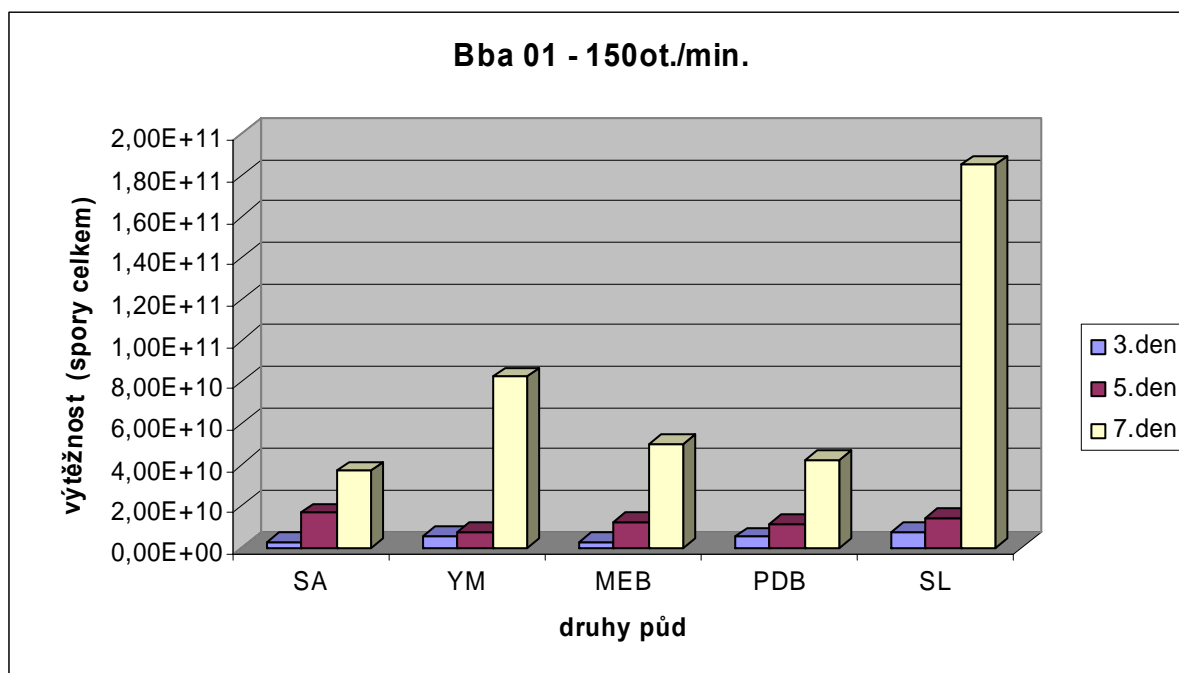
Pokus č. 2: Porovnání výtěžnosti blastospor houby *B. bassiana* kmen Bba01 při rozdílné rychlosti třepání.

Cílem tohoto testu bylo zjištění produkce spor u kmene Bba 01 při rychlosti třepání 150 a 250 otáček / minutu a jejich vzájemné porovnání.

Tabulka č. 3: Výtěžnost blastospor kmene Bba 01 na různých typech půd při rychlosti třepání 150 ot./ min.

Půda	Počet blastospor ve 100 ml živné půdy		
	3.den	5.den	7.den
SA	2,98E+09	1,68E+10	3,70E+10
YM	5,73E+09	7,85E+09	8,25E+10
MEB	2,83E+09	1,26E+10	5,00E+10
PDB	5,18E+09	1,15E+10	4,23E+10
SL	7,73E+09	1,43E+10	1,85E+11

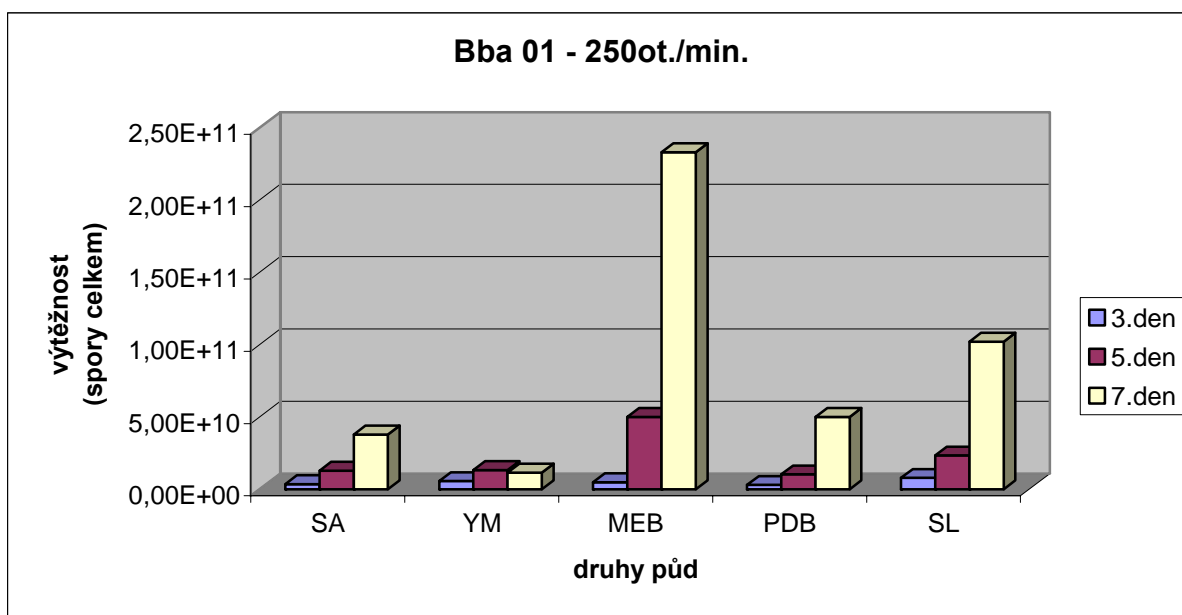
Graf č. 3: Výtěžnost blastospor kmene Bba 01 na různých typech půd při rychlosti třepání 150ot./min.



Tabulka č. 4 : Výtěžnost blastospor kmene Bba 01 na různých typech půd při rychlosti třepání - 250ot./ min.

Půda	Počet blastospor ve 100 ml živné půdy		
	3.den	5.den	7.den
SA	3,55E+09	1,28E+10	3,78E+10
YM	5,63E+09	1,32E+10	1,15E+10
MEB	4,83E+09	5,00E+10	2,33E+11
PDB	2,95E+09	1,03E+10	5,00E+10
SL	7,83E+09	2,33E+10	1,02E+11

Graf č. 4: Výtěžnost blastospor kmene Bba 01 na různých typech půd při rychlosti třepání 250ot./ min.



Zhodnocení pokusu:

Tento pokus prokázal vliv změny rychlosti třepání na výtěžnost. U kmene Bba 01 se při rychlosti třepání 150 otáček/min. ukázala jako nejlepší půda SL a jako nejhorší půda SA, u rychlosti 250 otáček/min. byla ale jako nejlepší vyhodnocena půda MEB, jako nejhorší půda YM.

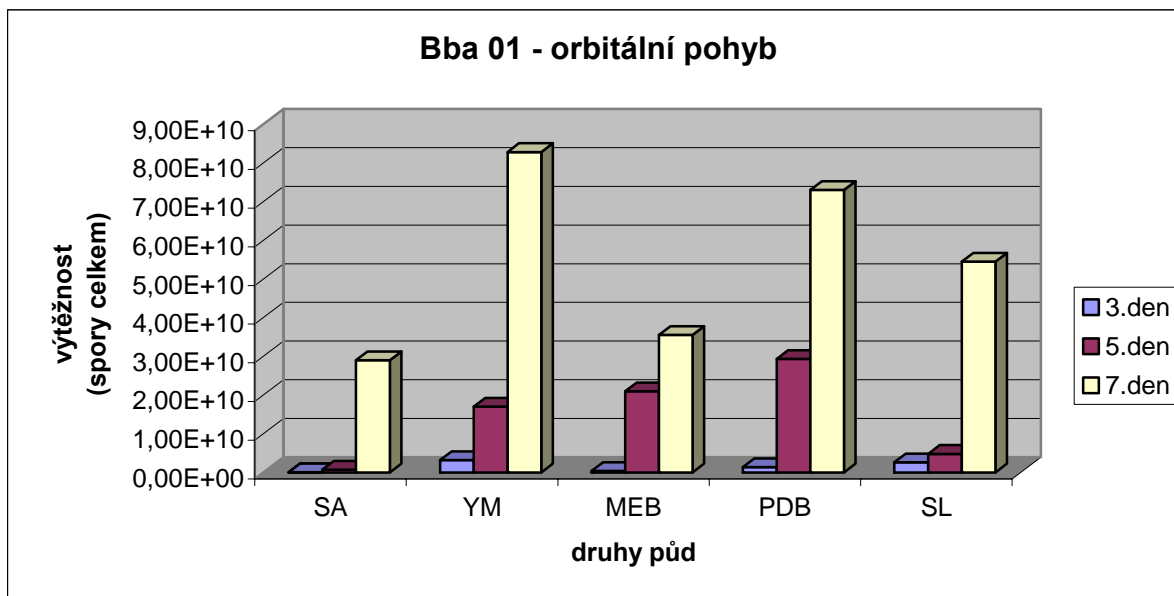
Pokus č. 3: Vliv způsobu třepání na výtěžnost blastospor houby *Beauveria bassiana* kmen Bba 01

Cílem tohoto pokusu bylo zjištění vlivu orbitálního nebo lineárního pohybu třepání na výtěžnost blastospor u kmene Bba 01.

Tabulka č. 5: Výtěžnost blastospor kmene Bba 01 na různých typech půd při orbitálním pohybu třepání

půda	Počet blastospor ve 100 ml živné půdy		
	3.den	5.den	7.den
SA	6,25E+07	7,00E+08	2,90E+10
YM	3,20E+09	1,70E+10	8,28E+10
MEB	3,53E+08	2,10E+10	3,55E+10
PDB	1,38E+09	2,93E+10	7,30E+10
SL	2,60E+09	4,80E+09	5,45E+10

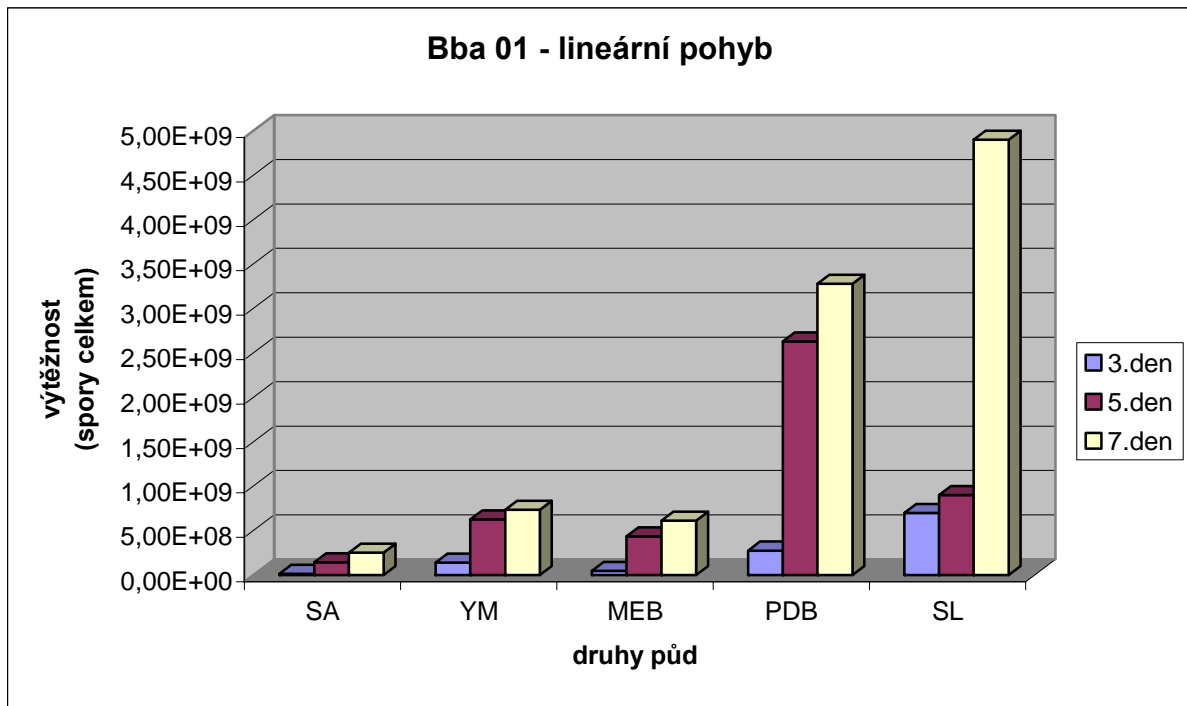
Graf č.5: Výtěžnost blastospor kmene Bba 01 na různých typech půd při orbitálním pohybu třepání



Tabulka č. 6: Výtěžnost kmene Bba 01 na různých typech půd při lineárním pohybu třepání

půda	Počet blastospor ve 100 ml živné půdy		
	3.den	5.den	7.den
SA	1,25E+07	1,43E+08	2,53E+08
YM	1,40E+08	6,25E+08	7,35E+08
MEB	4,50E+07	4,35E+08	6,13E+08
PDB	2,75E+08	2,63E+09	3,28E+09
SL	7,00E+08	9,00E+08	4,90E+09

Graf č.6: Výtěžnost blastospor kmene Bba 01 na různých typech půd při lineárním pohybu třepání



Zhodnocení pokusu:

Nejvyšší výtěžnosti bylo u kmene Bba 01 dosaženo při orbitálním směru třepání na půdě YM a PDB,nejnižší na půdě SA a MEB.Při lineárním směru třepání byla nejvyšší výtěžnost na půdě SL,nejnižší na půdě SA. Prokázalo se tedy, že způsob pohybu třepání značně ovlivňuje výtěžnost a pro každou půdu je daný způsob třepání více či méně vhodný.

