



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Katedra rostlinné výroby

Diplomová práce

Kompatibilita vybraných druhů entomopatogenních hub a
mykoparazitických hub s fytopatogenními druhy hub

Autor práce: Bc. David Drtina

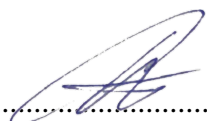
Vedoucí práce: Ing. Andrea Bohatá, Ph.D.

České Budějovice 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 14. 8. 2024


.....
Podpis

Abstrakt

Entomopatogenní a mykoparazitické houby jsou využívány v rámci biologické ochrany rostlin po celém světě. Entomopatogenní houby jsou určeny pro regulaci populací škůdců a mykoparazitické houby pro potlačení původců onemocnění rostlin. Diplomová práce je zaměřena na hodnocení kompatibility resp. účinnosti těchto užitečných druhů hub s vybranými fytopatogeny, s cílem vyhodnotit jejich vzájemné vztahy. Během experimentů byl potvrzen mykoparazitismus mezi mykoparazitickými druhy a fytopatogenními druhy hub. Kmeny *Trichoderma* spp. vykazaly různou míru intenzity mykoparazitismu na vybraných fytopatogenních druzích. Druhy/kmeny *Trichoderma* spp. svým růstem rychleji osidlují niku, tím potlačují růst fytopatogenních druhů hub, čímž snižují jejich životní prostor. Jedná se zejména o prostorovou kompetici. V rámci experimentů byla testována i vzájemná kompatibilita mezi entomopatogenními a fytopatogenními druhy hub. Z výsledků plyne, že entomopatogenní houby hrají výraznou roli v potlačení původců onemocnění rostlin, díky prokázanému antagonistickému efektu. Entomopatogenní houby výrazně inhibovaly růst fytopatogenů. Druhy *B. bassiana* a *I. fumosorosea* redukovaly produkci tvorby spor resp. infekčních propagulí fytopatogenních druhů hub. Entomopatogenní houby mají výrazný potenciál v biologické ochraně proti původcům onemocnění rostlin. Vedle jejich primárního účinku na škůdce vykazují výrazný sekundární efekt na růst a vývoj fytopatogenů.

Klíčová slova: biologická ochrana, mykoparazitické houby, entomopatogenní houby, patogeny rostlin, kompatibilita, mykoparazitismus, antagonismus

Abstract

Entomopathogenic and mycoparasitic fungi are used worldwide in biological control. Entomopathogenic fungi are used to control pest populations and mycoparasitic fungi to suppress pathogens that can attack plants and cause diseases. Diploma thesis is focused on the evaluation of the compatibility or efficacy of beneficial fungal species with selected phytopathogens, with the aim of evaluating their interrelationships. Mycoparasitism between mycoparasitic species and phytopathogenic fungal species was confirmed during the experiments. *Trichoderma* spp. strains showed different levels of mycoparasitism intensity on selected phytopathogenic species. The species/strains of *Trichoderma* spp. colonized the niches faster by their growth, thereby suppressing the growth of phytopathogenic fungal species, thereby reducing their living space. This is mainly a spatial competition. The experiments also tested the mutual compatibility between entomopathogenic and phytopathogenic fungal species. The results showed that entomopathogenic fungi play a significant role in the suppression of plant pathogens, due to their proven antagonistic effect. Entomopathogenic fungi significantly inhibited the growth of phytopathogens. Species of *B. bassiana* and *I. fumosorosea* reduced the production of spore formation and infective propagules of phytopathogenic fungal species, respectively. Entomopathogenic fungi have significant potential in biological control of plant pathogens. In addition to their primary effect on pests, they have a significant secondary effect on the growth and development of phytopathogens.

Keywords: biological control, mycoparasitic and entomopathogenic fungi, pathogens plant pathogens, compatibility, mycoparasitism, antagonisms

Poděkování

Chtěl bych poděkovat především Ing. Andree Bohaté, Ph.D. a Ing. Janě Lencové za čas, který mi při zpracování práce poskytovaly, za jejich odborné rady a obrovskou ochotu. Poděkovat bych chtěl i svojí manželce Ivaně, za její podporu během mého studia.

Obsah

| | |
|--|----|
| Úvod..... | 9 |
| 1 Mykoparazitické houby..... | 11 |
| 1.1 Mykoparazitismus | 12 |
| 1.2 Kompetice | 13 |
| 1.3 Antibióza | 13 |
| 2 Druhy mykoparazitických hub..... | 14 |
| 2.1 <i>Trichoderma</i> spp..... | 14 |
| 2.2 <i>Coniothyrium minitans</i> | 15 |
| 2.3 <i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i> | 16 |
| 3 Entomopatogenní houby | 17 |
| 4 Druhy entomopatogenních hub | 19 |
| 4.1 <i>Akanthomyces attenuatus</i> | 19 |
| 4.2 <i>Beauveria bassiana</i> | 20 |
| 4.3 <i>Isaria fumosorosea</i> | 21 |
| 4.4 <i>Metarhizium</i> spp..... | 21 |
| 5 Fytopatogenní houby..... | 24 |
| 6 Materiál a metodika..... | 26 |
| 6.1 Druhy entomopatogenních hub | 26 |
| 6.1.1 <i>Isaria fumosorosea</i> | 26 |
| 6.1.2 <i>Beauveria bassiana</i> | 26 |
| 6.1.3 <i>Akanthomyces attenuatus</i> | 26 |
| 6.1.4 <i>Metarhizium brunneum</i> | 27 |
| 6.2 Druhy mykoparazitických hub | 27 |
| 6.2.1 <i>Trichoderma virens</i> | 27 |
| 6.2.2 <i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i> | 27 |

| | | |
|--------|--|----|
| 6.2.3 | <i>Coniothyrium minitans</i> | 27 |
| 6.3 | Testované druhy fytopatogenní hub | 28 |
| 6.4 | Kultivace matečných kultur a příprava suspenzí..... | 29 |
| 6.4.1 | Morfologické markery u mykoparazitických hub | 30 |
| 6.4.2 | Příprava středových kultur | 30 |
| 6.4.3 | Radiální růst | 30 |
| 6.4.4 | Výtěžnost spor hub..... | 31 |
| 6.4.5 | Interakční testy mezi mykoparazitickými houbami a fytopatogenními druhy hub | 31 |
| 6.4.6 | Interakční testy mezi enomopatogenními houbami a fytopatogenními druhy hub | 31 |
| 6.4.7 | Založení interakčních testů | 31 |
| 6.4.8 | Duální test | 32 |
| 6.4.9 | Test 4 kultury | 33 |
| 6.4.10 | Počet sklerocií | 35 |
| 6.4.11 | Coloni forming units (CFU)..... | 35 |
| 6.4.12 | Statistika..... | 35 |
| 7 | Experimentální část a výsledky..... | 36 |
| 7.1 | Charakteristika růstu a vývoje vybraných druhů původců onemocnění rostlin 37 | |
| 7.2 | Interakce entomopatogenních hub s fytopatogenními druhy | 39 |
| 7.2.1 | Inhibice růstu fytopatogenních druhů hub | 40 |
| 7.3 | Hodnocení kompatibility entomopatogenními houbami, mykoparazitickou houbou <i>C. minitans</i> a fytopatogenní houbou <i>S. sclerotiorum</i> pomocí testu CFU . | 57 |
| 7.4 | Interakce mezi mykoparazitickými a fytopatogenními druhy hub..... | 60 |
| 8 | Diskuse..... | 65 |
| | Závěr | 69 |
| | Seznam použité literatury..... | 71 |

| | |
|------------------------------|----|
| Seznam obrázků | 78 |
| Seznam tabulek | 79 |
| Seznam grafů..... | 81 |
| Seznam použitých zkratk..... | 83 |

Úvod

Choroby rostlin působí celosvětově ztráty na výnosech ve výši cca 16 % (Oerke 2006). Většinou se choroby potlačují preventivně, nebo kurativně pomocí chemických látek. Nevýhoda chemické ochrany rostlin je vyšší selekční tlak na patogeny způsobující onemocnění rostlin, jejich úbytek v ekosystému a následnému přežívání patogenů s vytvořenými rezistencemi vůči chemickým účinným látkám.

Biologická ochrana rostlin představuje komplexní přístup k potlačování škůdců a patogenů rostlin, který využívá přirozených nepřátel škůdců, parazitů, patogenů a dalších biologických agens. Na rozdíl od chemické ochrany se biologická ochrana zaměřuje na dlouhodobou udržitelnost a minimalizaci dopadů na životní prostředí. Díky různým studiím máme v současné době hlubší znalosti o interakcích mezi rostlinami, škůdci a jejich přirozenými nepřáteli (Haverkort et al. 2009).

Mechanismy biologické ochrany jsou následující, při použití bioagens:

1. Predace - přirození predátoři se živí škůdci a tím snižují jejich populaci.
2. Parazitismus - parazitický hmyz klade vajíčka do hostitelů, jejichž larvy se poté živí hostitelem a způsobují jeho smrt.
3. Patogeny - entomopatogenní houby, entomopatogenní bakterie, entomopatogenní hád'átka a entomopatogenní viry, mohou infikovat a následně zabít hostitele, škůdce. Mykoparazitické a antagonistické houby, antagonistické bakterie mohou ovlivňovat vývoj patogenů způsobující onemocnění rostlin a způsobovat kolaps těchto fytopatogenů.
4. Konkurence - prospěšné mikroorganismy mohou konkurovat patogenům o živiny a prostor, čímž omezují jejich růst a šíření.
5. Indukovaná systémová rezistence - některé mikroorganismy mohou stimulovat rostliny k produkci obranných látek, které zvyšují jejich odolnost vůči patogenům a škůdcům (Van Loon et al. 2006).