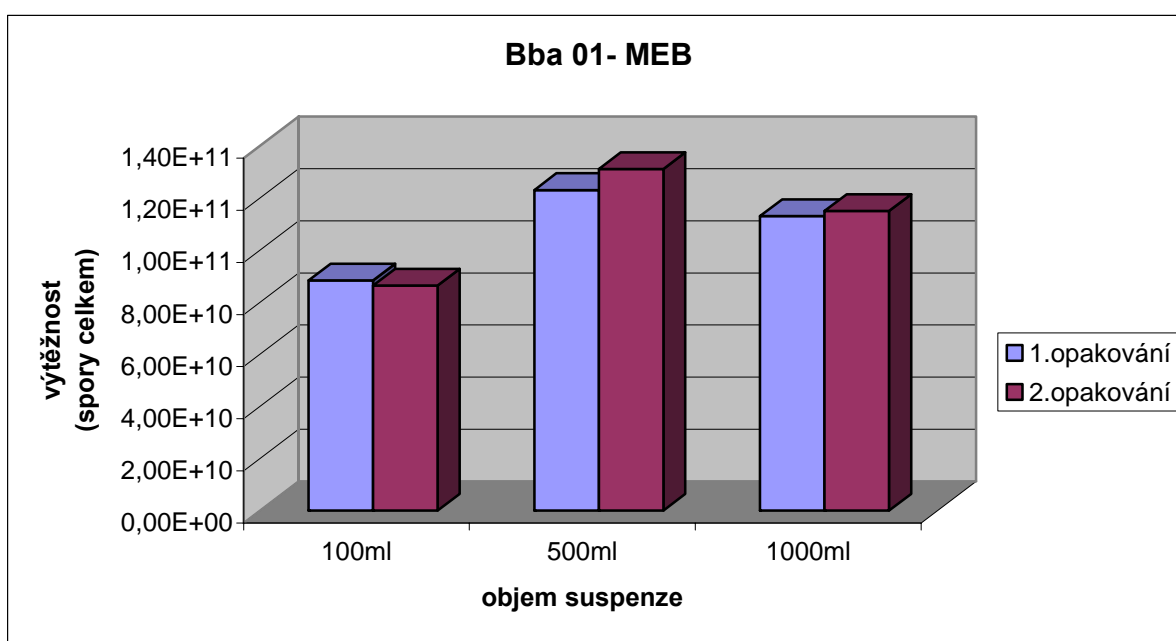
Pokus č. 4: Vliv různých objemů suspenze entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* na výtěžnost blastospor

Cílem tohoto testu bylo zjistit vliv různých objemů na výtěžnost kmene Bba 01 u půd MEB, MEB 2x a SL.Dále porovnání půd MEB 2x a SL a možnost nahrazení půdy SL půdou MEB 2X.Tyto dvě půdy mají obdobný obsah živin.

Tabulka č.7: Výtěžnost blastospor kmene Bba 01 v různých objemech půdy MEB.

Kultivační objem	Počet blastospor ve 100 ml živné půdy	
	1.opakování	2.opakování
100ml	8,83E+10	8,63E+10
500ml	1,23E+11	1,31E+11
1000ml	1,13E+11	1,15E+11

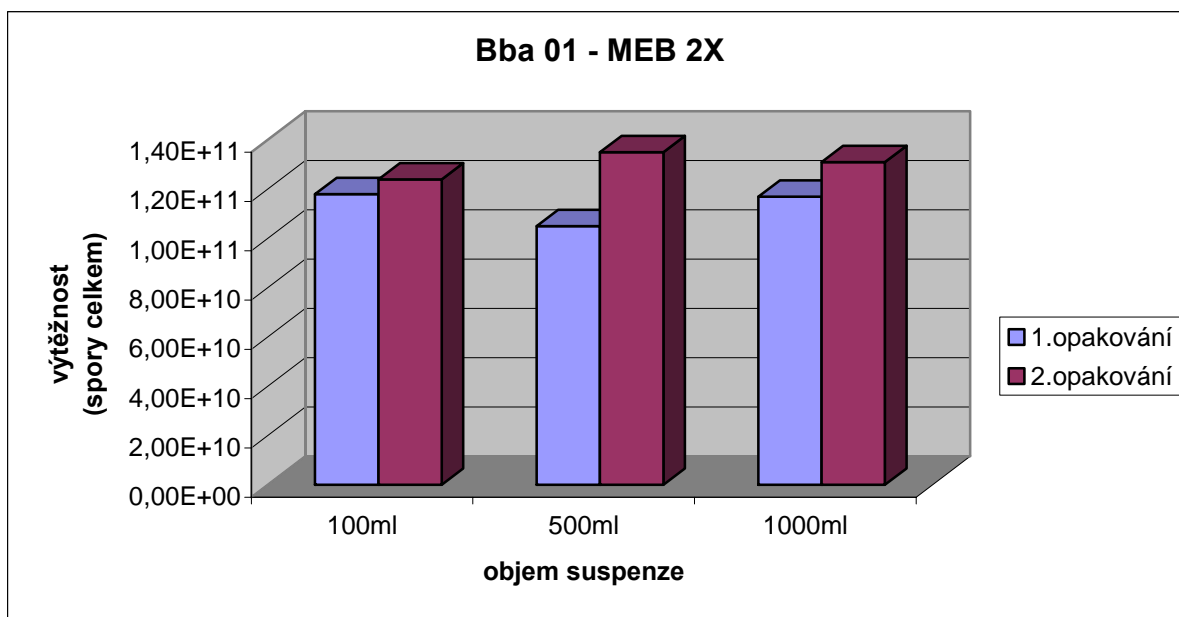
Graf č.7: Výtěžnost blastospor kmene Bba 01 v různých objemech půdy MEB.



Tabulka č. 8: Výtěžnost blastospor kmene Bba 01 v různých objemech půdy MEB2x (dvojnásobná dávka živin půdy MEB).

Kultivační objem	Počet blastospor ve 100 ml živné půdy	
	1.opakování	2.opakování
100ml	1,18E+11	1,24E+11
500ml	1,05E+11	1,35E+11
1000ml	1,17E+11	1,31E+11

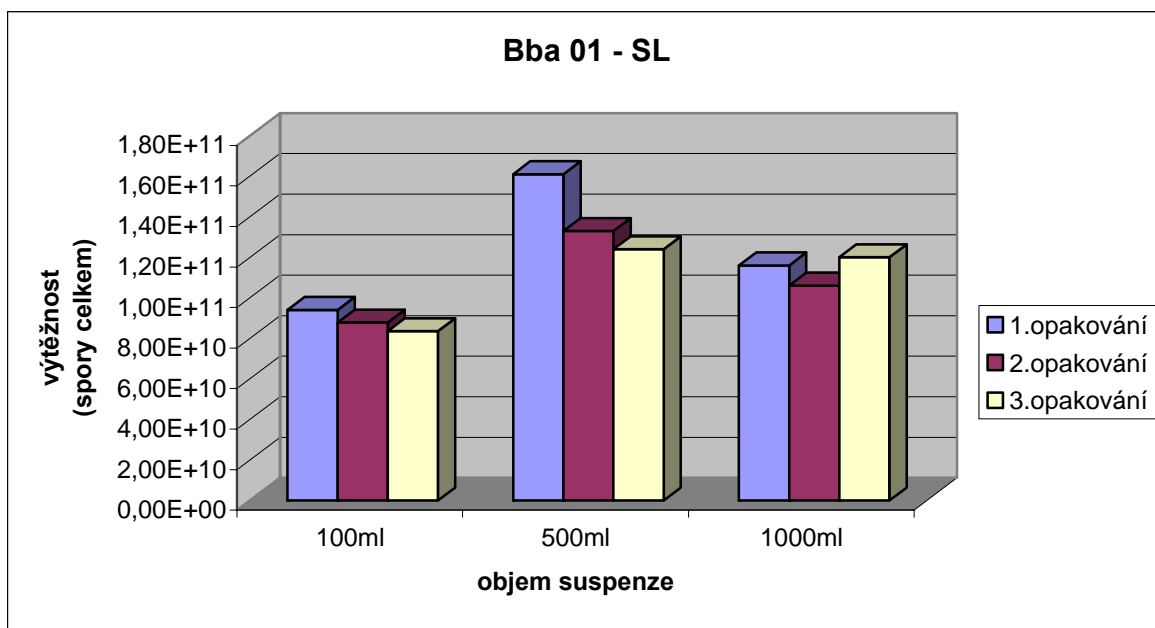
Graf č.8: Výtěžnost kmene Bba 01 v různých objemech půdy MEB 2x



Tabulka č. 9: Výtěžnost blastospor kmene Bba 01 v různých objemech půdy SL.

Kultivační objem	Počet blastospor ve 100 ml živné půdy		
	1.opakování	2.opakování	3.opakování
100ml	9,40E+10	8,78E+10	8,35E+10
500ml	1,61E+11	1,33E+11	1,24E+11
1000ml	1,16E+11	1,06E+11	1,20E+11

Graf č.9: Výtěžnost blastospor kmene Bba 01 v různých objemech půdy SL.



Zhodnocení pokusu:

Tento pokus prokázal vliv objemu suspenze na výtěžnost konidií. Nejvyšší výtěžnost byla dosažena u objemu 500 ml u všech typů půd, nejnižší výtěžnost vykazovali suspenze o objemu 100 ml. Při srovnání půd SL a MEB 2x se neprojevily výrazné rozdíly ve výtěžnosti, proto je možné půdu SL nahradit půdou MEB 2x.

5.2. *Lecanicillium lecanii*

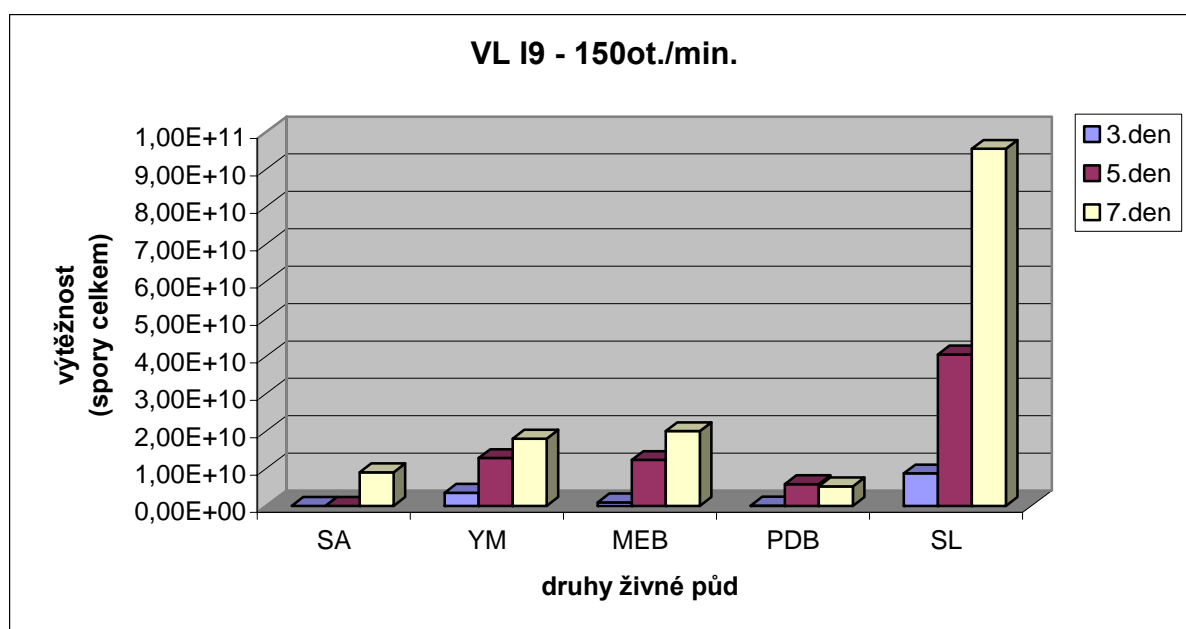
Pokus č. 5: Porovnání výtěžnosti blastospor u kmene I9 v závislosti na rozdílné rychlosti třepání.

Cílem tohoto testu bylo zjištění produkce spor u kmene I9 při rychlosti třepání 150 a 250 otáček / minutu a jejich vzájemné porovnání.

Tabulka č.10 : Výtěžnost blastospor kmene I9 na různých typech půd při rychlosti třepání 150ot./min.

Tekutá živná půda	Počet blastospor ve 100 ml živné půdy		
	3.den	5.den	7.den
SA	0,00E+00	0,00E+00	9,00E+09
YM	3,53E+09	1,28E+10	1,80E+10
MEB	9,60E+08	1,23E+10	2,00E+10
PDB	1,23E+08	5,83E+09	5,25E+09
SL	8,73E+09	4,05E+10	9,55E+10

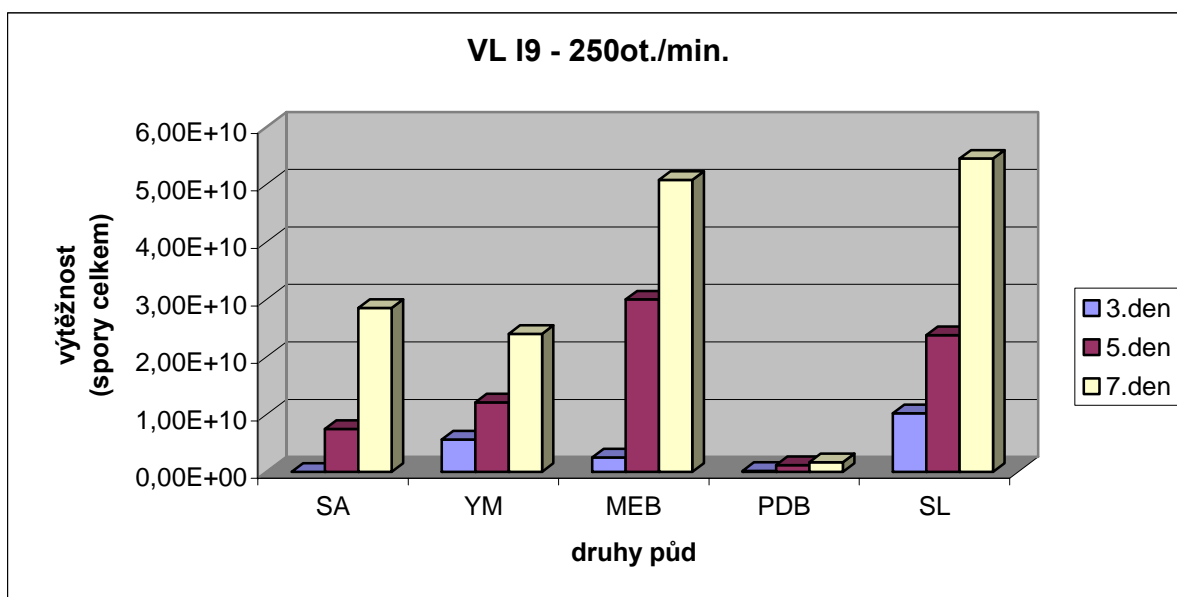
Graf č. 10: Výtěžnost blastospor kmene I9 na různých typech půd při rychlosti třepání 150ot./min.



Tabulka č. 11 : Výtěžnost blastospor kmene I9 na různých typech půd při rychlosti třepání 250ot./min.

Tekutá živná půda	Počet blastospor ve 100 ml živné půdy		
	3.den	5.den	7.den
SA	4,00E+07	7,50E+09	2,85E+10
YM	5,63E+09	1,21E+10	2,40E+10
MEB	2,50E+09	3,00E+10	5,08E+10
PDB	2,00E+08	1,20E+09	1,68E+09
SL	1,02E+10	2,38E+10	5,45E+10

Graf č. 11: Výtěžnost blastospor kmene I9 na různých typech půd při rychlosti třepání 250ot./min.



Zhodnocení pokusu:

Bylo prokázáno, že rozdílná rychlost třepání způsobuje změny ve výtěžnosti konidií kmene I9. Při 150 otáčkách/min. byla vyhodnocena jako nejvhodnější půda SL, ostatní živné půdy dosahovaly mnohem nižší výtěžnosti. Při 250 otáčkách/min. bylo dosaženo vyšší výtěžnosti u většiny půd, jen půda PDB se ukázala jako nevhodná.

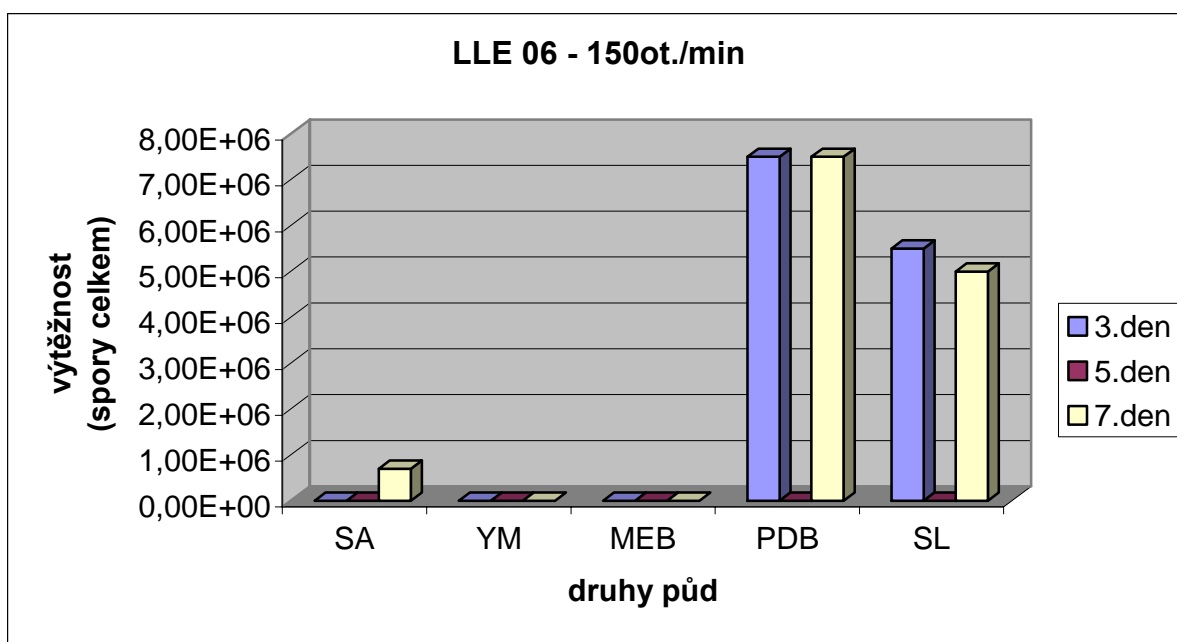
Pokus č. 6: Porovnání výtěžnosti u kmene LLE 06 při rozdílné rychlosti třepání.

Cílem tohoto testu bylo zjištění produkce spor u kmene LLE 06 houby *Lecanicium lecanii* při rychlosti třepání 150 a 250 otáček / minutu.

Tabulka č. 12: Výtěžnost kmene LLE 06 na různých typech půd při rychlosti třepání 150ot./min.

Tekutá živná půda	Počet blastospor ve 100 ml živné půdy		
	3.den	5.den	7.den
SA	0,00E+00	0,00E+00	7,00E+05
YM	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MEB	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
PDB	7,50E+06	0,00E+00	7,50E+06
SL	5,50E+06	0,00E+00	5,00E+06

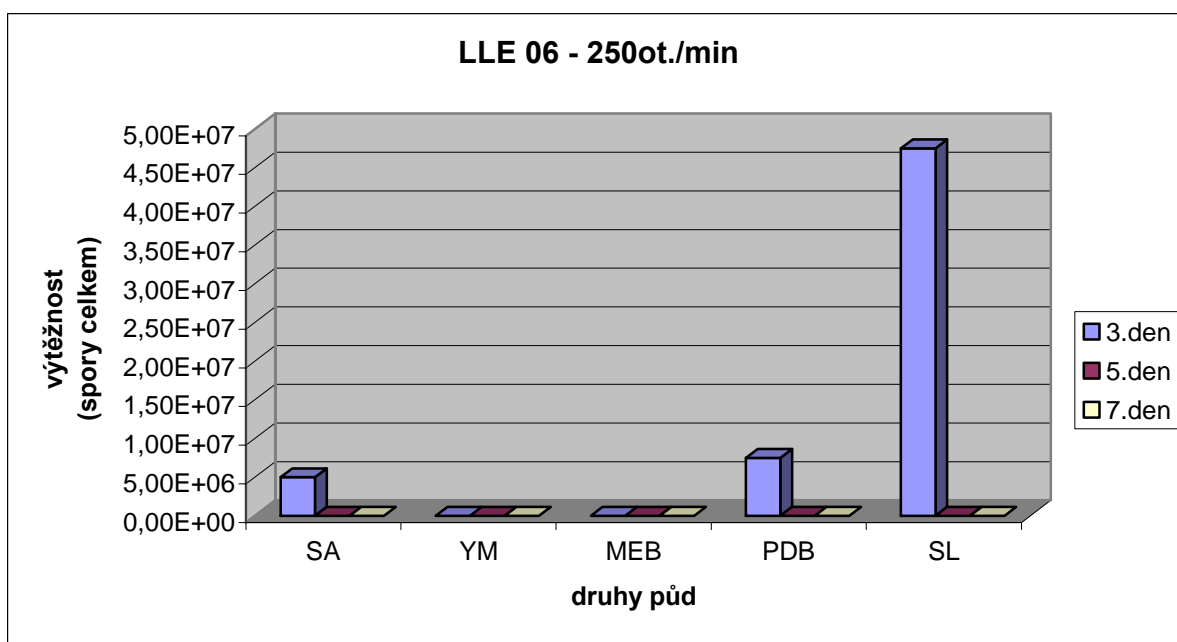
Graf č.12: Výtěžnost kmene LLE 06 na různých typech půd při rychlosti třepání 150ot./min.



Tabulka č. 13: Výtěžnost kmene LLE 06 na různých typech půd při rychlosti třepání 250ot./min.

Tekutá živná půda	Počet blastospor ve 100 ml živné půdy		
	3.den	5.den	7.den
SA	5,00E+06	0,00E+00	0,00E+00
YM	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MEB	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
PDB	7,50E+06	0,00E+00	0,00E+00
SL	4,75E+07	0,00E+00	0,00E+00

Graf č.13: Výtěžnost kmene LLE 06 na různých typech půd při rychlosti třepání 250ot./min.



Zhodnocení pokusu:

U kmene LLE 06 se nepodařilo objektivně zaznamenat nárůst konidií, protože během měření došlo k velkému nárůstu mycelia, většina konidií se neuvolnila a zůstala přirostlá na konidioforech.

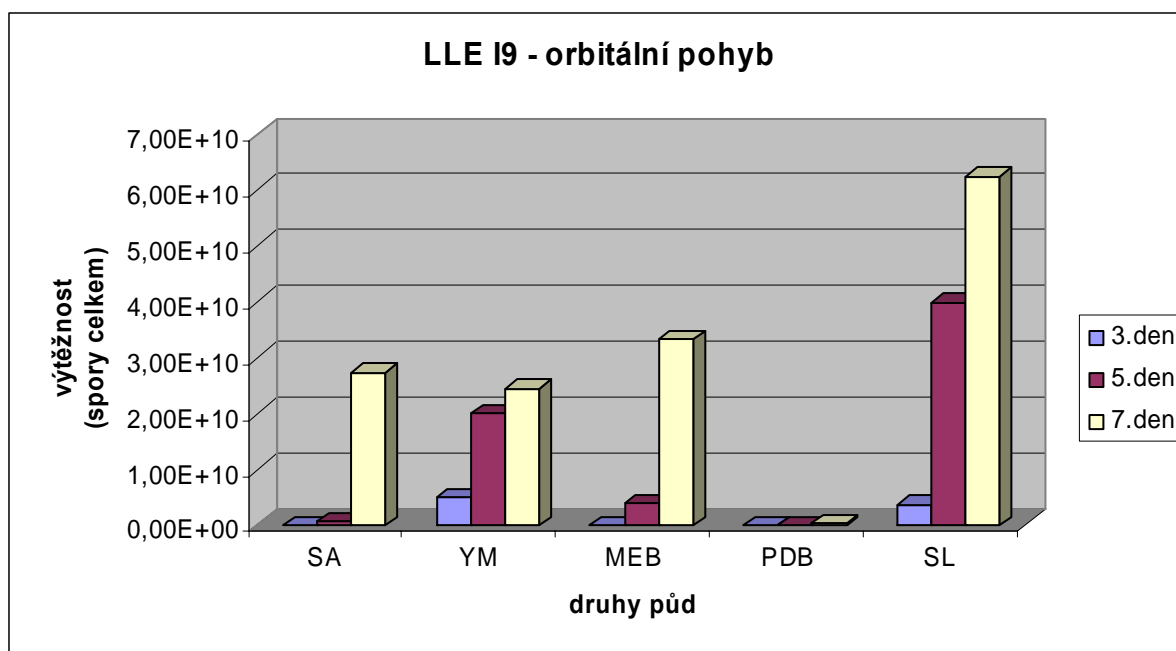
Pokus č. 7: Vliv způsobu třepání na výtěžnost u kmene I9.

Cílem tohoto testu bylo zjištění vlivu orbitálního a lineárního pohybu třepání na výtěžnost kmene I9.

Tabulka č.14 : Výtěžnost kmene I9 na různých typech půd při orbitálním pohybu třepání.

Tekutá živná půda	Počet blastospor ve 100 ml živné půdy		
	3.den	5.den	7.den
SA	4,50E+07	7,55E+08	2,73E+10
YM	4,98E+09	2,00E+10	2,45E+10
MEB	7,50E+07	3,95E+09	3,33E+10
PDB	5,75E+07	7,75E+07	3,73E+08
SL	3,70E+09	3,98E+10	6,23E+10

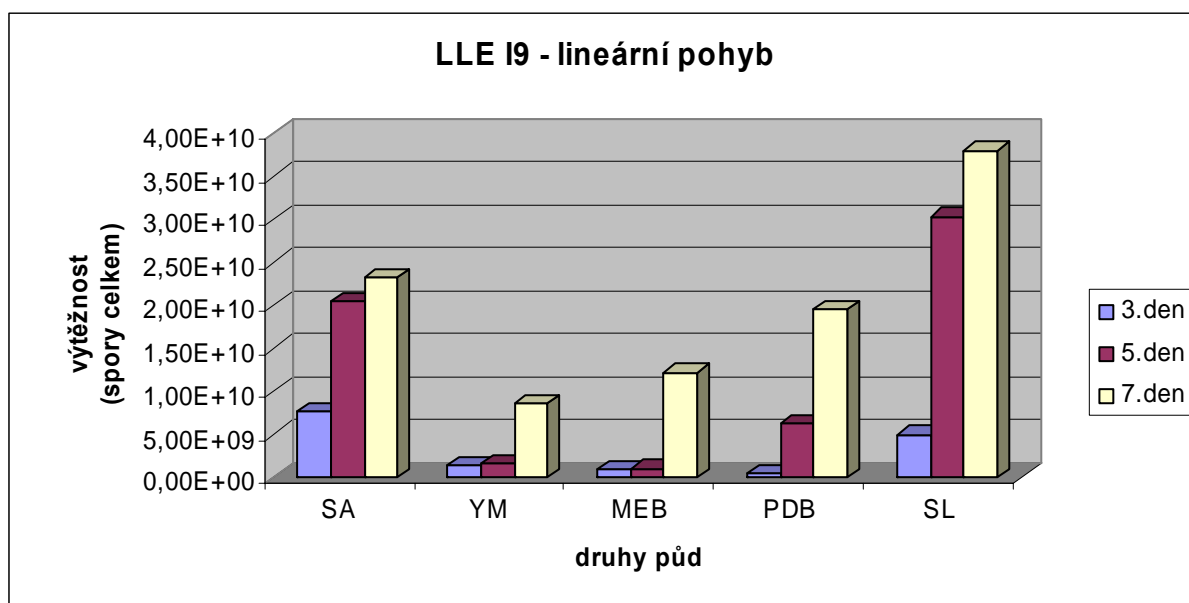
Graf č.14: Výtěžnost kmene I9 na různých typech půd při orbitálním pohybu třepání.