Mezi nevýhody biologické ochrany patří delší doba účinku, která je delší než při použití chemické ochrany rostlin. Účinnost biologické ochrany může být nižší než při použití pesticidů, zejména v období, kdy je během vegetace u dané rostliny vysoký počet škůdců nebo vysoký tlak původců onemocnění rostlin.

Účinek bioagens může být ovlivněn různými environmentálními faktory, jako je teplota, vlhkost, sluneční svit, popřípadě dostupnost potravy pro predátory nebo dostupnost hostitelů jakožto nutriční zdroj. Někteří škůdci si mohou vyvinout rezistenci vůči biologickým bioagens podobně jako u chemických pesticidů. Toto se může odehrávat zejména u mikroorganismů (Gourlay 2018). Aby byla aplikace biologické ochrany úspěšná, vyžaduje hluboké znalosti o interakcích mezi škůdci resp. původci onemocnění rostlin, jejich přirozenými nepřáteli a okolním prostředím. V některých případech mohou být počáteční náklady na biologickou ochranu vyšší než u chemické ochrany. Nicméně v čase může použití biologické ochrany rostlin navodit v prostředí supresivní podmínky, které budou samovolně regulovat populace škůdců nebo zdroje inokula fytopatogenů.

Diplomová práce se zabývá vzájemnými interakcemi mezi entomopatogenními nebo mykoparazitickými houbami a patogeny způsobujícími houbová onemocnění rostlin.

1 Mykoparazitické houby

Jde o druhy hub, které získávají živiny z jiných hub. V souvislosti s biologickou ochranou rostlin je důležitý vztah mezi mykoparazitickými houbami a houbovými fytopatogeny. Mykoparazitické houby mají vliv na následný vývoj fytopatogenních hub jako je růst mycelia, popřípadě tvorba haustorií a sporulace (Prahl et al. 2023). Mezi těmito druhy hub jde o komplexní proces, který vyžaduje rozpoznání hostitele a následné ovíjení hyf kolem fytopatogenu, produkci molekul jako jsou hydrolázy, a tvorbu sekundárních metabolitů a antibiotik k degradaci a usmrcení patogenní houby (Mukherjee et al 2022).

Mezi významné mykoparazitické houby patří houby rodu *Trichoderma* spp., které se běžně vyskytují v přírodě, mají rychlý růst a jsou tolerantní k prostředí, ve kterém žijí, ať už se jedná o různé složky v substrátech nebo různé kontaminanty vyskytující se v půdě (Mishra et al. 2016). Ve svém vztahu s rostlinou se mohou mykoparazitické houby chovat i jako endofyt, který obklopuje pouze svrchní vrstvu kořenové soustavy a rostlina díky obranné reakci vyvolané například kyselinou salicylovou zabrání *Trichoderma* spp. proniknout hlouběji do cévních svazků, kde by mohla způsobit jejich ucpávání, a tím negativně na rostlinu působit (Poveda et al. 2021).

Mezi další mykoparazitické houby můžeme zařadit druhy *Clonostachys rosea* f. sp. *rosea* nebo *Clonostachys rosea* f. sp. *catenulata*, které parazitují například na houbách rodu *Alternaria* spp., *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, nebo *Sclerotinia sclerotiorum* (Rodriguez et al. 2011).

Houba *Coniothyrium minitans* je specializovaný mykoparazit patogenu *Sclerotinia sclerotiorum* (Zhao et al. 2020).

Mykoparazitické houby hrají velkou roli v konceptu udržitelného zemědělství. Jejich role v kontrole rostlinných patogenů může být alternativou k chemickým pesticidům. Některé z nich, zejména pak druhy rodu *Trichoderma* spp. vykazují vysokou účinnost při snižování inokula patogenů způsobujících choroby rostlin. Zároveň produkcí sekundárních metabolitů indukují obranu rostlin a systémovou rezistenci. Mezi mechanismus účinku mykoparazitických hub patří kompetice, antibióza a mykoparazitismus.

1.1 Mykoparazitismus

Houby si vyvinuly různé strategie pro získávání živin. Některé z nich používají interakci s jinými živými organismy. Tyto interakce - vztahy, které jim pomáhají získávat živiny, mohou být mutualistické, komenzální, nebo parazitické. V rámci interakce mezi organismy se mohou tyto vztahy v čase měnit. Houby interagují s obrovskou škálou hostitelů, včetně jiných hub.

Mykoparazitismus je antagonistický vztah mezi houbami a jde o druh parazitické interakce. V současné době je mykoparazitismus popsán u velké škály druhů náležejících do různých oddělení *Rozellomycota*, *Blastocladiomycota*, *Zoopagomycota*, *Mortierellomycota*, *Kickxellomycota*, *Mucoromycota*, *Chytridiomycota*, *Ascomycota*, a *Basidiomycota* (Naranjo-Ortiz & Gabaldón 2019).

Mykoparazitická houba parazituje hostitelskou houbu v místech, jako jsou aktivně rostoucí hyfy, případně i na klidových strukturách jako jsou sklerocia (Mukherjee et al. 2022). Mykoparazitismus je komplexní jev, který zahrnuje celou řadu procesů od rozpoznání hostitele, adheze k jeho strukturám, proniknutí do hostitele a následný parazitismus.

Tento vztah mezi parazitem a hostitelem může být biotrofní, kdy mykoparazit získává potřebné živiny z živého hostitele, tento vztah může být i nějakou dobu neutrální. Biotrofní mykoparazitismus je složitý, a pro tento neutrální vztah mezi organismy nepoužívá jako bioagens. Dalším problémem je neschopnost biotrofního mykoparazita produkovat v řízených podmínkách na alternativních hostitelích a úzká specializace na konkrétního hostitele znevýhodňuje jejich komerčního využití, ekonomicky by se taková produkce nevyplatila.

Předmětem zkoumání mykoparazita pro využití jako bioagens je zejména vztah nekrotrofní. Nekrotrofní vztah mezi mykoparazitem a hostitelem je pro hostitele destruktivní a nekrotrofní mykoparazité mají širší hostitelské spektrum různých houbových patogenů rostlin (Jing & Liang 2016).

Mykoparazité jako jsou houby *Trichoderma* spp., nebo *Clonostachys rosea* f. sp. *rosea* nebo *Clonostachys rosea* f. sp. *catenulata* jsou antagonisté jiných hub. Také jsou schopny usadit se a kolonizovat rhizosféru a kořeny rostlin. Tato kolonizace je pro rostlinu prospěšná a zvyšuje její obranyschopnost proti různým stresům a stimuluje růst rostlin.

1.2 Kompetice

Parazité inhubují patogena několika způsoby. Jedním z nich je kompetice. V tomto případě se jedná o intraspecifickou kompetici. Ta je založena na kompetici mezi bioagens stejného druhu, dochází tedy k boji o potravu, prostor nebo možnost rozmnožování (Murdoch et al., 2000). Tento způsob použití bioagens je spíše profylaktický (Andrews 1992). Houby *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, nebo *T. pleuroti* mohou inhibovat růst mycelia patogenů jako je *Sclerotinia sclerotiorum* nebo *Fusarium oxysporum* (Rajani et al. 2021) a to právě díky vzájemné kompetici. Houby rodu *Trichoderma* jsou pro svůj rychlý růst a vývoj velice dobrými a agresivními konkurenty. Umí rychle kolonizovat substrát a pomaleji rostoucí fytopatogen přichází velice rychle o své zdroje potravy a zároveň o prostor, a tím se fytopatogen nemůže více vyvíjet. Má tedy lepší schopnost mobilizovat a absorbovat živiny z půdy ve srovnání s jinými fytopatogenními mikroorganismy v rhizosféře (Tsavkelova et al. 2005, Baker & Cook 1974).

1.3 Antibióza

Dalším způsobem jakým mykoparazitické houby potlačují růst a vývoj patogenů je antibióza. Některé mykoparazitické houby produkují antimikrobiální látky, které přímo potlačují růst nebo zabíjejí jiné mikroorganismy. Tyto látky jsou nazývané jako antibiotika. Liší se v mechanismu účinku a spektru aktivity. Při antibióze mykoparazit produkuje sekundární metabolity, které mají inhibiční účinek na růst, popřípadě smrtící účinek na tyto fytopatogeny. Houby rodu *Trichoderma* spp. produkují antibiotické látky jako je peptaibol, polyketide a terpen (Hu et al. 2017). *Trichoderma koningii* například syntetizuje látku koninginin D, jejíž přítomnost významně inhibuje růst patogenů jako je *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium middletonii*, *Fusarium oxysporum*, nebo *Bipolaris sorokiniana* (Dunlop et al. 1989). Podobně třeba kyselina harzianic, kterou produkuje *T. harzianum* vykazuje vysokou antibiotickou aktivitu pro *Pythium irregulare*, *Sclerotinia sclerotiorum* nebo *Rhizoctonia solani* (Manganiello et al. 2018).

2 Druhy mykoparazitických hub

2.1 *Trichoderma* spp.