Tabulka č. 15: Výtěžnost blastospor kmene I9 na různých půdách při lineárním třepání.

	Počet blastospor ve 100 ml živné půdy		
	3.den	5.den	7.den
SA	7,75E+09	2,05E+10	2,33E+10
YM	1,45E+09	1,58E+09	8,68E+09
MEB	1,00E+09	1,08E+09	1,22E+10
PDB	4,88E+08	6,23E+09	1,95E+10
SL	5,00E+09	3,03E+10	3,80E+10

Graf č. 15: Výtěžnost blastospor kmene I9 na různých půdách při lineárním pohybu třepání.



Zhodnocení pokusu:

Nejvyšší výtěžnosti blastospor byla zaznamenána u kmene I9 dosaženo při orbitálním směru třepání na půdě SL, nejnižší na půdě PDB. Při lineárním směru třepání byla nejvyšší výtěžnost opět na půdě SL, nejnižší ale na půdě YM.

5.3. *Metarhizium anisopliae*

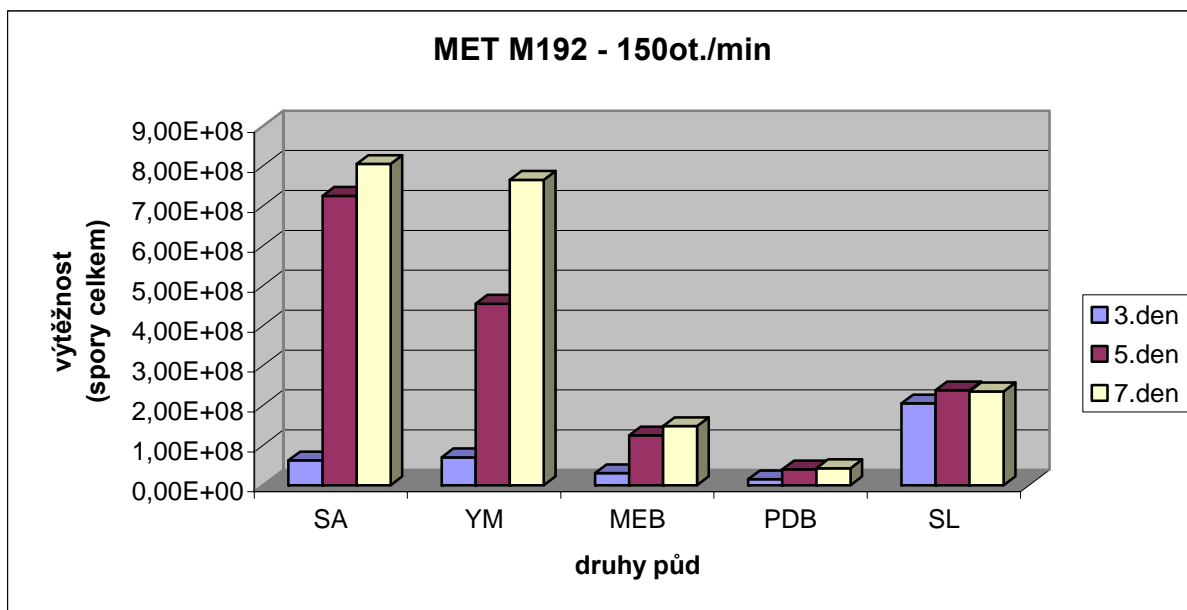
Pokus č. 8: Porovnání výtěžnosti u kmene M 192 entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae* při rozdílné rychlosti třepání.

Cílem tohoto testu bylo zjištění produkce spor u kmene M 192 při rychlosti třepání 150 a 250 otáček / minutu a jejich vzájemné porovnání.

Tabulka č. 16 : Výtěžnost blastospor kmene M 192 na různých typech půd při rychlosti třepání 150ot./min.

Tekutá živná půda	Počet blastospor ve 100 ml živné půdy		
	3.den	5.den	7.den
SA	6,25E+07	7,25E+08	8,05E+08
YM	7,00E+07	4,55E+08	7,65E+08
MEB	3,00E+07	1,25E+08	1,48E+08
PDB	1,50E+07	4,00E+07	4,25E+07
SL	2,05E+08	2,38E+08	2,35E+08

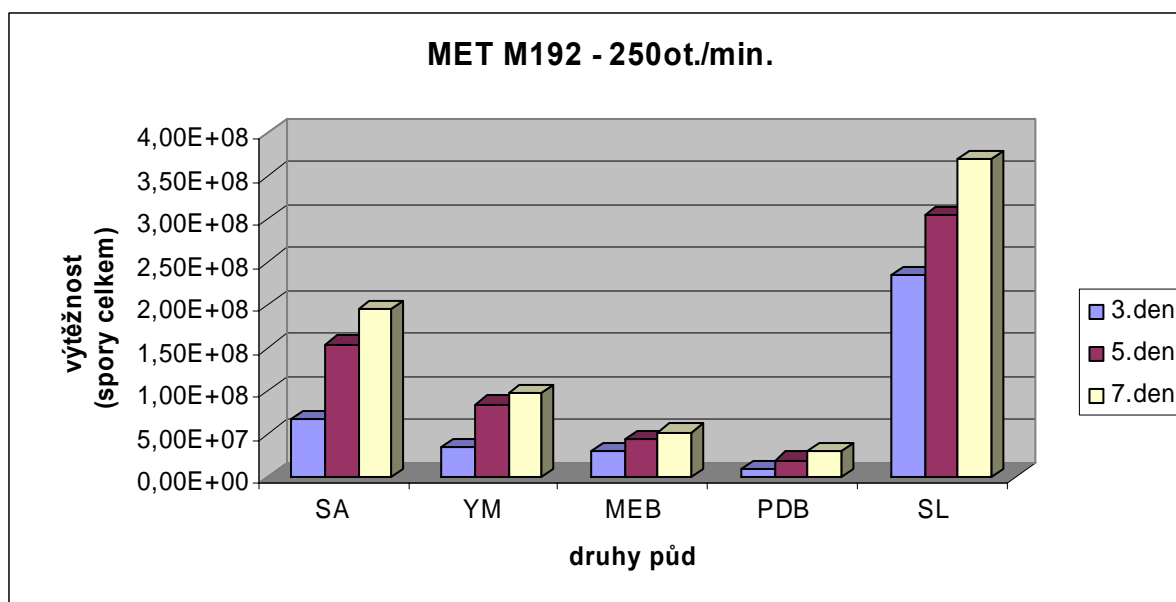
Graf č.16: Výtěžnost blastospor kmene M 192 na různých typech půd při rychlosti třepání 150ot./min.



Tabulka č.17: Výtěžnost blastospor kmene M 192 na různých typech půd při rychlosti třepání 250ot./min.

Tekutá živná půda	Počet blastospor ve 100 ml živné půdy		
	3.den	5.den	7.den
SA	6,75E+07	1,55E+08	1,95E+08
YM	3,50E+07	8,50E+07	9,75E+07
MEB	3,00E+07	4,50E+07	5,25E+07
PDB	1,00E+07	2,00E+07	3,00E+07
SL	2,35E+08	3,05E+08	3,70E+08

Graf č.17: Výtěžnost kmene M 192 na různých typech půd při rychlosti třepání 250ot./min.



Zhodnocení pokusu:

Tento pokus prokázal vliv změny rychlosti třepání na výtěžnost. Blastospor. U kmene M 192 byla při 150 otáčkách/min. výtěžnost nejvyšší na půdách SA a YM, nejnižší na PDB, kdežto při rychlosti 250 otáček/min. byla nejlepší půda SL, nejhorší byla opět PDB.

5.4. *Paecilomyces fumosoroseus*

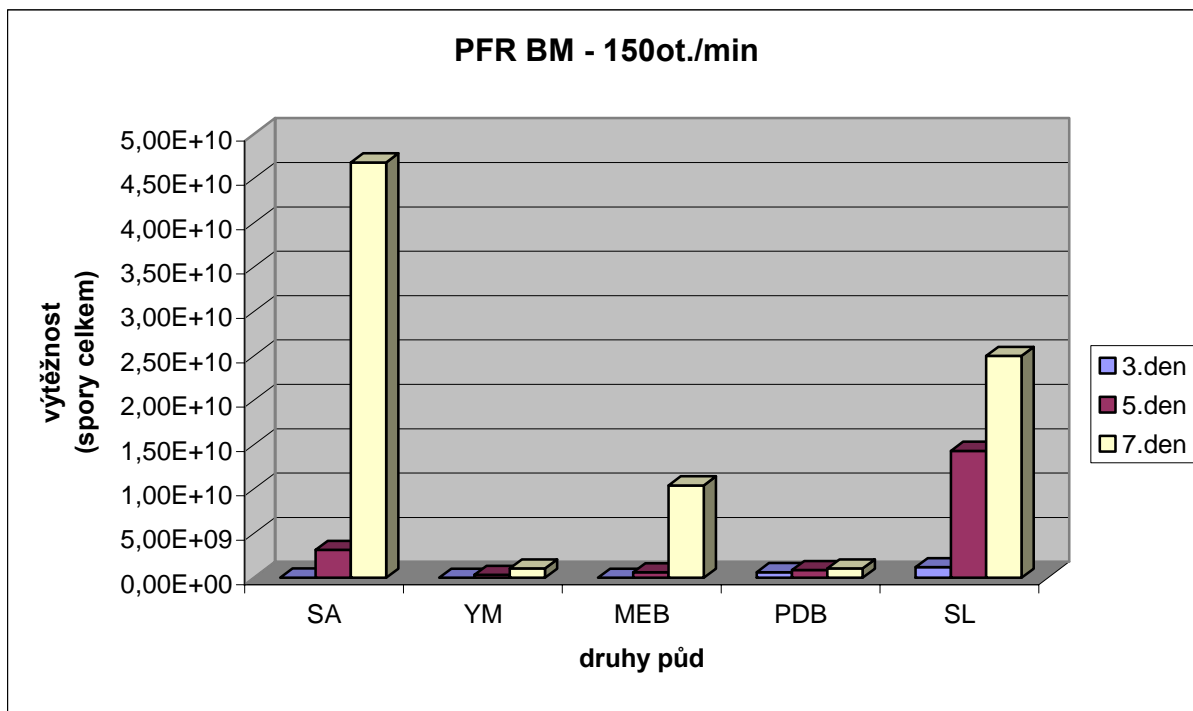
Pokus č. 9: Porovnání výtěžnosti blastospor u kmene PFR BM entomopatogenní houby *Paecilomyces fumosoroseus* při rozdílné rychlosti třepání.

Cílem tohoto testu bylo zjištění produkce spor u kmene PFR BM při rychlosti třepání 150 a 250 otáček / minutu.

Tabulka č.18: Výtěžnost blastospor kmene PFR BM na různých typech půd při rychlosti třepání 150ot./min.

Tekutá živná půda	Počet blastospor ve 100 ml živné půdy		
	3.den	5.den	7.den
SA	1,25E+07	3,13E+09	4,68E+10
YM	0,00E+00	3,34E+08	1,05E+09
MEB	2,50E+06	6,05E+08	1,04E+10
PDB	6,23E+08	8,65E+08	1,04E+09
SL	1,20E+09	1,43E+10	2,50E+10

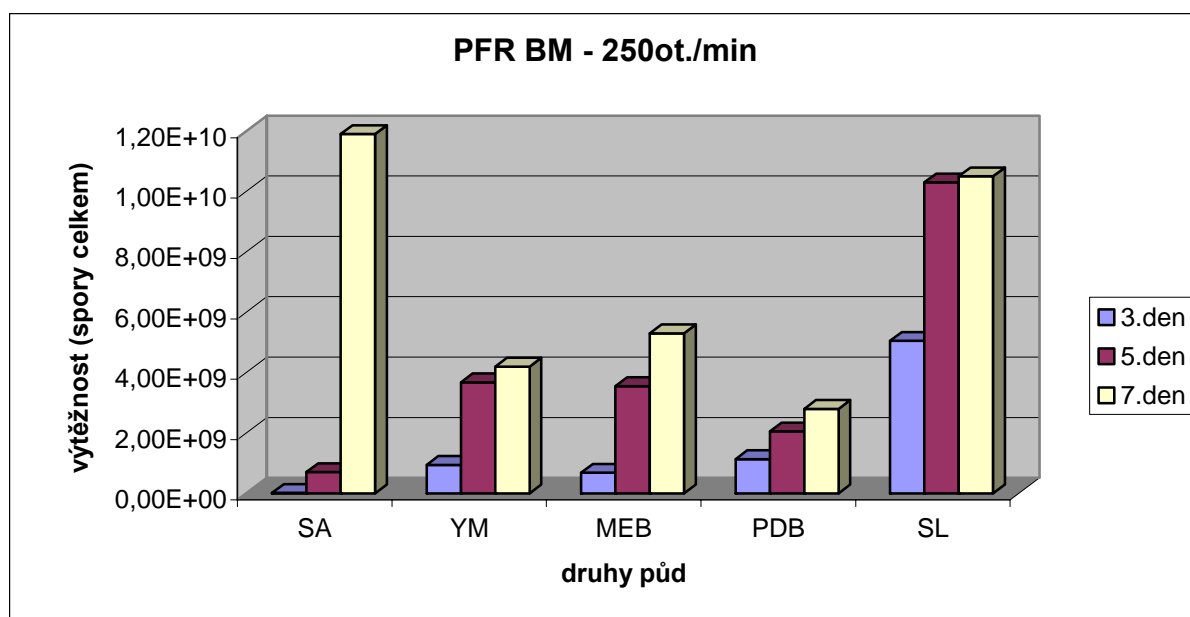
Graf č. 18: Výtěžnost blastospor kmene PFR BM na různých typech půd při rychlosti třepání 150ot./min.



Tabulka č. 19: Výtěžnost blastospor kmene PFR BM na různých typech půd při rychlosti třepání 250ot./min.

Tekutá živná půda	Počet blastospor ve 100 ml živné půdy		
	3.den	5.den	7.den
SA	1,50E+07	7,03E+08	1,19E+10
YM	9,40E+08	3,68E+09	4,20E+09
MEB	6,83E+08	3,55E+09	5,30E+09
PDB	1,13E+09	2,05E+09	2,80E+09
SL	5,05E+09	1,03E+10	1,05E+10

Graf č. 19: Výtěžnost kmene PFR BM na různých typech půd při rychlosti třepání 250ot./min.



Zhodnocení pokusu:

Kmen PFR BM dosáhl lepších výsledků při vyšší rychlosti třepání, na většině půd bylo dosaženo uspokojivých výsledků výtěžnosti. Při nižší rychlosti třepání se většina půd ukázala jako nevhodná. Při 150 otáčkách/min. byla nejvyšší výtěžnost u půd SA, nejnižší u půd YM a PDB, při 250 otáčkách/min. byly jako nejlepší půdy vyhodnoceny SA a SL, jako nejhorší půda PDB.

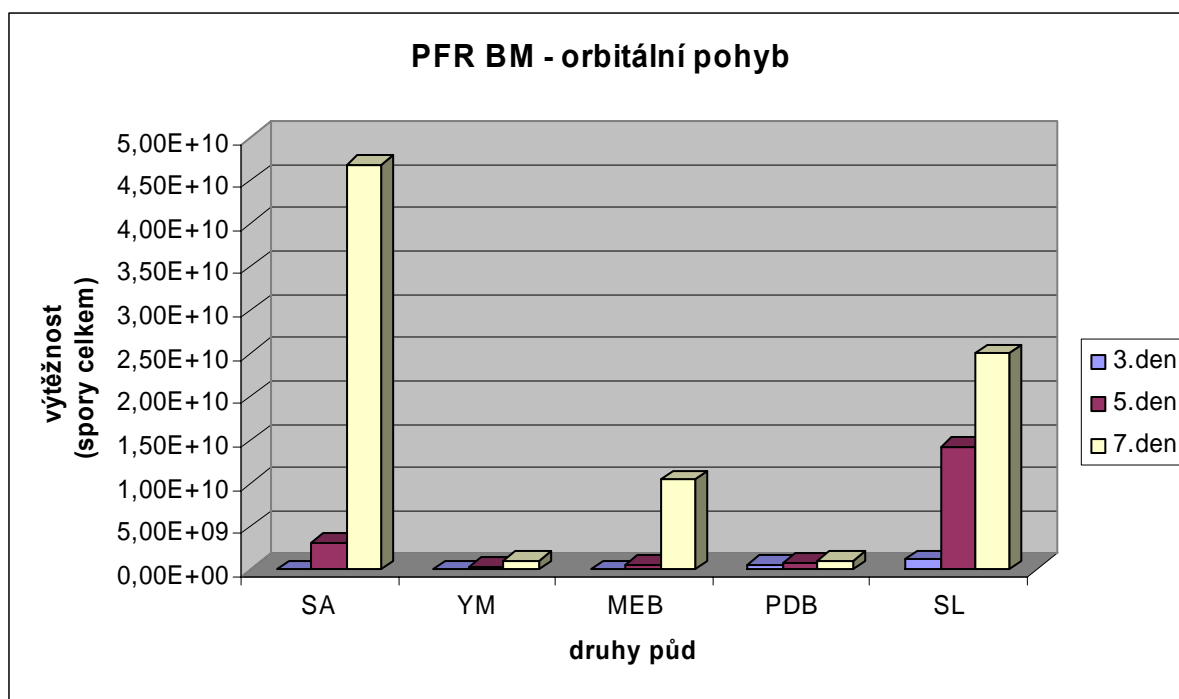
Pokus č. 10: Vliv způsobu třepání na výtěžnost blastospor u kmene PFR BM.

Cílem tohoto testu bylo zjištění vlivu orbitálního a lineárního pohybu třepání na výtěžnost u kmene PFR BM.

Tabulka č. 20: Výtěžnost kmene PFR BM na různých typech půd při orbitálním pohybu třepání.

Tekutá živná půda	Počet blastospor ve 100 ml živné půdy		
	3.den	5.den	7.den
SA	1,25E+07	3,13E+09	4,68E+10
YM	7,50E+06	3,43E+08	1,05E+09
MEB	2,50E+06	6,05E+08	1,04E+10
PDB	6,23E+08	8,65E+08	1,04E+09
SL	1,20E+09	1,43E+10	2,50E+10

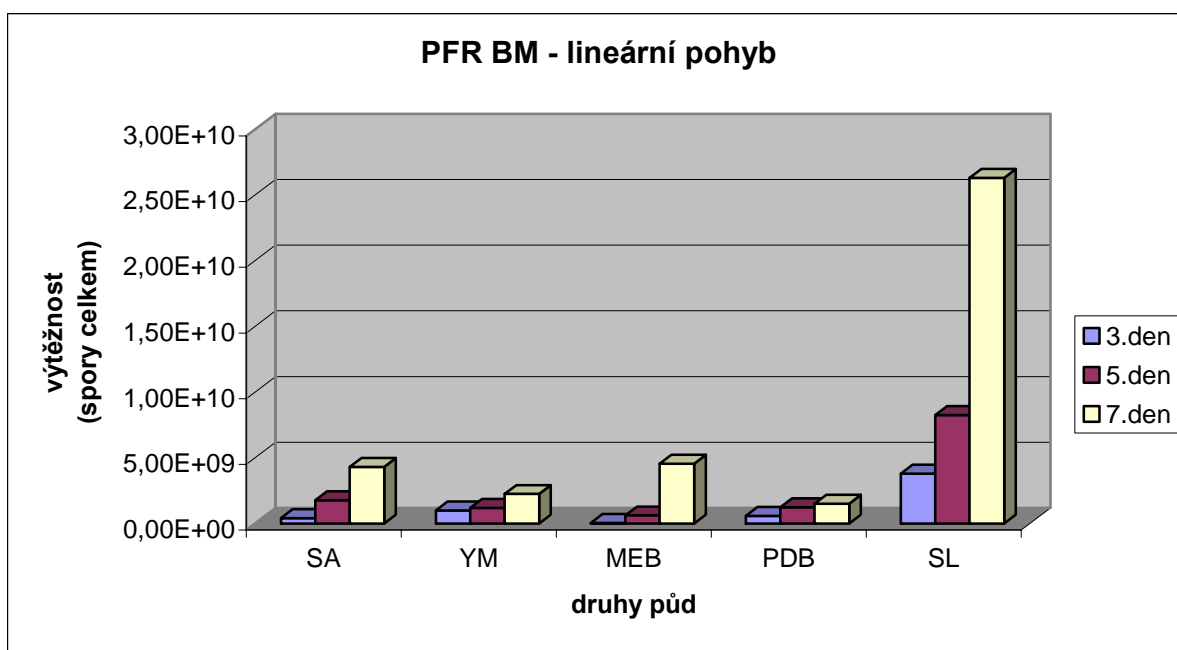
Graf č.20: Výtěžnost kmene PFR BM na různých typech půd při orbitálním pohybu třepání.



Tabulka č.21: Výtěžnost kmene PFR BM na různých typech půd při lineárním pohybu třepání.

Tekutá živná půda	Počet blastospor ve 100 ml živné půdy		
	3.den	5.den	7.den
SA	4,18E+08	1,78E+09	4,30E+09
YM	1,00E+09	1,18E+09	2,25E+09
MEB	5,00E+07	6,18E+08	4,55E+09
PDB	5,75E+08	1,23E+09	1,50E+09
SL	3,80E+09	8,25E+09	2,63E+10

Graf č.21: Výtěžnost kmene PFR BM na různých typech půd při lineárním pohybu třepání.



Zhodnocení pokusu:

Nejvyšší výtěžnosti bylo u kmene PFR BM dosaženo při orbitálním směru třepání na půdě SA, nejnižší na půdě YM a PDB. Při lineárním směru třepání byla nejvyšší výtěžnost na půdě SL, na ostatních půdách byla výtěžnost daleko nižší. Prokázalo se tedy, že způsob pohybu třepání značně ovlivňuje výtěžnost a pro každou půdu je daný způsob třepání více či méně vhodný.

5.5. Změny pH živné půdy v závislosti na submerzní kultivaci

Pokus č.11: Měření pH čistých a nainokulovaných půd

Jako doplňková hodnota bylo měřeno pH u čistých živných půd – SA, YM, MEB, PDB a SL, bez nainokulování entomopatogenními houbami a následně u živných půd 7. den po nainokulování různými kmeny hub. Byly zjišťovány změny pH vlivem metabolitů jednotlivých kmenů entomopatogenních hub a změny způsobené odlišnou rychlostí a způsobu pohybu třepání.

Tabulka č.22: Základní hodnoty pH jednotlivých čistých půd (sterilní, neinokulované).

půda	SA	YM	MEB	PDB	SL
pH	4,91	5,12	5,43	4,95	5,45

Tabulka č.23: Hodnoty pH kmenů Bba 01 a Bba PM houby *Beauveria bassiana* na různých typech půd při rychlosti třepání 150 otáček/min.

Kmen <i>B. bassiana</i>	PŮDA	pH
Bba 01	SA	3,55
	YM	3,80
	MEB	3,69
	PDB	4,36
	SL	4,79
Bba PM	SA	3,72
	YM	3,26
	MEB	4,35
	PDB	3,66
	SL	5,12

Tabulka č.24: Hodnoty pH kmenů LLE I9, MET M192 a Bba 01 na různých typech půd, při rychlosti třepání 150 otáček/min.

Kmen	PŮDA	pH	POZNÁMKA
VL I9	SA	4,57	
	YM	4,39	
	MEB	4,12	
	PDB	3,29	
	SL	4,37	
MET M192	SA	4,42	chuchvalce
	YM	5,52	kuličky, nepravidelně
	MEB	4,88	nekompaktní kuličky
	PDB	3,83	kuličky
	SL	5,23	bez kuliček
Bba 01	SA	3,45	
	YM	3,68	
	MEB	3,41	
	PDB	3,30	
	SL	4,33	

Tabulka č.25: Hodnoty pH kmenů LLE I9, MET M192 a Bba 01 na různých typech půd, při rychlosti třepání 250 otáček/min.

Kmen	PŮDA	pH	POZNÁMKA
VL I9	SA	4,41	
	YM	5,49	
	MEB	4,58	
	PDB	4,04	
	SL	5,34	
MET M192	SA	4,69	kuličky
	YM	5,57	kuličky
	MEB	4,76	menší kuličky
	PDB	3,65	kuličky
	SL	5,38	kuličky
Bba 01	SA	4,36	
	YM	4,19	
	MEB	4,89	
	PDB	3,62	
	SL	4,35	

Tabulka č. 26: Hodnoty pH kmenů LLE 06 a PFR BM na různých typech půd, při rychlosti třepání 150 otáček/min.

Kmen	PŮDA	pH	POZNÁMKA
LLE 06	SA-1	3,96	červená
	SA-2	4,01	červená
	YM-1	6,29	červená
	YM-2	4,09	
	MEB-1	7,59	
	MEB-2	3,60	
	PDB-1	3,23	
	PDB-2	3,40	červená
	SL-1	4,13	
	SL-2	4,29	
PFR BM	SA-1	3,01	
	SA-2	4,57	načervenala
	YM-1	3,29	větší kuličky
	YM-2	2,72	větší kuličky
	MEB-1	3,16	
	MEB-2	2,97	
	PDB-1	2,76	menší kuličky
	PDB-2	2,93	menší kuličky
	SL-1	3,88	
	SL-2	4,10	

Tabulka č. 27: Hodnoty pH kmenů LLE 06 a PFR BM na různých typech půd, při rychlosti třepání 250 otáček/min

Kmen	PŮDA	pH	POZNÁMKA
LLE 06	SA-1	3,55	červená
	SA-2	3,97	tmavě červená
	YM-1	7,13	oranžová
	YM-2	6,15	oranžová
	MEB-1	7,49	
	MEB-2	6,91	
	PDB-1	2,80	
	PDB-2	2,75	
	SL-1	2,83	nahnědlá
	SL-2	2,99	nahnědlá
	PFR BM	SA-1	3,09
SA-2		4,12	
YM-1		3,39	
YM-2		7,06	tm.červená / hnědá
MEB-1		3,23	
MEB-2		4,44	
PDB-1		2,42	
PDB-2		2,27	růžová
SL-1		3,58	
SL-2		3,63	

Tabulka č.28: Hodnoty pH kmenů LLE I9, PFR BM a Bba 01 na různých typech půd při orbitálním pohybu třepání

Kmen	PŮDA	pH	POZNÁMKA
LLE I9	SA	5,27	
	YM	4,65	
	MEB	3,95	
	PDB	4,40	bílé kuličky
	SL	4,27	
PFR BM	SA	4,57	načervenalá
	YM	2,72	větší kuličky
	MEB	2,97	
	PDB	2,93	menší kuličky
	SL	4,10	
Bba 01	SA	3,18	
	YM	4,57	
	MEB	3,24	
	PDB	4,81	
	SL	3,92	

Tabulka č.29: Hodnoty pH kmenů LLE I9, PFR BM a Bba 01 na různých typech půd při lineárním pohybu třepání

Kmen	Živná půda	pH
LLE I9	SA	4,90
	YM	4,61
	MEB	4,56
	PDB	3,20
	SL	3,78
PFR BM	SA	4,67
	YM	3,13
	MEB	3,16
	PDB	2,63
	SL	3,98
Bba 01	SA	3,31
	YM	3,60
	MEB	3,15
	PDB	3,29
	SL	4,44

Zhodnocení pokusu:

Tento test prokázal vliv metabolitů hub na pH živných půd. U většiny pozorovaných kmenů způsobila submerzní kultivace pokles pH, pouze u kmene LLE 06 došlo k výraznému zvýšení pH u půd YM a MEB při 150 i 250 otáčkách/min. Dále byly prokázány změny pH při rozdílné rychlosti i směru pohybu třepání.