Houby rodu *Trichoderma* náleží do řádu *Hypocreales*, čeledi *Hypocreaceae*. Jde o kosmopolitní druhy hub, které se běžně vyskytují v půdě a na rozkládajícím se organickém materiálu (Jash & Pan 2008). *Trichoderma* spp. jsou známé svými antagonistickými vlastnostmi proti široké škále fytopatogenních druhů hub a bakterií. Mimo to také urychlují rozklad organického materiálu v půdě a mají schopnost detoxikace toxických látek v substrátu (Vázquez et al. 2015).

Druhy *Trichoderma* spp. se rozmnožují jak pohlavně, tak i nepohlavně. Teleomorfy (pohlavní rozmnožování) náleží do rodu *Hypocrea* a anamorfy (nepohlavní rozmnožování) do rodu *Trichoderma*. Nepohlavní rozmnožování začíná tvorbou konidií, což jsou haploidní spory, které se tvoří na konidioforech. Konidie se snadno šíří větrem a vodou a mohou klíčit a vytvářet nové mycelium. Na myceliu se tvoří opět sporulační struktury, na kterých se vyvíjejí konidie dalších generací. Pro druhy hub rodu *Trichoderma* je charakteristická zelená barva. Pohlavní rozmnožování spočívá v tom, že se dvě mycelia spojí a vytvoří gametangia. V gametangiích se tvoří gamety, které splynou a vytvoří zygotu. Zygota se vyvíjí v ascokarp, což je plodnice obsahující askospory. Askospory jsou diploidní spory, ze kterých se vyvíjí opět mycelium.

Trichoderma spp. produkují širokou škálu antimykotických a antibakteriálních látek, které potlačují růst a vývoj patogenů. *Trichodermin* je antibiotikum s širokospektrálním účinkem a ten působí proti různým druhům hub a bakterií (Vinale et al., 2020). *Harzianin* je molekula s antifungální aktivitou a působí proti patogenům rostlin (Reino et al., 2018). *Gliotoxin* je toxin s antifungální a antibakteriální aktivitou (Li et al., 2019). *Efraeptiny* jsou cyklické peptidy s antifungální aktivitou proti patogenům rostlin (Helmy & Parang, 2023). Tyto látky narušují buněčnou stěnu fytopatogenů, inhibují syntézu proteinů a poškozují buněčné membrány (Viterbo et al. 2002, Chet et al. 1998). *Trichoderma* spp. jsou aktivními konkurenty v půdě. Rychle rostou, vytváří rozsáhlé mycelium, čímž přijímají velké množství živin a snižují dostupnost živin pro fytopatogeny. Rychlým růstem obsazují niku (Tsavkelova et al. 2005). V přítomnosti fytopatogenů se hyfy hub rodu *Trichoderma* spp. přichytávají k jejich hyfám. Vylučují enzymy, převážně chitinázy, které rozkládají chitin, hlavní složku buněčné stěny hub, glukonázy, které rozkládají glukany a proteázy. Poté proniknou skrz buněčnou stěnu

do patogenní houby. Zároveň *Trichoderma* spp. pomocí enzymů a sekundárních metabolitů, které produkují a vylučují je do těla hostitele, hostitele rozkládají, a tím z jeho rozkládajících se buněčných stěn absorbují živiny (Schuster & Schmoll 2010). Mezi nejvýznamnější druhy patří houba *Trichoderma harzianum*, která parazituje na široké škále fytopatogenních hub, včetně *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* a *Sclerotinia sclerotiorum*. Dále druh *Trichoderma virens*, který parazituje na předchozích fytopatogenech, dále pak i na *Botrytis cinerea*. *Trichoderma atroviride* parazitující dále i na *Pythium* spp. Mykoparazitické a antagonistické vlastnosti *Trichoderma* spp. hrají důležitou roli v regulaci populací patogenů v půdě. Tyto vlastnosti se také využívají v biologické ochraně rostlin (Viterbo et al. 2007).

Na světě je registrováno velké množství biopreparátů na bázi těchto hub. *Trichoderma* spp. se aplikují na půdu ve formě suspenze nebo se do půdních substrátů zamíchávají granule obsahující spory daného druhu/kmene houby. Aplikace do substrátu je prováděna převážně preventivně. Kurativně se *Trichoderma* spp. aplikují ve formě suspenze na rostliny, na které pak potlačují růst a vývoj patogenů a chrání tak rostliny před onemocněním. Druhy *Trichoderma* spp. zároveň stimulují růst rostlin a zvyšují jejich odolnost vůči stresu. Mimo to také pomáhají rozkládat organický materiál a zlepšují úrodnost půd. Kolonie *Trichoderma* spp. jsou zelené, stupeň zbarvení koreluje se sporulací (Viterbo et al. 2007, Tsavkelova et al. 2005).

2.2 *Coniothyrium minitans*

Tento druh byl izolován vědcem Cambellem poprvé v roce 1947 v USA ze sklerocií houby *Sclerotinia sclerotiorum*. Následně byl výskyt tohoto druhu potvrzen po celém světě kromě Antarktidy (Bennett et al. 2006; Sandys-Winsch et al. 1993.; Whipps & Gerlagh 1992). *Coniothyrium minitans* má dominantní zastoupení v regulaci patogenu *S. sclerotiorum* v rámci biologické ochrany rostlin (Yang et al. 2007, 2007).

Mykoparazitická houba *C. minitans* infikuje sklerocia dalších druhů rodu *Sclerotinia*, zejména pak *S. trifolium*, *S. minor* a *S. cepivorum* (Chitrampalam et al. 2010; Whipps & Gerlagh 1992). Výzkum probíhá i na sledování účinnosti *C. minitans* na další patogeny, zejména *Botrytis cinerea*. Bylo prokázáno, že tento mykoparazit je schopen infikovat sklerocia *B. cinerea* (Gerlagh et al. 1996). Na parazitovaných sklerociích je mykoparazit přežít v půdě i několik let a zároveň je schopen v půdě přežít na posklizňových zbytcích, protože se jedná o saprofyta (Bennett et al. 2006). Po napa-

dení hostitele vytváří *C. minitans* se nejprve slabé mycelium na kterém se později formují povrchové pyknidy. Na umělých živných půdách vytváří houba zprvu bílé, později světle hnědé mycelium a po plné sporulaci je kultura tmavě hnědá až černá, což koreluje i s produkcí pyknospor (Jones & Stewart 2000).

2.3 *Clonostachys rosea* f. *catenulata*

Je široce polyfágní druh mykoparazitické houby, která parazituje na houbových původcích onemocnění rostlin, například *Botrytis cinerea*, *Verticillium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium* spp., *Fusarium* spp. V půdě rozkládají posklizňové zbytky a infikují sklerocia, a to i při nižších půdních teplotách. S houbami tohoto rodu se nejčastěji setkáváme v půdách s dostatečnou zásobou humusu a kompostech (Chatterton & Punja 2010, Chatterton & Punja 2009, Chatterton et al. 2008). Houba byla zaznamenána i na hmyzu, takže se jí přiřazuje i status entomopatogenna (Toledo et al. 2006).

Druh *Clonostachys rosea* f. *catenulata* vytváří bílé vatovité mycelium, které postupem stářím a sporulací mění barvu na olivově zelenou až zelenomodrou. Sporulují nejprve ve středu kolonie a sporulace je patrná v koncentrických kruzích. Houba tvoří dva typy konidioforů, (1) přeslenitě větvené konidiofory se třemi až pěti dlouhými štíhlými fialidami, nesoucí na vrcholu kulovitý shluk konidií a (2) štětcovitě větvené konidiofory s fialidami přitisknutými k sobě a konidii slepenými v nepravidelné útvary na vrcholu konidioforů. Konidie jsou uspořádány v řetězcích a jsou zabalené do mucilagenní hmoty (Schroers 2001).

3 Entomopatogenní houby

Entomopatogenní houby jsou mikroorganismy, které jsou schopny způsobovat onemocnění hmyzu. Používají se v biologické ochraně rostlin proti škůdcům. V současné době jsou známy druhy náležející do oddělení *Chytridiomycota*, *Microsporidia*, *Entomophthoromycota*, *Ascomycota* a *Basidiomycota* (Araújo et al. 2016). Entomopatogenní houby získávají živiny od hostitelů biotrofně, kdy živiny získá houba pouze ze živého hostitele a nektrotrófně, kdy získávají živiny z odumřelých mikroorganismů. Kombinace těchto dvou vlastností se nazývá hemibiotrofie, kdy nejdříve hostitele parazitují a následně po usmrcení jsou schopny získávat živiny i z jejich odumřelých tkání (Sinha et al. 2016). Mezi nejvíce zkoumané druhy jsou zástupci z oddělení *Ascomycota*, řádu *Hypocreales*, mezi které patří hlavně druhy rodu *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp., *Isaria* spp., *Cordyceps* spp., *Pochonia* spp., *Akanthomyces* spp., *Hirsutella* spp. Na bázi druhů *Metarhizium brunneum*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* a *Akanthomyces lecanii* jsou registrovány ve světě biopreparáty, které mají uplatnění proti širokému spektru hostitelských škůdců. Tyto druhy lze snadno kultivovat v provozních a poloprovozních podmínkách v tekutých živných půdách nebo na přirozených substrátech (Faria a Wraight 2007). Entomopatogenní houby se vyskytují nejen v půdních podmínkách, ale i ve fytoplánu po celém světě (Inglis et al. 2001). Druhy rodu *Metarhizium* spp. a *Beauveria* vytvářejí s rostlinami endofytické vztahy (Jaber & Enkerli 2017).