5.6. Středněobjemové produkce submerzní biomasy vybraných kmenů entomopatogenních hub

Pro středněobjemové kultivace byla použita sada kmenů hub *Paecilomyces fumosoroseus* odvozených od základního kmene PFR 97 (Apopka), *Lecanicillium lecanii*

(kmen I9) a *Beauveria bassiana* kmen Bba PK . Pro inokulace tekutých živných médií byla použita suspenze blastospor získána 3 denní kultivací hub v tekuté živné půdě PDB. Pro produkční kultivace byly používány 1000 ml kulaté baňky, do kterých bylo dodáno 350 ml tekutého živného média (PDB) a každá baňka byla inokulována 10 ml inokulační suspenze blastospor adjustované na titer $1,0 \times 10^6$ blastospor/1ml. Po inokulaci byly baňky umístěny na lineární třepačku (3 nosná plata s kovovými úchyty, maximální kapacita - 50 litrů, přímočarý pohyb, stálý výkyv a pohyb 250 výkyvů za minutu). Submerzní kultivace probíhala kontinuálně po dobu 3-5 dnů při průměrné teplotě $23 \pm 2^\circ\text{C}$ a při omezeném osvětlení. Po ukončení kultivace byly všechny kultury hodnoceny, přičemž klíčovým hodnotícím parametrem bylo množství blastospor v 1ml submerzní kultury. Submerzní kultury byly následně zakoncentrovány odstředováním (5 min/1500 rpm) a pro další hodnocení výtěžnosti byl používán koncentrát blastospor (=blastosporová pasta).

Tabulka č. 30. Středněobjemová submerzní kultivace entomopatogenní houby *Paecilomyces fumosoroseus* kmen PFR 97 (2B)

Produkční parametr	1. šarže	2. šarže	3. šarže	4. šarže	5. šarže
Submerzní kultura (celkem ml)	1350	1600	2050	2400	2400
Titr (blastospor/1ml)	$4,30 \times 10^8$	$5,90 \times 10^8$	$4,80 \times 10^8$	$6,30 \times 10^8$	$6,10 \times 10^8$
Blastospor celkem ^I	$5,81 \times 10^{11}$	$9,44 \times 10^{11}$	$9,84 \times 10^{11}$	$1,51 \times 10^{12}$	$1,46 \times 10^{12}$
Suspenze $1,0 \times 10^6$ /ml (I) ^{II}	580,5	944	984	1512	1464
Pasta (g) ^{III}	274	352	461	439	410
Blastospor/ 1g pasty	$1,70 \times 10^9$	$2,10 \times 10^9$	$1,70 \times 10^9$	$2,80 \times 10^9$	$2,60 \times 10^9$
Blastospor celkem	$4,66 \times 10^{11}$	$7,39 \times 10^{11}$	$7,83 \times 10^{11}$	$1,22 \times 10^{12}$	$1,06 \times 10^{12}$
Suspenze $1,0 \times 10^6$ (I)	465,8	739,2	783,7	1229,2	1066
Výtěžnost pasty (%) ^{IV}	80,24	78,31	79,64	81,30	72,81

^I. Celkové množství blastospor v původní submerzní kultuře

^{II}. Standardní titer suspenzí používaných při provozních aplikacích

^{III}. Blastosporový koncentrát získaný odstředěním submerzní kultury

^{IV}. Podíl z původní submerzní kultury (100% = původní subverze před finalizací odstředěním)

Tabulka č. 31: Středněobjemová submerzní kultivace entomopatogenní houby *Paecilomyces fumosoroseus* kmen PFR 97 (H10)

Produkční parametr	1. šarže	2. šarže	3. šarže	4. šarže
Submerzní kultura (celkem ml)	1650	1400	1550	1000
Titř (blastospor/1ml)	$4,80 \times 10^8$	$4,10 \times 10^8$	$5,40 \times 10^8$	$4,30 \times 10^8$
Blastospor celkem	$7,92 \times 10^{11}$	$5,74 \times 10^{11}$	$8,37 \times 10^{11}$	$4,30 \times 10^{11}$
Suspenze $1,0 \times 10^6$ (l)	792	574	837	430
Pasta (g)	255	273	305	120
Blastospor/1g pasty	$2,50 \times 10^9$	$1,60 \times 10^9$	$2,10 \times 10^9$	$2,80 \times 10^9$
Blastospor celkem	$6,38 \times 10^{11}$	$4,36 \times 10^{11}$	$6,40 \times 10^{11}$	$3,36 \times 10^{11}$
Suspenze $1,0 \times 10^6$ (l)	638	437	641	336
Výtěžnost pasty (%)	80,49	76,10	76,52	78,14

Tabulka č. 32: Středněobjemová submerzní kultivace entomopatogenní houby *Paecilomyces fumosoroseus* kmen PFR 97 (H20)

Produkční parametr	1. šarže	2. šarže	3. šarže	4. šarže
Submerzní kultura (celkem ml)	700	700	1050	1400
Titř (blastospor/1ml)	$6,30 \times 10^8$	$5,10 \times 10^8$	$5,90 \times 10^8$	$6,10 \times 10^8$
Blastospor celkem	4,41E+11	3,57E+11	6,20E+11	8,54E+11
Suspenze $1,0 \times 10^6$ (l)	441	357	619,5	854
Pasta (g)	209	195	288	373
Blastospor/ 1g pasty	1,90E+09	1,67E+09	1,82E+09	1,94E+09
Blastospor celkem	3,97E+11	3,2565E+11	5,2416E+11	7,2362E+11
Suspenze - $1,0 \times 10^6$ (l)	397,1	325,65	524,16	723,62
Výtěžnost pasty (%)	90,05	91,22	84,61	84,73

Tabulka č. 33: Středněobjemová submerzní kultivace entomopatogenní houby *Lecanicillium lecanii* kmen I9

Produkční parametr	1.šarže	2.šarže	3. šarže	4. šarže	5. šarže
Submerzní kultura (celkem ml)	1000	1400	1600	1050	1600
Titř (blastospor/1ml)	8,84 x 10 ⁸	1,05 x 10 ⁹	8,76 x 10 ⁸	9,80 x 10 ⁸	1,22 x 10 ⁹
Blastospor celkem	8,84 x 10 ¹¹	1,47 x 10 ¹²	1,40 x 10 ¹²	1,03 x 10 ¹²	1,95 x 10 ¹²
Suspenze 1,0x10 ⁶ (l)	884	1470	1402	1029	1952
Pasta (g)	124	210	192	158	215
Blastospor/ 1g pasty	5,77 x 10 ⁹	5,63 x 10 ⁹	6,33 x 10 ⁹	5,66 x 10 ⁹	6,83 x 10 ⁹
Blastospor celkem	7,15 x 10 ¹¹	1,18 x 10 ¹²	1,21 x 10 ¹²	8,94 x 10 ¹¹	1,46 x 10 ¹²
Suspenze - 1,0x10 ⁶ (l)	715,48	1182,3	1215,36	894,28	1468,45
Výtěžnost pasty (%)	80,94	80,43	86,71	86,91	75,23

Tabulka č. 34: Středněobjemová submerzní kultivace entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* kmen P4

Produkční parametr	1.šarže	2.šarže	3. šarže	4. šarže	5. šarže
Submerzní kultura (celkem ml)	1350	1400	1050	6400	4800
Titř (blastospor/1ml)	7,95 x 10 ⁸	6,34 x 10 ⁸	6,61 x 10 ⁸	8,11 x 10 ⁸	7,40 x 10 ⁸
Blastospor celkem	1,07 x 10 ¹²	8,88 x 10 ¹¹	6,94 x 10 ¹¹	5,19 x 10 ¹²	3,55 x 10 ¹²
Suspenze 1,0x10 ⁶ (l)	1073	888	694	5190	3552
Pasta (g)	274	269	217	1143	865
Blastospor/ 1g pasty	3,30 x 10 ⁹	2,99 x 10 ⁹	2,71 x 10 ⁹	3,61 x 10 ⁹	3,66 x 10 ⁹
Blastospor celkem	9,04 x 10 ¹¹	8,05 x 10 ¹¹	5,88 x 10 ¹¹	4,13 x 10 ¹²	3,17 x 10 ¹²
Suspenze - 1,0x10 ⁶ (l)	904	805	588	4126	3166
Výtěžnost pasty (%)	84,25	90,65	84,73	79,50	89,13

Zhodnocení pokusu:

Produkce každého z kmenů použitých v pokuse byla opakována 4 – 5 (kompletně oddělené série produkcí). Opakování submerzních kultivací prokázalo poměrně vysokou stabilitu produkcí jednotlivých druhů/kmenů hub. V rámci produkcí byla získávána i koncentrovaná verze produktu – blastosporová pasta, která byla získána odstředěním.

V pokusech bylo vyprodukováno téměř 40 litrů submerzních kultur, které představovaly možnost naředění na téměř 29 000 litrů suspenzí o titru $1,0 \times 10^6$ blastospor v 1 ml (11 397 litrů Bba; 6 737 litrů Lle a 10 389 litrů PFR).

6. DISKUZE A ZÁVĚRY

Entomopatogenní houby představují obecně velmi studovanou skupinu mikroorganismů. Často jsou využívány v biologické ochraně rostlin k potlačení výskytu řady škůdců. Obecným předpokladem využití submerzní kultivace je schopnost entomopatogenních hub vytvářet specifické spory tzv. blastospory. Blastospory jsou definovány jako tenkostěnné spory vznikající pučením (opakující se postupné dělení matečné blastospory na dvě blastospory dceřiné), tedy nikoliv jako silnostěnné konidie, které se formují pomocí konidiogenních buněk (fialida) na konidioforech, které se vytvářejí na vzdušném myceliu (např. na povrchu těla usmrčeného hmyzího hostitele). V procesu patogeneze, který je realizován v přirozeném interakčním systému „patogen – hostitel“ se ve vývojovém cyklu blastospory objevují po proniknutí patogena do tělní dutiny hostitele a svým rychlým množením umožňují účinnou kolonizaci tělní dutiny, která *de facto* představuje submerzní prostředí, protože je (u hmyzu) vyplněna cirkulující, částečně okysličenou hemolymfou. V tomto kontextu představují submerzní kultivace technologickou analogii přirozených mechanismů vývoje resp. částí vývoje vláknitých hub. Principem submerzních kultivací entomopatogenních hub je jejich kultivace v tekutých živných médiích při zajištění omezeného (nicméně dostatečného) prokysličení. Pro nízkoprodukční submerzní kultivace jsou nejčastěji používány orbitální nekolineární třepačky, na které jsou umístovány baňky s tekutým živným médiem. Pro inokulace živného média jsou nejčastěji využívány suspenze konidií nebo blastospor příslušného kmene houby získané z matečných kultur, které mohou být kultivovány buď povrchově (např. kultury na agarizovaný živný půdách nebo na povrchu přirozených substrátů), případně i jako submerzní kultury (tzv. inokulační fáze produkce). Po inokulaci tekuté živné půdy jsou baňky umístěny na třepačku nastavenou na požadované parametry (otáčky/min, výkyv). Kontinuální pohyb třepačky zajišťuje pohyb tekutého živného média, čímž je zabezpečeno požadované provzdušnění média a zároveň i znemožněn „povrchový růst“ houby na hladině média (jev typický pro stacionární kultivace, růst mycelia a konidiogeneze v aerobních podmínkách). Pomocí submerzních kultivací lze produkovat uniformní biomasu většiny známých druhů vláknitých entomopatogenních hub a na bázi blastospor získaných pomocí submerzní kultivace je také konstruována převážná většina komerčních biopreparátů (např. Preferal®, Botangard®, Vertalec® a další).

Cílem této diplomové práce bylo ověření možnosti využití nízkokapacitních biotechnologií zaměřených na produkci uniformní biomasy vybraných kmenů entomopatogenních hub pomocí submerzní kultivace na umělých živných médiích. Bylo

prokázáno, že produkce uniformní biomasy blastospor je možná. Velice nutné je ale optimalizovat kultivace pro každý kmen zvlášť, protože každý kmen má své specifické požadavky na složení živin umělého živného média, na hodnotu pH, na teplotu při které kultivace probíhá, ale i na samotný způsob provedení a délku trvání kultivace. Pak je poměrně snadné dosáhnout uspokojivých výsledků v produkci blastospor u jakýchkoli kmenů entomopatogenních hub.

Pokus č. 1 byl zaměřen na porovnání výtěžnosti blastospor kmenů Bba 01 a Bba PM entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* a na výběr produktivnějšího kmene. Produkce blastospor byla vyhodnocována 3., 5. a 7. den kultivace na tekutých živných půdách SA, YM, MEB, PDB a SL. Výsledkem bylo zjištění, že kmen Bba 01 dosahuje vyšší produkce blastospor na všech typech živných půd, než kmen Bba PM původní. U kmene Bba 01 se jako nejlepší živné médium projevila půda SL, kde výtěžnost dosahovala produkce $5,83 \times 10^{10}$ blastospor ve 100ml suspenze a půda MEB s produkcí $5,80 \times 10^{10}$ blastospor ve 100ml. U kmene Bba PM byla jako nejlepší vyhodnocena půda PDB s výtěžností $1,75 \times 10^{10}$ blastospor/100ml a půda SL s výtěžností $1,63 \times 10^{10}$ blastospor/100ml. Jednoznačně nejméně produkční živná půda, na které bylo dosaženo nejnižších výtěžností u obou kmenů, byla vyhodnocena půda SA, kde u kmene Bba01 výtěžnost dosahovala hodnoty $4,73 \times 10^9$ a u kmene Bba PM původní hodnoty $2,29 \times 10^9$ blastospor/100ml.

Pokusy č. 2, 5, 6, 8 a 9 byly zaměřeny na porovnání výtěžností blastospor u kmenů Bba 01 (*Beauveria bassiana*), M 192 (*Metarhizium anisoplyae*), LLE 06, I9 (*Lecanicillium lecanii*) a PFR BM (*Paecilomyces fumosoroseus*) na tekutých živných půdách SA, YM, MEB, PDB a SL, při rychlosti třepání 150 a 250 otáček/minutu na orbitální třepáče. Tento pokus prokázal vliv změny rychlosti třepání na výtěžnost. Jednoznačně vyšší výtěžnosti bylo dosaženo při rychlosti třepání 150ot./min. a to u všech sledovaných kmenů. Z použitých živných půd se jako nejvhodnější ukázaly půdy SA a SL a jako nejméně vhodná půda PDB u téměř všech kmenů a i u obou rychlostí třepání. Při rychlosti třepání 150ot./min. byly nejvyšší výtěžnosti u sledovaných kmenů následující: Bba01 – SL $1,85 \times 10^{11}$, I9 – SL $9,55 \times 10^{10}$, M192 – SA $8,05 \times 10^8$ a PFR BM – SA $4,68 \times 10^8$, a nejnižší výtěžnosti dosahovaly hodnot: Bba01 – SA $3,7 \times 10^{10}$, I9 – PDB $5,25 \times 10^9$, M192 – PDB $4,25 \times 10^7$ a PFR BM – PDB $1,04 \times 10^9$. Při rychlosti třepání 250ot./min. byly nejvyšší výtěžnosti u sledovaných kmenů následující: Bba01 – MEB $2,33 \times 10^{11}$, I9 – SL $5,45 \times 10^{10}$, M192 – SL $3,7 \times 10^8$ a PFR BM – SA $1,19 \times 10^{10}$, a nejnižší výtěžnosti dosahovaly hodnot: Bba01 – YM $1,15 \times 10^{10}$, I9 – PDB $1,68 \times 10^9$, M192 – PDB $3,0 \times 10^7$ a PFR BM – PDB $2,8 \times 10^9$. U kmene LLE 06 se

nepodařilo objektivně zaznamenat nárůst konidií, protože během měření došlo k velkému nárůstu mycelia, většina konidií se neuvolnila a zůstala přirostlá na konidioforech.

Pokusy č. 3, 7 a 10 byly zaměřeny na zjištění vlivu orbitálního a lineárního způsobu pohybu třepání na výtěžnost blastospor. Tento vliv byl prokázán, jelikož při orbitálním pohybu třepání bylo u všech sledovaných kmenů entomopatogenních hub dosaženo vyšší výtěžnosti blastospor na všech typech tekutých živných půd oproti lineárnímu pohybu třepání. V tomto pokusu byly použity kmeny Bba 01 (*Beauveria bassiana*), I9 (*Lecanicillium lecanii*) a PFR BM (*Paecylomyces fumosoroseus*). Produkce blastospor byla vyhodnocována 3., 5. a 7. den kultivace. Při orbitálním pohybu třepání byla produkce blastospor následující : kmen Bba01 dosahoval nejvyšší výtěžnosti na živné půdě YM ($8,28 \times 10^{10}$) a nejnižší výtěžnosti na půdě SA ($2,90 \times 10^{10}$), kmen I9 dosahoval nejvyšší výtěžnosti na živné půdě SL ($6,23 \times 10^{10}$) a nejnižší na půdě PDB ($3,73 \times 10^8$) a kmen PFR BM dosahoval nejvyšší produkce blastospor na půdě SA ($4,68 \times 10^{10}$) a nejnižší produkce stejně jako kmen I9 na půdě PDB ($1,04 \times 10^9$). Při lineárním pohybu třepání dosahovala výtěžnost následujících hodnot: u kmene Bba01 byla produkce nejvyšší u půdy SL ($4,9 \times 10^9$), nejnižší u půdy SA ($2,53 \times 10^8$), kmen I9 dosahoval nejvyšší výtěžnosti na živné půdě SL ($3,8 \times 10^{10}$) a nejnižší na půdě YM ($8,68 \times 10^9$) a u kmene PFR BM byla výtěžnost nejvyšší opět na půdě SL ($2,63 \times 10^{10}$) a nejnižší na půdě PDB ($1,5 \times 10^9$).

Pokus č. 4 byl zaměřen na vliv různých objemů suspenze entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* na výtěžnost blastospor. Cílem tohoto testu bylo zjistit vliv různých objemů (100, 500 a 1000ml) na výtěžnost kmene Bba 01 u půd MEB, MEB 2x a SL a dále porovnání půd MEB 2x a SL a možnost nahrazení půdy SL půdou MEB 2X. Tyto dvě půdy mají obdobný obsah živin. Tento pokus prokázal vliv objemu suspenze na výtěžnost konidií. Nejvyšší výtěžnost byla dosažena u objemu 500 ml u všech typů půd (MEB – $1,31 \times 10^{11}$, MEB 2x – $1,33 \times 10^{11}$ a SL – $1,33 \times 10^{11}$), nejnižší výtěžnost pak vykazovaly suspenze o objemu 100 ml (MEB – $8,63 \times 10^{10}$, MEB 2x – $1,24 \times 10^{11}$ a SL – $8,78 \times 10^{10}$). Při srovnání půd SL a MEB 2x se neprojeví výrazné rozdíly ve výtěžnosti, a proto je možné půdu SL nahradit půdou MEB 2x.

Pokus č.11 byl zaměřen na stanovení hodnoty pH a na prokázání vlivu metabolitů vybraných kmenů entomopatogenních hub (Bba01, Bba PM, I9, LLE06, M192, PFR BM) a vlivu rychlosti a způsobu třepání na změnu této hodnoty. Lze jednoznačně konstatovat, že všechny sledované ukazatele mají prokazatelný vliv na změnu pH živných půd, do kterých byly nainokulovány jednotlivé kmeny. Hodnoty pH u čistých půd jsou : SA – 4,91 , YM – 5,12 , MEB – 5,43 , PDB – 4,95 a SL – 5,45. U většiny testů došlo k poklesu hodnoty pH. Jen

při rychlosti třepání 150ot./min. došlo ke zvýšení hodnoty pH u kmene M192 na půdě YM na pH 5,52 a u kmene LLE06 na půdách YM na pH 6,29 a na MEB na pH 7,59. Při rychlosti třepání 250ot./min. došlo ke zvýšení hodnoty pH u kmene I9 na půdě YM na pH 5,49, u kmene LLE06 na půdách YM na pH 7,13 a na MEB na pH 7,49 a u kmene M192 na půdě YM na hodnotu pH 5,57.

Středněobjemové produkce submerzních kultur vybraných kmenů hub *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii* a *Paecilomyces fumosoroseus* prokázaly možnost využívat standardní postup submerzní kultivace. Nicméně, rozdíly v produkci blastospor naznačují, že optimalizace postupu je nutná a pro produkční kultivace bude funkční využívat postupy, které respektují nejen nároky a požadavky jednotlivých druhů, ale i kmenů entomopatogenních hub.

Výsledky diplomové práce lze stručně shrnout do následujících bodů a konstatování:

1. Všechny testované kmeny a druhy entomopatogenních hub lze produkovat jako submerzní kultury.
2. Produkce blastospor je ovlivněna složením živných půd.
3. Produkci a výtěžnost blastospor ovlivňují podmínky submerzní kultivace (rychlost a způsob třepání.)
4. Objem suspenze značně ovlivňuje výtěžnost.
5. Obdobné kultivační postupy je možné využít pro produkci uniformní biomasy různých druhů/kmenů entomopatogenních hub určených pro použití v biologické ochraně rostlin.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Altre J. A., Vandenberg J.D., Cantone F. A., 1999: Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolated to diamondback moth, *Plutella xylostella*: Correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73 (3): 332 – 338.
- Andersch W., Hartwig J., Reinecke P., Roberts D., 1990: Production of mycelial granules of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for biological control of soil pests. In: *Proceeding of 5th Int. Collq. Invert. Pathol. And Microb. Control.* Adelaide, Australia, 2- 5.
- Arthus S., Thomas M. B., 2001: Effects of temperature and relative humidity on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *Acridum* in mycosed cadavers of *Schistocerca gregaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78 (2): 59 – 65.
- Boucias D. G., Pendland J. C., Latgé J. P., 1988: Nonspecific factor involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied Environmental Microbiology*, 54: 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.
- Brownbridge M., Costa S., Jaronski S. T., 2001: Effects of in vitro passage of *Beauveria bassiana* of virulence to *Bemisia argentifolii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 77: 280 – 283.
- Butt T. M., Segers R. J., Leal S. C. M., Kerry B. R., 1998: Variation in the subtilisins of fungal pathogens of insects and nematodes. In: Bridge P., Couteaudier Y., Clarkson J., (Eds.): *Molecular Variability of Fungal Pathogens*. CAB International, Wallingford, UK, 149 – 169.
- Butt T. M., 2002: Use of Entomopathogenous Fungii or the Control of Insect Pests. In: Esser K., Lemke P.A. (Eds.): *The Mycota XI.-Agricultural Applications*. Springer, Verlag Berlin Heidelberg, 111 – 134.
- Butt T. M., Goettel M. S., 2000: Bioassays of Entomopathogenous Microbes and Nematodes. CAB International Wallingford UK, 95 – 140.
- Dangar T. K., Geetha L., Jayapal S. P., Pillai G. B., 1991: Mass production of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* in coconut water wasted from copra making industry. *Journal of Plantation Crops*, 19 (1): 1, 54 – 69.
- 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. *IOBC/WPRS Bulletin*, 21: 89 – 90.
- Dirlbeková O., 1991: Biologické zdroje pro mechanickou ochranu rostlin (Deuteromycetes, *Beauveria bassiana* (Balls.) Vuill.). *Studie VTR, ÚVTIZ, Ř. Rostl. Vyr.*, 1991, 11: 10 – 21
- Dirlbeková O., Nesrsta M., 1989: Boverol – biopreparát registrovaný v ČSSR. *Ochrana rostlin*, 1989, 239 – 240.
- Domsch K. H., Gams W., and Anderson T. H., 1980: *Compendium of soil fungi*. Vol 1. Academic Press, New York, pp. 859.
- Drummond J., Heale J. B., Gillespie A. T., 1987: Germination and effect of reduced humidity on expression of pathogenicity in *Verticillium lecanii* against the glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. *Annals of Applied Biology*, 111: 193 – 201.
- Elliot S. L., Sabelis M. W., Janssen A., Van der Geest L. P. S., Beerling E. A. M., Fransen J., 2000: Can Plants use entomopathogens as bodyguards? *Ecology letters*, 3: 228 – 235.

- Eyal J., Mabud A., Fischbein K. L., Walter J. F., Osborne L. S., Landa Z., 1994: Assessment of *Beauveria bassiana* Nov. EO-1 Strain, Which Produces a Red Pigment for Microbial Control. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 44: 65 – 80.
- Fargues J., 1976: Spécificité des champignons pathogènes imparfaits (Hyphomycetes) pour les larves de Coléoptères (Scarabeidae et Chrysomelidae). *Entomophaga*, 21 : 313 – 323.
- Fargues J., Goettel M. S., Smith 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., Rougier M., Goujet R., Smith N., Coustere Ch., Itier B., 1997b: Inactivation of Conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* by Near-Ultraviolet (UVA and UVB) and Visible Radiation. *Journal of Invertebrate Pathology*, 69: 70 – 78.
- Fargues J., Luz C., 2000: Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on the infection potential of *Beauveria bassiana* for *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate pathology*, 75 (3): 202 – 211.
- Fawcett H. S., 1908: Fungi parasitic upon *Aleirodis citri*. University of Florida, Experimental studies, 1: 1 – 41.
- Feng Z., Carruthers R. I., Roberts D. W., Robson D. S., 1985: Age-specific dose-mortality effects of *Beauveria bassiana* on the European corn borer *Ostrinia nubilalis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 46: 259 – 264.
- Feng M. G., Poprawski T. J., Khachatourians G. G., 1994: Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control – current status. *Biocontrol Science and Technology*, 4: 3 – 34.
- Fransen J. J., 1990: Natural enemies of whiteflies – Fungi, 187 – 209. In: Berlinsky D., (Eds.): *Whiteflies: Their Bionomics, Pest Status and Management*. Athanaeum Press, Newcastle upon Tyne.
- Gillespie J. P., Bailey A. M., Cobb B., Vilcinskis A., 2000: Fungi as Elicitors of Immune Responses. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 44: 49 – 68.
- Gindin G., Geschtovt N. U., Raccach B., Barash I., 2000: Pathogenicity of *Verticillium lecanii* to different developmental stages of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Phytoparasitica*, 28 (3): 229 – 239.
- Goettel M. S., Roberts D. W., 1991: Mass production, formulation and field application of entomopathogenic fungi. In: *Biological Control of locusts and grasshoppers. Proceedings of a workshop held at the International Institute of Tropical Agriculture, Cotonou, Republic of Benin, 29 April – 1 May 1991*, 230 – 238.
- Goettel M. S., 1992: Fungal agents for biocontrol. In: Lomer J. C., Prior C., (Eds.): *Biological Control of Locusts and Grasshoppers*. CAB International, Wallingord, UK, 122 – 132.
- Goettel M. S., Ignis 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.
- Gopalakrishnan C., Anusuya D., Narayanan K., 1999: In vitro production of conidia of entomopathogenic fungus *Paecilomyces farinosus* (Holmskiöld) Brown and Smith. *Entomon*, 24, 4: 389 – 392:
- Gottwald T. R., Tedders W. L., 1982: Study on the conidia release by the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina, Hyphomycetes) from adult pecan weevil (Coleoptera, Curculionidae) cadavers. *Environmental Entomology*, 11: 1274 – 1279.
- Grajek W., 1994: Sporogenesis of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* in solidstate cultures. *Folia-Microbiologica*. 39, 1: 29 – 32.