Mechanismus účinku entomopatogenních hub je rozdělen do několika kroků. Nejprve konidie ulpí na těle hostitele a následně vyklíčí. Na konci klíčku se vytváří útvar zvaný apresorium, který slouží k proniknutí přes kutikulu členovce. V apresoriu dochází k produkci enzymů, jako jsou chitináza, proteináza a lipáza, které pomáhají při degradaci kutikuly hmyzu. Narušením kutikuly proniká penetračním hrotem dovnitř těla hostitele, tedy do hemolymfy, kde začíná houba vytvářet blastospory. Blastospory se tvoří pučením, a houba vyplňuje celé tělo postupnou utilizací tkání a orgánů. Po vyplnění těla houba proliferuje na povrch, kde vytváří vzdušné mycelium, na kterém se začnou tvořit při dostatku živin sporulační struktury (Inglis et al. 2001). Entomopatogenní houby produkují v těle hostitele i sekundární metabolity jako beauvercin, bassianin, beauverolid, bassiatin a oosporein. Tyto metabolity pomáhají při deaktivaci obranných mechanismů hmyzu (Shahbaz et al. 2024).

K šíření konidií v prostředí nebo mezi hostiteli napomáhají abiotické faktory (voda a vítr) nebo biotické (dotek zdravého jedince s jedincem infikovaným (Shin et al. 2020). Optimální podmínky pro klíčení a sporulaci entomopatogenních hub je teplota mezi 20°C a relativní vzdušná vlhkost v rozmezí od 75 do 100 % (Islam et al. 2021).

4 Druhy entomopatogenních hub

4.1 *Akanthomyces attenuatus*

Tento druh entomopatogenní houby, která byla známa v minulosti pod názvem *Verticillium lecanii*, později *Lecanicillium attenuatus* Zare & Gams náleží do řádu *Hypocreales*, čeledi *Cordycipitaceae*, rod *Akanthomyces* (Pong et al. 2017).

Jedná se o entomopatogenní houbu, která způsobuje onemocnění na širokém spektru hmyzu z řádů *Hemiptera*, *Heteroptera*, *Aphidoidea*, *Thysanoptera*, *Hemiptera*, ale také např. u roztoče svilušky chmelové *Tetranychus urticae* (Dash et al. 2018). Vliv entomopatogenního účinku může být někdy snížen a to tím, že například zástupci rodu *Phenacoccus* vytvářejí na povrchu těl voskovou ochranu a přes tuto bariéru nejsou klíčící konidie schopny penetrovat přes kutikulu hmyzu. Nicméně i přes tuto překážku způsobila houba *Akanthomyces lecanii* (kmen 3.4505) infekci u červce *Phenacoccus fraxinus* (Gao et al. 2015). Během svlékání hmyzu může docházet k tomu, že aplikované konidie zůstávají na exuviích a tím dochází ke snížení účinnosti druhu (Akram et al. 2016). Entomopatogenní houba *A. attenuatus* může zvyšovat účinnost i díky produkci těkavých molekul, které produkují rostliny v závislosti na napadení škůdci. Na rostlinách *Arabidopsis thaliana* a škůdci *Lipaphis erysimi*, bylo zjištěno, že rostlina produkuje při napadení methylester kyseliny salicylové a ten podporuje klíčení spor a zvyšuje patogenitu *A. lecanii* vůči škůdci (Lin et al. 2016).

Houby rodu *Akanthomyces* mají také mykoparazitický status, kdy byla zaznamenána účinnost na fytopatogenní houby *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, nebo *Aspergillus flavus* (Dolatabad et al. 2017). Mohou parazitovat i na druzích padlí a rzí, například na padlí *Podosphaera xanthii* a na rzi *Hemileia vastatrix* (Folorunso et al. 2022, Jackson et al. 2012).

V závislosti na okolních podmínkách klíčí konidie přichycené na těle hostitele již za 24 hodin. Poté se na některých konidiích vytvářejí kratší zárodečné trubice, které se pak přeměňují v hyfy, na některých vznikají útvary podobné apresoriu, které pronikají skrz kutikulu. Hyfy vylučují adhezivní gel pro lepší ulpění na těle hmyzu a molekuly narušující kutikulu. Jakmile houba penetruje do těla hostitele, kolonizuje postupně všechny tkáně a orgány. Začíná se vytvářet husté mycelium bílé barvy, které prorůstá zpět na povrch těla hostitele a vytváří novou generaci konidií (Du et al. 2019, Hall 1985).

4.2 *Beauveria bassiana*

Druh *B. bassiana* náleží do třídy *Sordariomycetes*, řádu *Hypocreales*, čeledi *Cordycipitaceae*, rodu *Beauveria* (Sung et al. 2007). Jedná se o široce kosmopolitní druh entomopatogenní houby, která hraje velmi významnou roli v biologické ochraně rostlin. Její životní cyklus je úzce spojen s hostitelem – hmyzem, kterého napadá a infikuje. Hostitelé *B. bassiana* jsou např. zástupci řádu *Diptera*, *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Neuroptera*, *Orthoptera*, *Hymenoptera*, *Thysanoptera*, *Hemiptera* nebo roztoči *Acari* a (Zimmermann 2007a). *B. bassiana* se vyskytuje přirozeně v půdním prostředí, zejména pak v povrchové vrstvě (Landa et al. 2007, Thompson et al. 2006). Její výskyt je hojně zaznamenán v lesích na různých druzích podkorního hmyzu, *Scolitinae* (Landa et al. 2010, Landa et al. 2001a, Landa et al. 2001b).

V přírodě se konidie houby dostávají na povrch těla hmyzu, například větrem, vodou nebo přímým kontaktem infikované jedince se zdravým. Při vhodných podmínkách (vlhkost, teplota) konidie nabobtnají a vyklíčí, čímž vytvoří tenkou nitkovitou strukturu zvanou hyfa. Na konci hyfy se vytvoří specializovaná struktura zvaná apresorium, která se pevně přichytí k povrchu kutikuly hmyzu. Apresorium vylučuje enzymy, jako jsou proteázy, chitinázy a lipázy (St Leger & Butt, 2016), které narušují kutikulu a umožňují průnik hyfy do těla hmyzu. Hyfa poté vytvoří specializovaný penetrační hrot, který prorazí kutikulu. Uvnitř hostitele, respektive v hemolymfě houba produkuje blastospory, které se podobně jako kvasinky množí pučením. Tělo hostitele kolonizuje a využívá tkáň a orgány. Houba produkuje toxiny, které poškozují tkáň hostitele a oslabují jeho imunitní systém. *B. bassiana* vylučuje celou řadu molekul jako je např. beauvericin, bassianin, bassianolid, beauverolidy, tenellin, oosporein, kyselina šťavelová (Safavi 2013). Beauvericin má mimo jiné také nematocidní účinky (Xu et al. 2007). Intenzivní růst houby vede k vyčerpání zásob živin v těle hmyzu. Tělo se mumifikuje a pokryje hustým myceliem houby. Na povrchu mumifikovaného hmyzu se vytvoří vzdušné mycelium, na kterém se vytvoří specializované struktury - konidiofory, na jejichž koncích se tvoří konidie. Povrch konidií *Beauveria* je pokryt mikroskopickými hrbolky a rýhami, které zvyšují jeho drsnost a adhezivitu. To umožňuje konidiím lépe se přichytávat na chloupky, tykadla a další nerovné povrchy těla hmyzu (St. Leger et al., 2011). Zralé konidie se uvolňují do prostředí a mohou infikovat další hostitele (Rehner et al. 2011, Zimmermann 2007b). Optimální podmínky pro růst *B.*

bassiana je hodnota pH 6.0, teplota 25 °C a 95% relativní vlhkost (Wargane et al. 2020). *B. bassiana* je prakticky anamorfní houba a pozorování teleomorf v přírodě je velice vzácné, výskyt teleomorf je vázán na tropické a subtropické oblasti (Shrestha et al. 2014). Houba *B. bassiana* byla také prokázána uvnitř rostlin, takže se chová jako endofyt (Bamisile et al. 2020). Například na kukuřici *Zea mays* dokázala snižovat populaci zavíječe kukuřičného *Ostrinia nubilalis* (Bing & Lewis 1991).

4.3 *Isaria fumosorosea*

Rod *Isaria* řazen do řádu *Hypocreales*, čeledi *Cordycipitaceae*. Dříve náležel tento druh do rodu *Paecilomyces* a po revizi byl z tohoto rodu vyčleněn (Vega 2007). Druhy, které zůstaly v rodě *Paecilomyces* byly na základě nejnovějších fylogenetických studií zařazeny do čeledi *Clavicipitaceae* (Sung et al. 2007). Druh *Isaria fumosorosea* reprezentuje široce polyfágní druh entomopatogenní houby, který může v přírodě způsobovat onemocnění na roztočích (status akarifágní) a na nematodech (status nematofágní) (Landa et al. 2008). *I. fumosorosea* je kosmopolitní druh a má široké spektrum hostitelů. V tropických a subtropických oblastech způsobuje přirozené epizoozie u savého hmyzu (červci, puklice, molice, mšice). V podmínkách mírného pásma se vyskytuje hlavně v půdním prostředí (Zimmermann 2008). Houba *I. fumosorosea* vytváří na hostiteli bílé vatovité mycelium, které později mění barvu do odstínů nařevavé až šedofialové barvy. Sporulací kolonie tmavnou, po manipulaci se spory snadno rozpráší, což má výhodu v přirozených podmínkách, kde se snadno může houba v prostředí šířit. Houba tvoří spory v řetízkách, spory jsou oválné a nejmladší konidie je vždy na bázi fialidy o odtlačuje starší sporu do řetízku (Landa et al. 2008). *I. fumosorosea* je schopna parazitovat i na jiných druzích hub, má tedy status mykoparazita. Patogen se jako ektoparazit může vyvíjet na různých druzích rzí, anebo na různých druzích padlí, např. na konidiích padlí okurkového (*Sphaerotheca fuliginea*, *Podosphaera xanthii*) (Folorunso et al. 2022, Zimmermann 2008, Landa 2002).