- Grimm C., 2001: Economic feasibility of a small-scale production plant for entomopathogenic fungi in Nicaragua. *Crop-Protection*, 20 (7): 623 – 630.
- Hall R. A., 1980: Effects of repeated subculturing on agar and passaging through an insect host on pathogenity and growth rate of *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 36: 216 – 222.
- Hall R. A., 1981: The Fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. In: Burges H. D., (Eds.): *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970 – 1980*. Academic Press, London, 483 – 498.
- Hayden T. P., Bidochka M. J., Khachatourians G. G., 1992: Entomopathogenicity of several fungi toward the english grain aphid (Homoptera, Aphididae) and enhancement of virulence with host passage of *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Economic Entomology*, 85 (1): 58 – 64.
- Hirte W. F., Glathe I., Adam H., 1989: Production and application of microbial preparation with *Aschersonia* spores. *Zentrallbl. Microbiol.*, 144: 155 – 162.
- Hrdý I., a kolektiv, 1991: *Biopesticidy v zemědělství*. Praha, květen 1991, 40 – 41.
- Humber R. A., 1997: Fungi – Identification. In: Lacey L. A. (Eds.): *Manual of Techniques in Insect Patology*, Academic Press, Chapter III.: 153 – 185.
- Charnley A. K., 1984: Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: A spekulative rewiev, 229 – 270, In: Anderson J. M., Rayner A. D. M., Walton D. W. H., (Eds.): *Invertebrate – Microbial Interactions*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Ibrahim Y. B., Low W., 1993: Potential of mass-production and field efficacy of isolates of the entomopatogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecylomyces fumosoroseus* against *Plutella xylostella*. *International Journal of Pest-Management*. 39,3: 288 – 292.
- Ignis G. D., Goettel M. S., Butt T. M., Strasser H., 2001: Use of hyphomycetes fungi for managing insect pests. In: Butt T. M., Jackson C., Magan N. (Eds): *Fungi as biocontrol agents – progress, problems and potential*. CAB International, Wallingford, UK, 23 – 69.
- Inglish G. D., Goettel M. S., Butt T. M., Strasser H., 2001: Use of Hyphomycetes fungi for manging Insect Pests. In: Butt T. M., Jackson C., Magan N., (Eds.): *Fungi as biocontrol agents – progress, problems and potential*. CABI Publishing, 23 – 69.
- Jenkins N. E., Grzywacz D., 2000: Quality control of fungal and viral biocontrol agents – assurance of product perfomance. *Biocontrol Science and Technology*, 10: 753 – 777.
- Landa Z., 1983: Metodika využití houby *V. lecanii* (Zimm.) VIEGAS, Sborník konference ochrany rostlin, 72 – 77.
- Landa Z., Jegorov A., Mařha V., Novák J., 1989: Light induced production of carotenoids by the entomogenous fungus *Aschersonia aleirodis*. *Proc. Conf. „Biopesticides theory and practice“*, September 25. – 28. 1989, České Budějovice, 110 – 119.
- Landa Z., 1992: *Entomopatogenní houby v biologické ochraně rostlin (habilitační práce)*. ZF JU, České Budějovice, 14 – 50.
- Landa Z., 1998: *Biopreparáty a bázi entomopatogenních hub*, ZF JU, České Budějovice, Agro, 4, 10: 7 – 12.
- Landa Z., 2002: Biologická ochrana zahradních rostlin proti chorobám a škůdcům v polních plodinách, ve sklenicích a fóliovnících. In: Demo M., Hrušovský I. (Eds): *Trvalo udržatelné technologie v zahradnictví*. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 225 – 280.
- Lopez E. V., Chavarria H. N., Fernandez S. P., Torre M., 2000: Fermentation processes for bioinsecticide production – An overview. *Recent Research Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 3: 1 – 20.

- Malsam O., Kilian M., Oerke E. C., Dehne H. W., 2002: Oils for Increased Efficacy of *Metarhizium anisopliae* to Control Whiteflies. *Biocontrol Science and Technology*, 12: 337 – 348.
- Markova G. R. Chr., 1987: Studie entomopatogenních deuteromycet použitelných v boji s lesními škůdci (kandidátská disertační práce). Entomologický ústav ČSAV, České Budějovice, 1987
- McCoy C. W., Samson R. A., Boucias D. H., 1988: Entomogenous fungii, 151 – 236. In: Ignoffo C. M., (Ed.) *CRC Handbook of Natural Pesticides*. CRC Press, Boca Raton, Vol. 5., A.
- Meekes E. T. M., Fransen J. J., Van Lenteren J. C., 2002: Pathogenicity of *Aschersonia* spp. Against whiteflies *Bemisia argentifolii* and *Trialeurodes vaporariorum*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 81: 1 – 11.
- Menn J. J., Hall F. R., 1999: Biopesticides – Present status and future prospects. In: *Methods in biotechnology*, Vol. 5: *Biopesticides – Use and delivery*. In: Hall F. R., Menn J. J., (Eds.): Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1: 1 – 10.
- Milner R. J., Staples J. A., Lutton G. G., 1997: The effect of humidity of germination and infection of termites by the hyphomycete, *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 69 (1): 64 – 69.
- Nagaich B. B., 1993: *Verticillium* species pathogenic on aphids. *Indian Journal of Phytopathology*, 26: 135 – 165.
- Neale M., Newton P., 1999: Registration – regulatory requirements in Europe. In: *Methods in Biotechnology*, Vol. 5: *Biopesticides – Use and delivery*. Hall F. R., Menn J. J., (Eds.): Humana Press Inc., Totowa, NJ, 24: 453 – 471.
- Osborne L. S., Landa Z., 1992: Biological control of Whiteflies with entomopathogenic fungi. *Florida Entomology*, 75 (4): 456 – 471.
- Papierok B., Hajek A. E., 1999: Entomophthorales. In: Lacey L. A. (Eds.): *Manual of Techniques in Insect pathology*, Academic Press, Chapter V – 2: 188 – 212.
- Pell J. K., Eilenberg J., Hajek A. E., Steinraus D. C., 2001: Biology, Ecology and Pest Management Potential of Entomophthorales. In: Buff, T. M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.): *Fungi as biocontrol agents – progress, problems and potential*. CABI Publishing, 71 – 153.
- Pereira R. M., Roberts D. W., 1991: Alginate and cornstarch mycelial formulations of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Economic Entomology*, 84 (6): 1657 – 1661.
- Petch T., 1921: Studies in entomogenous fungi, II. The genera *Hypocrella* and *Aschersonia*. *Royal Botanical Garden, Peradeniya Annals*, 7: 167 – 278.
- Poprawski T. J., Greenberg S. M., Ciomperlik M. A., 2000: Effect of host plant on *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* induced mortality of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera, Aleyrodidae). *Environmental Entomology*, 29 (5): 1048 – 1053.
- Poprawski T. J., Jones W. J., 2001: Host plant effects on activity of the mycosporic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* against two populations of *Bemisia* whiteflies (Homoptera, Aleyrodidae). *Mycopathologia*, 151: 11 – 20.
- Prior C., Jollands P., Lepatourel G., 1988: Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina, Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Platyedra pluvialis* (Coleoptera, Curculionidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 52 (1): 66 – 72.
- Procenko E. P., 1967: Griby z rody *Aschersonia* Sb. Kar. Rastenij, Kolos, 19: 147 – 215.

- Rani O.P.R., Susamma-Mathai S., 1999: Mass production of entomogenous fungus *Fusarium pallidorozeum* (Cooke) Sacc in naturally available solid and liquid media. *Insect Environment*, 5 (2): 59 – 60.
- Rod J., Hluchý M., Zavadil K., Prášil J., Somssich I., Zacharda M., 2005: *Obrazový atlas chorob a škůdců zeleniny střední Evropy*. Biocont laboratory, s.r.o., Brno, 392.
- Samson R. A., Rombach M. C., 1985: Biology of the fungi *Verticillium* and *Aschersonia*. In: Hussey N. W., Scopes N., (Eds.): *Biological pest control – the Glasshouse experience*. Cornell University Press, Ithaca, New York, 34 – 42.
- Samšišňáková A., Kálalová S., Vlček V., Kybal j., 1981: Mass production of *Beauveria bassiana* for regulation of *Leptinotarsa decemlineata* populations. *J. Invert. Pathology*, 38: 169 – 174.
- 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. *Journal of Invertebrate Pathology*, 69:31 – 39.
- Steinhouse E. A., 1958: Stress as a factor in insect disease. *Proceedings International Congress of Entomology, Tenth Congress (Montreal)*, 4: 725 – 730.
- Storey G. K., Gardner W. A., Tollener E. W., 1989: Penetration and persistence of commercially formulated *Beauveria bassiana* conidia and soil of two tillage systems. *Environmental Entomology*, 18 (5): 835 – 839.
- Studdert J. P., Kaya H. K., 1990: Water potential, temperature, and soil type on the formation of *Beauveria bassiana* soil colonies. *Journal of Invertebrate Pathology*, 56 (3): 380 – 386.
- Schwarz A., Etter J., Kunzler R., Potter C., Rauchenstein H. R., 1996: *Obrazový atlas chorob a škůdců zeleniny*. Biocont laboratory, Brno, 1996
- Tanada Y., Kaya H. K., 1993: Fungl infections, 319 – 387. In: Tanada Y., Kaya H.K., (Eds.). *Insect Patology*, Academic Press Inc. California & Academic Press Limited London.
- Tarrant C. A., Soper R., 1986: Evidence for the vertical transmission of *Coelomyxidum simuluj* (Myceteae (Fungi): Chytridiomycetes), 212. In: Samson R. A., Vlček J. M., Peters D., (Eds.). *Fundamentals and Applied Aspects of Invertebrate Patology*. Found 4th. Int. Colloq. Inverteb. Patology , Wageningen, Netherland.
- Vänninen I., a kolektiv, 1995: Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type. *Mycol. Res.* 100 (1): 93 – 101.
- Veen K. H., 1968: *Recherches sur la malárie due á Metarhizium anisopliae chez le criquet peleris*. Thése présentée á l'Univ. Agronom. de Wageningen.
- Vega F. E., Dowd P. F., McGuire M. R., Jackson M. A., Nelsen T. C., 1997: In vitro effects of secondary plant compounds on germination of blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Journal of Invertebrate Pathology*, 70 (3): 209 – 213.
- Vestergaard S., Butt T. M., Gillespie A. T., Schreiter G., Eilenberg J., 1995: Pathogenicity of the hyphomycetes fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae* to the western flower thrips. *Frankliniella occidentalis*. *Biocontrol Science*
- Vestergaard S., Butt T. M., Bresciani J., Gillespie A. T., Eilenberg J., 1999: Light and Electron Microscopy Studies of the Infection of the Western Flower Thrips *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera, Thripidae) by the entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 7: 25 – 33.
- Vidal C., Lacey L. A., Fargue J., 1997a: Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina, Hyphomycetes) against *Bemisia argentifolii* (Homoptera, Aleyrodidae) with a description of a bioassay method. *Journal of Economic Entomology*, 90 (3): 765 – 772.

- Vidal C., Fargue J., Lacey L. A., 1997b: Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: Effect of temperature on vegetative growth. *Journal of Invertebrate Pathology*, 70 (1): 18 – 26.
- Vilcinskas A., Götz P., 1999: Parasitic fungi and their Interactions with the Insect Immune System, Institute of Zoology, Free University of Berlin, Königin-Luise, Germany, 270 – 274.
- Vyas R. V., Yadav D. N., Patel R. J., 1991: Mass production of entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii* on solid substrates. *Indian Journal of Experimental Biology*, 29 (8): 795 – 797.
- Weiser J., 1966: Nemoci hmyzu. ČSAV, 1966, Praha, 232 – 324.
- Weiser J., 1991: Mikrobiální insekticidy, 30 – 43, In: Hrdý, I., (Eds.). *Biopesticidy v zemědělství*. MZ ČR, Praha.
- Wraight S. P., Butt T. M., Galaini-Wraight S., Alee L. L., Soper R. S., Roberts D. W., 1990: Germination and infection processes of the entomophthoralean fungus *Erynia radicans* on the potato leafhopper. *Empoasca fabae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 56: 157 – 174.
- Wright S. P., Carruthers R., 1999: Production, Delivery and Use of Mycoinsecticides for control of Insect Pests in field Crops. In: *Biopesticides – use and delivery*. Hall F. R., Menn J. J., (Eds.): Humana Press, Totowa, New Jersey, 233 – 270.
- Zídek T., Lokaj Z., Moudrý J., Rozsypal R., Rusek J., Veselý D., 1992: *Mechanická ochrana rostlin*. MZ ČR Praha, 100.

8. PŘÍLOHA - fotodokumentace

Příloha č. 1: Fotodokumentace zařízení použitého pro kultivaci jednotlivých kmenů entomopatogenních hub. Byla použita třepačka firmy Kühner SHAKER, která umožňovala jak orbitální tak i lineární pohyb třepání, frekvenci třepání v rozsahu 20 – 500 otáček za minutu a také třepání několika desítek vzorků na jednou o různých objemech.



Příloha č. 2: Fotodokumentace ke studiím zaměřeným na produkci blastospor kmenů Bba PM původní a Bba 01 entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* na tekutých živných půdách SA, YM, MEB, PDB a SL.



B. bassiana – kmen Bba PM původní



B. bassiana – kmen Bba 01

Příloha č. 3: Fotodokumentace ke studii zaměřené na produkci blastospor kmene M192 entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae* na tekutých živných půdách SA, YM, MEB, PDB a SL, při rychlosti třepání 150 a 250ot./min.



Metarhizium anisopliae – kmen M192, 150 ot./min.



Metarhizium anisopliae – kmen M192, 250 ot./min.

Příloha č. 4: Fotodokumentace ke studii zaměřené na produkci blastospor kmene I9 entomopatogenní houby *Lecanicillium lecanii* na tekutých živných půdách SA, YM, MEB, PDB a SL, při rychlosti třepání 150 a 250 ot./min.



Lecanicillium lecanii – I9, 150 ot./min.



Lecanicillium lecanii – I9, 250 ot./min.