4.4 *Metarhizium* spp.

Druhy rodu *Metarhizium* náleží do oddělení *Ascomycotas*, řádu *Hypocreale*, čeledi *Clavicipitaceae* (Sung et al. 2007). Druhy jsou přítomny běžně v rhizosféře a jedná se o velmi významné organizmy infikující zejména půdní hmyz. Onemocnění způsobují

na celé škále hmyzích škůdců z řádů *Coleoptera*, *Isoptera*, *Lepidoptera*, *Diptera*, *Hemiptera*, případně i na roztoče *Acari* (Beys-da-Silva et al. 2020, Orduño-Cruz et al. 2011). V přírodě se *M. anisopliae* primárně rozmnožuje nepohlavně pomocí konidií. Pohlavní rozmnožování byla u tohoto druhu pozorována jen zřídka a za velmi specifických podmínek. Při pohlavním rozmnožování vytváří druhy speciální struktury, ascinata typu peritecií. Telemorfy náleží do rodu *Metacordyceps* (Sung et al. 2007). Analýza genomů, odhalila redukci genů spojených s pohlavním rozmnožováním, což naznačuje, že tento druh pomalu ztratil schopnost se efektivně pohlavně rozmnožovat (Gao et al. 2011).

K proniknutí přes kutikulu, která je tvořena zejména chitinem, produkují houby rodu *Metarhizium* velké množství enzymů jako jsou proteázy, lipázy a aminopeptidázy. Druhy jsou schopny se přichytit prakticky kdekoli na těle hostitele. Kutikula je velmi členitá a tato členitost vytváří vhodné prostředí z hlediska teploty a vlhkosti pro klíčení spor, v záhybech je tedy vhodné mikroklima pro klíčení spor (Bidochka et al. 1997). Po uchycení konidií na povrchu hostitele, začne houba aktivovat tvorbu molekul, tzv. aktivačních efektorů, které zabraňují hostiteli, aby produkoval obranné látky proti patogenu. Hmyz není schopen se infekci bránit (Pedrini et al. 2007).

Proces infekce hostitele lze rozdělit do několika částí. (1) ulpění konidií ke kutikule hostitele, (2) klíčení konidií, (3) tvorba apresoria, (4) pronikání kutikulou, (5) kolonizace hemolymfy, (6) růst mycelia uvnitř hostitele, (7) proliferace na povrch a sporulace (Gao et al. 2011, Zhang et al. 2010).

Jakmile druhy překonají spodní epidermis, začínají se množit v hemolymfě. Postupně svého hostitele usmrcují (Seyoum et al. 2002). Postupnou kolonizací hostitele houby vyčerpají dostupné zdroje a následně proliferují na těle hostitele, kde vytváří síť mycelia. Nákazy tímto druhem bývají často označovány jako „zelené muskardiny“, protože infikovaný jedinec následně porůstá hustým, tmavě zeleným myceliem (Gabarty et al. 2014, Landa et al. 2008; Roberts, St. Leger 2004).

Do rodu *Metarhizium* jsou po revizi zařazeny druhy *M. album*, *M. flavoviride*, *M. frigidum*, *M. pinghaense*, *M. anisopliae*, *M. robertsii* a *M. brunneum* (Bischoff et al., 2009). Na základě multigenového fylogenetického přístupu využívajícího téměř kompletní sekvence z jaderné DNA byl u komerčního preparátu Met52 změněn vědecký název kmene F52. Dříve se jednalo o druh *Metarhizium anisopliae*, nově je tento druh přejmenován na *Metarhizium brunneum*. Nicméně, tento kmen F52 druhu *M. brunneum*

je v komerčních zdrojích stále často popisován jako *M. anisopliae* (Bischoff et al., 2009).

M. brunneum má pozitivní účinky i na biostimulaci rostlin a pomáhá jim snižovat biotický a abiotický stres (Elena et al. 2011). Kromě jiného houba inhibuje mikrobiální život v okolí kořenů rostlin, a tím jí chrání před napadením patogeny (Xiong et al. 2017). Virulence konidií i blastospor *M. brunneum* je poměrně vysoká, ale v současné době se má za to, že virulence blastospor je vyšší a to vzhledem ke kratší délce klíčení (2–8 hodin versus 12–24 hodin) oproti konidím (Alkhaibari et al. 2016).

5 Fytopatogenní houby

Fytopatogenní houby jsou mikroorganismy, které napadají rostliny, a tím zejména v zemědělství způsobují značné škody následkem snížení produkce. Při dlouhém vývoji hub došlo k tomu, že houby začaly interagovat s rostlinami. Tyto interakce se vyvinuly ve schopnost kolonizovat kořeny, nebo i nadzemní části rostlin. Některé tyto interakce jsou prospěšné a vytváří tak mutualistický vztah rostlina-houba. Některé se ovšem vyvinuly ve vztah, kdy houba je parazitem rostlin (Perincherri, 2019).

Fytopatogenní houby si vyvinuly mechanismy, pomocí kterých modifikují hodnotu pH v rostlinných tkáních. To jim usnadňuje rozvoj. Alkalické, nebo naopak kyselé prostředí pomáhá snižovat imunitní reakci rostlin, a tím zvyšují jejich virulenci (Alkan et al. 2013). Fytopatogenní biotrofní houby jsou specialisté, kteří pro zdroj živin využívají živé buňky, potřebují tedy živou hostitelskou rostlinu. V důsledku buněčné proliferace do postižených buněk rostliny vyvolávají celou řadu onemocnění. Mezi biotrofní fytopatogenní houby zařazujeme řády *Peronosporales*, *Taphrinales*, *Exobasidiales*, různé druhy padlí, rzí a snětí (Dyakov & Zinovyva, 2007).

Způsob napadení rostlin fytopatogenním druhem je ektoparazitický, nebo endoparazitický. Jednotlivé druhy se rozmnožují jak pohlavně, tak i nepohlavně. Během vegetačního období se druhy fytopatogenních hub rozmnožují nepohlavně, kdy se během sezóny vytváří několik generací infekčních propagulí. Nepohlavní cyklus u biotrofních patogenů začíná poté, co se konidie přichytí na hostitele a začne klíčit. Po vyklíčení tvoří spora hyfy, která penetruje do rostliny a do buněk vysílá haustoria pomocí kterých čerpá živiny (Eichmann & Hüchelhoven 2008). Hyfy se větví a vytvářejí různá sekundární haustoria. Následně se mycelium rozrůstá na povrchu a vytvářejí se sporulační orgány, na kterých vznikají konidie. V případně pohlavního rozmnožování u padlí se vytváří na hyfách samčí a samičí gametangia, která po splynutí vytváří plodnice, v případě padlí kleistotecia. Uvnitř kleistotecií jsou uložena aska, které obsahují askospory. Pomocí kleistotecií padlí přežívá na posklizňových zbytcích (Tucker & Talbot 2001).

Fytopatogenní nekrotrofní houby vnikají do rostlin pomocí různých mechanismů. Jde např. o vylučování sekundárních metabolitů, pomocí kterých napadají živé buňky rostlin a ty následně usmrcují, a poté čerpají živiny z odumřelých částí. Nekrotrofové způsobují celou řadu typů onemocnění, včetně nekrotů a hnilob různých částí rostlin (Dyakov & Zinovyva, 2007).

Mezi významné fytopatogeny z této skupiny patří mezi ně zástupci *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria* spp., *Fusarium* spp. Tyto druhy poškozují různé části rostlin a projevem infekce je symptom (Dyakov & Zinovyva, 2007). Mezi destruktivní patogeny patří zástupci rodu *Fusarium* spp., které přežívají v půdě na posklizňových zbytcích a na hospodářských plodinách způsobují značné škody. Druhy *Fusarium* jsou patogenní a způsobují širokou škálu symptomů, včetně vadnutí, hnilob a skvrnitostí. Druhy *Fusarium* produkují mykotoxiny, které jsou škodlivé pro člověka a zvířata (Polišenská et al. 2007). Mezi významné druhy patří *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. poae*, *F. avenaceum*, *F. sporotrichoides*.

6 Materiál a metodika

6.1 Druhy entomopatogenních hub

V pokusech byly testovány 4 kmeny vybraných druhů entomopatogenních hub. Vybrané druhy entomopatogenních hub byly *Beauveria bassiana*, *Metarhizium brunneum*, *Isaria fumosorosea* a *Akanthomyces muscarius*. Používané kmeny pocházejí z mykologické sbírky, která je uložena na Katedře rostlinné výroby Fakulty zemědělské a technologické Jihočeské univerzity v Č. Budějovicích (FZT JU). Kmeny jednotlivých druhů hub jsou dlouhodobě uchovávány v mrazáku při teplotě -20 °C ve formě alginátových pelet s biomasou příslušného kmene.

6.1.1 *Isaria fumosorosea*

V pokusech byl použit kmen PFR Apopka 97, který byl poprvé odizolován v roce 1987 z červce ve skleníku v Apopce na Floridě. Referenční kmen je uložen v americké sbírce mikroorganismů pod označením ATCC 20874. Kmen PFR Apopka 97 je účinnou složkou biopreparátu PFR 97TM 20 % WDG firmy Certis Llc. USA. Tento kmen je i v Evropě, Belgii pod obchodním názvem PreFeRalTM a PreFeRal®WG. Kmen byl reisolován z biopreparátu a jako čistá kultura byl používán v pokusech.

6.1.2 *Beauveria bassiana*

Kmen entomopatogenní houby CCM 8382 byl odizolován z dospělce lýkožrouta smrkového v roce 2004 na lokalitě Prameny Vltavy, Národní park Šumava. Izolace kmene z dospělce lýkožrouta smrkového *Ips typographus* byla provedena pomocí metody selektivní živné půdy na bázi fungicidní složky dodine. Čistá kultura kmene byla imobilizována do alginátových pelet, které jsou uchovány ve sbírce FZT JU. Kmen je patentován a uložen v České sbírce mikroorganismů v Brně (CCM).

6.1.3 *Akanthomyces attenuatus*

Kmen entomopatogenní houby *Akanthomyces attenuatus* CCM 9195 byl odizolován z dospělce lýkožrouta smrkového odchyceného pomocí feromonového lapače na území Národního parku Šumava a CHKO Šumava. Kmen je uchováván ve formě alginátových pelet v mykologické sbírce FZT JU. Kmen je patentován a uložen v České sbírce mikroorganismů v Brně (CCM).

6.1.4 *Metarhizium brunneum*

Entomopatogenní houba *Metarhizium brunneum* kmen F-52 je účinnou složkou biopreparátu Met52. Pro experimentální účely byl kmen reizolován z biopreparátu v roce 2009. Čistá kultura kmene byla imobilizována do alginátových pelet, které jsou uchovány ve sbírce FZT JU. Referenční typový kmen F-52 je uložen v americké sbírce mikroorganismů (American Type Culture Collection) pod označením ATCC 90448.

6.2 Druhy mykoparazitických hub

V pokusech středových kultur byly testovány kmeny hub *Trichoderma virens*, *Clonostachys rosea f. catenulata* a *Coniothyrium minitans* odizolovaných z komerčních biopreparátů. Kmeny jednotlivých druhů hub jsou dlouhodobě uchovávány v mrazáku při teplotě -20 °C ve formě alginátových pelet s biomasou příslušného kmene.

6.2.1 *Trichoderma virens*

V pokusech byl použit kmen GI-21, který je účinnou složkou biopreparátu Soilgard WDG firmy Certis Llc. USA. Kmen byl reizolován z biopreparátu a jako čistá kultura byl používán v pokusu. Čistá kultura kmene byla imobilizována do alginátových pelet, které jsou uchovány ve sbírce FZT JU.

6.2.2 *Clonostachys rosea f. catenulata*

V pokusech byl použit kmen J1446, který je účinnou složkou biopreparátu PRES-TOP® MIX firmy Verdera, Finsko. Kmen byl reizolován z biopreparátu a jako čistá kultura byl používán v pokusu. Čistá kultura kmene byla imobilizována do alginátových pelet, které jsou uchovány ve sbírce FZT JU.

6.2.3 *Coniothyrium minitans*

V pokusech byl použit kmen CON/M/91-08, který je účinnou složkou biopreparátu Contans WG firmy Bayer CropScience, Německo. Kmen byl reizolován z biopreparátu a jako čistá kultura byl používán v pokusu. Čistá kultura kmene byla imobilizována do alginátových pelet, které jsou uchovány ve sbírce FZT JU.

V pokusech zaměřených na duální testy mezi mykoparazitickými druhy hub rodu *Trichoderma* a fytopatogenními druhy byly použity kmeny *Trichoderma* spp. odizolované z půd České republiky v rámci projektu NAZV. Čisté kultury kmenů byly imobilizovány do alginátových pelet a jsou uloženy ve sbírce FZT JU. Informace o jednotlivých kmenech jsou uvedeny v tabulce níže.

| Kmen | Hodnocené znaky | | |
|-----------|-----------------|---------|---------------------|
| | Struktura | Pustuly | Barva |
| Tri 901 | vláknitá | - | tmavě zelená |
| Tri 946 | vláknitá | - | tmavě zelená |
| Tri 948 | vláknitá | - | tmavě zelená |
| Tri 914 | kompaktní | - | tmavě zelená |
| F5 SNA G1 | kompaktní | - | tmavě zelená |
| Tri 905 | vláknitá | - | světle zelená/žlutá |
| Tri 909 | vláknitá | - | světle zelená/žlutá |
| Tri 913 | vláknitá | - | světle zelená |
| Tri 908 | vláknitá | - | zelená/žlutá |
| Tri 911 | vláknitá | - | zelená/žlutá |
| Tri 912 | kompaktní | + | tmavě zelená |
| Tri 903 | kompaktní | + | světle zelená |
| Tri 904 | kompaktní | + | světle zelená |
| Tri 906 | kompaktní | + | světle zelená |
| Tri 910 | kompaktní | + | světle zelená |

Tabulka 1 - Souhrnná tabulka morfologických znaků u kmenů hub rodu *Trichoderma*

6.3 Testované druhy fytopatogenní hub

Kmeny fytopatogenních hub rodu *Fusarium* spp. použitých v pokusech byly izolovány z infikovaných semen hrachu, sóji a lupiny, které vykazovaly symptomy mykóz včetně mycelia a fruktifikačních struktur nebo byly izolovány ze vzorků půd. Fytopatogenní druhy byly ze semen odizolovány na Petriho misky s živnou půdou PDA (Potato Dextrose Broth, Himedia, Indie) s přidavkem antibiotika chloramphenicol (Merck KGaA,

Darmstadt, Germany). Druhy fytopatogenních hub byly odizolované z půdních vzorků pomocí výluhu na živnou půdu PDA s antibiotikem chlorampenicol. Druh *S. sclerotiorum* byl odizolován ze sklerocií získaných na pokusném pozemku FZT JU. Druh *R. solani* byl odizolován z bramborových hlíz a *B. cinerea* z řepky ozimé. Kmeny *F. culmorum* byly získány ze sbírky kultur hub PřF UK, respektive ze sbírky mlékárenských kontaminantů, Milkom a.s.

| Druh | označení | původ |
|---------------------------------|----------|---|
| <i>F. oxysporum</i> | 55-D1 | půda |
| <i>F. proliferatum/solani</i> | 55-F3 | půda |
| <i>F. sporotrichoides</i> | 55-L3-Ca | lupina |
| <i>F. avenaceum/tricintum</i> | 55-L4-Ca | lupina |
| <i>F. avenaceum</i> | 55-H1-C | hrách |
| <i>F. culmorum</i> | 317 | sbírka mlékárenských kontaminantů – Laktoflora |
| <i>F. culmorum</i> | 1834 | sbírka kultur hub PřF UK |
| <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> | Scl | sklerocia řepky ozimé |
| <i>Rhizoctonia solani</i> | Rh | hlíza bramboru |
| <i>Botrytis cinerea</i> | Bc | řepka ozimá |

Tabulka 2 - Testované fytopatogenní druhy hub

6.4 Kultivace matečných kultur a příprava suspenzí

Kultivace entomopatogenních, mykoparazitických a fytopatogenních hub probíhala na živné půdě PDA. Entomopatogenní a mykoparazitické druhy hub byly kultivovány na živné půdě ve formě separačních čar pomocí jednorázové sterilní inokulační kličky. Fytopatogenní druhy byly na povrch živné půdy inokulovány ve formě výřezu (korkovrt o průměru 10 mm) z matečné kultury. Petriho misky s jednotlivými druhy hub byly následně uloženy do sáčku a inkubovány v termostatu ($25\pm 1^\circ\text{C}$, fotoperioda 0/24) po dobu 14 dní. Takto připravené kultury jednotlivých druhů hub byly použity pro experimentální účely.

Suspenze jednotlivých druhů entomopatogenních a mykoparazitických hub byly získány smytím plně vysporulovaných kultur sterilním roztokem 0,05 % Tween 80. Zís-

kané suspenze byly následně přefiltrovány přes sterilní gázu, kdy byla získána homogenní suspenze spor bez shluků mycelia. V každé suspenzi spor byl spočítán titr pomocí Neubauerovy počítací komůrky – hemocytometru (Bright-Line™, USA). Titr byl po usazení spor v hemocytometru počítán pomocí optického mikroskopu. Základní suspenze spor byla adjustována ředěním na titr $1,00 \times 10^7$ v 1 ml.

6.4.1 Morfologické markery u mykoparazitických hub

U jednotlivých kmenů mykoparazitických hub rodu *Trichoderma* byl hodnocen fenotypový projev kultur na základě středových kultur na PDA po 14 dnech kultivace při teplotě 25°C. Středová kultura kmenů byla hodnocena vizuálně. Sledovanými parametry byla barva kultury, typ sporulace kultury, přítomnost pustul (shluk konidioforů na myceliu). Mezi druhy/kmeny byla velká variabilita sledovaných znaků, která umožňuje jejich odlišení.

6.4.2 Příprava středových kultur

Kmeny entomopatogenních a mykoparazitických hub byly aktivovány z alginátových pelet a kultivovány na živné půdy PDA. Ze získané suspenze každého druhu/kmene byla pomocí inokulační kličky nanesena kapka do středu Petriho misky s PDA. Po zaschnutí kapky byly misky vloženy do plastového sáčku a umístěny do termostatu s teplotou 25°C po dobu 14 dnů (*Trichoderma virens*) a 21 dnů (ostatní druhy hub). Z každého druhu fytopatogenu byl pomocí korkovrtu vyříznut bloček o průměru 10 mm, který byl umístěn do středu Petriho misky s PDA. Kultivace probíhala po dobu 7 dnů. Celkem byly připraveny 4 opakování od každého druhu.

6.4.3 Radiální růst

Radiální růst středových kultur slouží k hodnocení kolonizace a tím rychlosti růstu testovaných druhů hub. Na živné půdě PDA tvoří houby kruhovitě kultury, u kterých se měří dva na sebe kolmé průměry. Z radiálního růstu se následně u všech hub stanovila po přepočtu plocha kultury v mm².

6.4.4 Výtěžnost spor hub

Produkce spor se stanovovala ze středových kultur inkubovaných po 14 resp. 21 dnech. Kultura kmenů hub v Petriho miskách byly spolu s živnou půdou PDA byla homogenizovány v mixéru s adekvátním množstvím vody. Pomocí počítací komůrky - hematocymetru (Neubauerova vylepšená komůrka) byla stanovena produkce spor, která se vyjádřila na jednu Petriho misku a následně byla přepočítána na produkci spor z 1 mm² kultury. Hodnoceny byly vždy 2 misky z jedné varianty.

6.4.5 Interakční testy mezi mykoparazitickými houbami a fytopatogenními druhy hub

Cílem interakčních testů je determinovat a kvantifikovat vztah mezi mykoparazitem a patogenem. V pokusu byl hodnocen vliv kmenů hub rodu *Trichoderma* na supresi různých fytopatogenních druhů hub a následné schopnosti je parazitovat. Pro prezentaci mykoparazitické aktivity kmenů *Trichoderma* spp. bylo vybráno 5 druhů fytopatogenních hub – *Botrytis cinerea*, *Fusarium proliferatum/solani*, *Fusarium avenaceum/tricinatum*, *Fusarium avenaceum* a *Fusarium culmorum*.

6.4.6 Interakční testy mezi entomopatogenními houbami a fytopatogenními druhy hub

Cílem interakčních testů je determinovat a kvantifikovat vztah mezi entomopatogenní houbou hub a patogenem. V pokusu byl hodnocen vliv kmenů entomopatogenních hub na růst a vývoj různých fytopatogenních druhů hub. Pro prezentaci aktivity kmenů entomopatogenních hub bylo vybráno 10 druhů fytopatogenních hub uvedených v tabulce X.

6.4.7 Založení interakčních testů

Interakční test mezi jednotlivými variantami hub byl zaměřen na zjištění vzájemné kompatibility, antagonismu a mykoparazitismu. Testy byly realizovány na živné půdě PDA. Interakce mezi mykoparazitickými a fytopatogenními druhy hub byla sledována pomocí duálního testu. Interakce mezi entomopatogenními a fytopatogenními druhy byla testována též pomocí duálního testu. A zároveň v případě entomopatogenních hub testem, při kterém byl kmen entomopatogenní houby nanesen na 4 protilehlá místa na

okraji Petriho misky (\varnothing 90 mm) a terčik fytopatogenního druhu byl umístěn doprostřed Petriho misky.

6.4.8 Duální test

Duální test byly v rámci jednotlivých druhů mykoparazitických nebo entomopatogenních hub založeny tak, že byly kapky suspenze spor jednotlivých druhů/kmenů o koncentraci $1,0 \times 10^7$ v 1 ml naneseny na jeden okraj Petriho misky (\varnothing 90 mm). Suspenze byla nanesena ve formě kapky pomocí sterilní laboratorní kličky (10 μ l). V případě entomopatogenních hub byly založeny varianty s testováním vlivu užitečných hub na růst a tvorbu sklerocií fytopatogenního druhu *Sclerotinia sclerotiorum*. Entomopatogenní houby byly inokulovány 7 dní před umístěním terčiku *S. sclerotiorum* vyříznutého z matečné kultury pomocí korkovrtu (\varnothing 10 mm). V případě mykoparazitických hub rodu *Trichoderma* došlo k založení duálního testu s patogeny ve stejný den. Kontrolní varianta pro všechny varianty byla založena pouze umístěním bločku fytopatogenního druhu na jeden okraj Petriho misky. Stejným způsobem byly ponechány kontrolní kultury entomopatogenních a mykoparazitických druhů na jednom okraji Petriho misky. Takto připravené agarové plotny byly vloženy v plastických sáčcích do termostatu ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperioda 0/24) a inkubovány po dobu jednoho týdne. Pro každou variantu byly založeny 3 opakování.

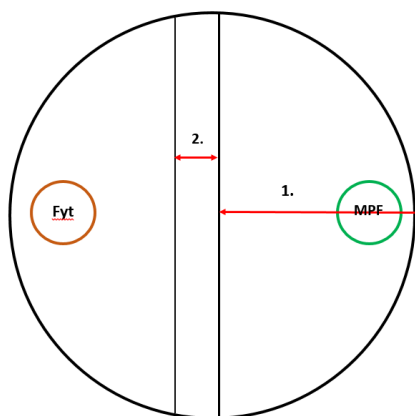


Schéma 1.

MPF = kmen mykoparazitické houby

Fyt = fytopatogen

1. = zóna dotyku – měřena od okraje misky mykoparazita k místu střetu s patogenem

2. = zóna mykoparazitismu – zóna přerůstání kultury patogenu mykoparazitickou houbou

Hodnocení aktivity mykoparazitických hub v kombinaci s fytopatogeny bylo hodnoceno po 7 dnech testu. Hodnocena byla zóna dotyku a zároveň zóna mykoparazitismu.

Hodnocení vlivu entomopatogenních hub na růst a vývoj *S. sclerotiorum* bylo hodnoceno po 7 dnech od vložení terčičků fytopatogenu do středu Petriho misky. Hodnoceny byly jednotlivé zóny tak, že byly měřeny pomocí digitálního posuvného měřítka a zároveň byla pořízena fotodokumentace. U *S. sclerotiorum* byl hodnocen počet sklerocií v kontrolní a testované variantě. Hodnoty byly zprůměrovány a statisticky vyhodnoceny. Zóny hodnocení jsou uvedeny ve schématech níže.

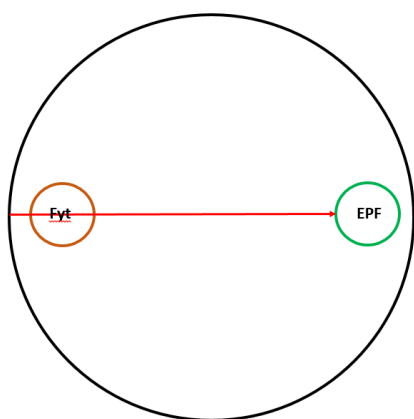


Schéma 2.

EPF = kmen entomopatogenní houby

Fyt = fytopatogen

Zóna = měření vzdálenosti růstu *S. sclerotiorum* směrem k entomopatogennímu druhu

6.4.9 Test 4 kultury

Obdobným způsobem byly založeny Petriho misky se 4 kulturami jednotlivých entomopatogenních druhů, které byly nanесeny ve formě kapek na povrch PDA podle připravené matrice. Terčiček vyřezaný z matečné kultury fytopatogenního druhu byl přidán doprostřed Petriho misky 7. den po inokulaci entomopatogenního druhu houby. Kontrolní verzi představovala varianta, ve které byly samostatně kultivované entomopatogenní druhy hub na čtyřech protilehlých stranách Petriho misky a pro každý fytopatogenní druh byla založena kontrolní varianta umístěním terčičku mycelia doprostřed Petriho misky. Kontrolní varianta pro fytopatogeny byla založena umístěním terčičku do středu Petriho misky. Kontrola pro entomopatogenní houby byla Petriho misky, kde nebyl umístěn doprostřed plotny terčiček patogenu. Takto připravené agarové plotny byly vloženy v plastických sáčcích do termostatu ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperioda 0/24) a inkubovány po dobu jednoho týdne. Pro každou variantu byly založeny 3 opakování.

Hodnocení interakcí bylo provedeno 7 den od umístění terčičku fytopatogenu do středu Petriho misky pomocí digitálního posuvného měřítka. Nejdříve byl hodnocen průměr kultury fytopatogenního druhu v interakci s entomopatogenní houbou.

A následně byla měřena antagonistická zóna mezi fytopatogenní a entomopatogenní houbou. Antagonistické zóny a průměry středových kultur byly měřeny pomocí digitálního posuvného měřítka a zároveň byla pořízena fotodokumentace. Hodnoty byly zprůměrovány a statisticky vyhodnoceny. Zóny hodnocení jsou uvedeny ve schématech níže.

Po měření průměrů kultur a antagonistických zón byla hodnocena produkce spor *B. bassiana* a *I. fumosorosea* v interakci s fytopatogenními druhy hub. Z každé varianty byly hodnoceny 2 Petriho misky. Obsah misek byl převeden do homogenizéru s adekvátním množstvím 0,05 % roztoku Tween 80 a důkladně rozmixován. Vzniklá suspenze se podle potřeby ředila, aby bylo možné spočítat jednotlivé spory nejen entomopatogenní houby, ale i fytopatogenu. Suspenze byla nanášena do Neubauerovy počítací komůrky a byl stanoven titr spor. Po přepočtu byla u fytopatogenního druhu stanovena produkce spor na 1 mm² kultury. V případě entomopatogenní houby byla nejdříve stanovena produkce spor na 1 kulturu, kdy se celkový počet spor v roztoku vydělil 4 kulturami a následně byla produkce přepočtena na 1 mm² kultury.

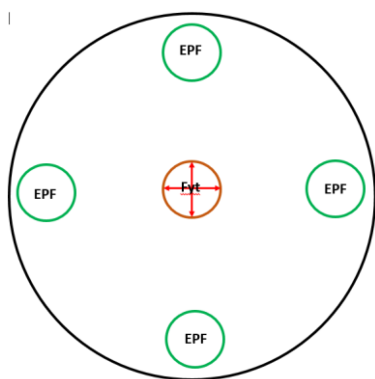


Schéma 3.

EPF = kmen entomopatogenní houby

Fyt = fytopatogen

Zóna = měření kultury fytopatogenního druhu, dva na sebe kolmé průměry

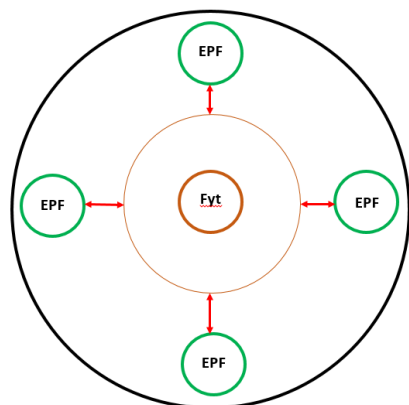


Schéma 4.

EPF = kmen entomopatogenní houby

Fyt = fytopatogen

Antagonistická zóna = měření zóny mezi fytopatogenním a entomopatogenním houbou

$$\% \text{ IMG} = 100 \times \frac{\text{rozměr kolonie FYT v kontrole} - \text{rozměr kolonie v interakci s EPF}}{\text{rozměr kolonie FYT v kontrole}}$$

Vzorec 1 - pro výpočet inhibice růstu fytopatogenu

6.4.10 Počet sklerocií

U interakce entomopatogenních hub s fytopatogenní houbou *S. sclerotiorum* byla hodnocena tvorba sklerocií. V každém opakování byly spočítány plně vyvinutá sklerocia a následně byl přepočítán průměr na variantu. Sklerocia byla počítána pro obě varianty interakcí, ať se jednalo o duální test nebo test se 4 kulturami entomopatogenních hub na Petriho misce.

6.4.11 Coloni forming units (CFU)

Pro hodnocení kompatibility byl použit test kolonie tvořící jednotky, „Coloni forming units“ (CFU). Pro založení interakcí byla použita suspenze entomopatogenních hub *B. bassiana*, *I. fumosorosea* a *M. brunneum* a mykoparazitické houby *C. minitans* o koncentraci $1,0 \times 10^1$ spor na 1 ml. Suspenze hub se nanášely samostatně nebo ve vzájemné kombinaci (entomopatogenní houba vers. *C. minitans*) na povrch Petriho misky obsahující živnou půdu PDA. Objem 0,5 ml připravené naředěné suspenze se pomocí spatuly důkladně rozetřel po povrchu misky s dostatečně vyschlým živným médiem a miska se ponechala ve flow boxu do druhého dne, aby se suspenze hub zasáklý do PDA. Pro jednu variantu se připravovaly standardně 3 misky. Připravené misky se ukládaly do plastových sáčků a byly vloženy do teploty 25°C na dobu 7 dnů. Po této době byly na agaru zřetelně viditelné vytvořené kolonie. Po 7 dnech se doprostřed Petriho misky položil bloček (10 mm) fytopatogenní houby *S. sclerotiorum*. Interpretace interakcí byla následně provedena po 7 dnech od položení *S. sclerotiorum* na misky.

6.4.12 Statistika

Data radiálního růstu a antagonistických zón na živném médiu PDA podrobeny analýze rozptylu (ANOVA) pomocí softwaru pro statistickou analýzu (Statistika 12). Rozdíly mezi středními hodnotami byly porovnány pomocí Post hoc Tukeyho testu ($P < 0,05$).

7 Experimentální část a výsledky

byl proveden přepočít na plochu kultury v mm² a produkci spor na 1 mm²

| Entomopatogenní houby | Radiální růst (mm) | Plocha kultury (mm ²) | Produkce spor (mm ²) |
|---|--------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| <i>Akanthomyces attenuatus</i> kmen CCM 9195 | 60,92 | 2 910,52 | 1,38±0,10x10 ⁶ |
| <i>Beauveria bassiana</i> kmen CCM 8382 | 67,34 | 3 553,46 | 5,96±0,28x10 ⁶ |
| <i>Isaria fumosorosea</i> kmen PFR 97 | 57,51 | 2 598,28 | 5,13±0,11x10 ⁶ |
| <i>Metarhizium brunneum</i> kmen F52 | 62,91 | 3 102,68 | 4,25±0,33x10 ⁶ |

Tabulka 3 - Radiální růst, plocha kultury a výtěžnost spor vybraných druhů entomopatogenních hub

| Mykoparazitické houby | Radiální růst (mm) | Plocha kultury (mm ²) | Produkce spor (mm ²) |
|--|--------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| <i>Coniothyrium minitans</i> kmen 3B | 51,33 | 2 065,88 | 1,50±0,05x10 ⁶ |
| <i>Clonostachys rosea f. catenulata</i> kmen J1446 | 70,42 | 3 886,06 | 1,22±0,03x10 ⁶ |
| <i>Trichoderma virens</i> kmen GL-21 | 87,04 | 5 944,67 | 3,20±0,03x10 ⁸ |

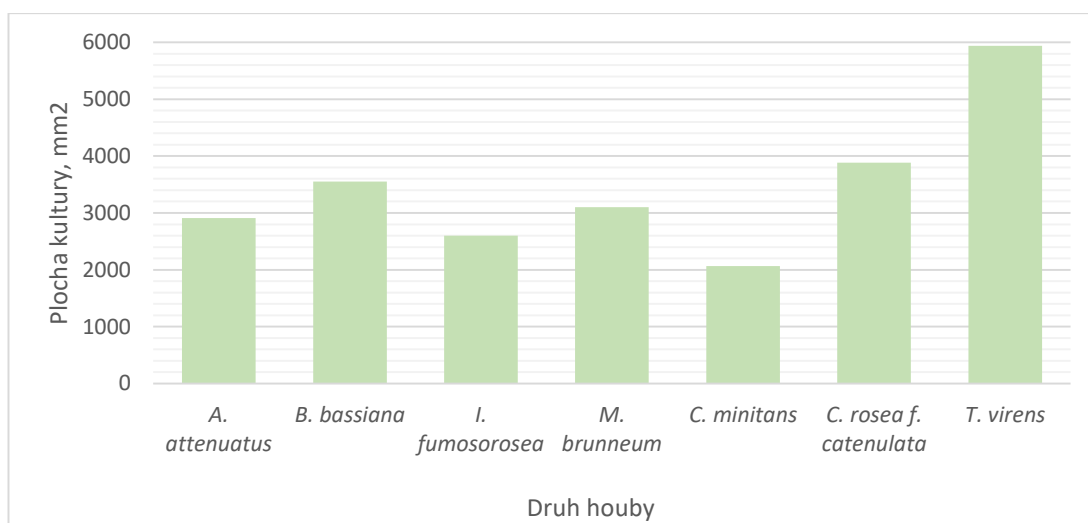
Tabulka 4 - Radiální růst, plocha kultury a výtěžnost spor vybraných druhů mykoparazitických hub

Z kmenů entomopatogenních hub vytvořil po 21 dnech kultivace největší kulturu kmen CCM 8382 houby *B. bassiana* (3 553,46 mm²). Kmen F52 (*M. brunneum*) a CCM 9195 (*A. attenuatus*) vytvořily v průměru o 7 % resp. 10 % menší kultury. Nejméně narostl kmen PFR 97 houby *I. fumosorosea*. V porovnání mezi entomopatogenními druhy korelovala výtěžnost spor u kmene CCM 8382 houby *B. bassiana* s plochou

kultury. Kmen vyprodukoval největší množství spor $5,96 \times 10^6$. Plocha kultury nekorelovala u kmene CCM 9195 houby *A. attenuatus* s produkcí spor. Kmen vyprodukoval ve srovnání s ostatními druhy entomopatogenních hub nejmenší počet spor na mm^2 ($1,38 \times 10^6$) a ani u druhu *I. fumosorosea* nekorelovala plocha kultury s produkcí. U kmene PFR 97 byla zaznamenána nejmenší kolonie houby, ale kmen vyprodukoval jako druhý největší množství spor na mm^2 .

Největší rozdíly byly zaznamenány u mykoparazitických hub. Houby rodu *Trichoderma* jsou nejrychleji rostoucí druhy z této skupiny. Kmen GI-21 druhu *T. virens* kolonizuje Petriho misku již po 4 dnech kultivace. Plocha kultury po 21 dnech je tedy stejná jako plocha Petriho misky, tj. $5\,944,67 \text{ mm}^2$. Z důvodu rychlosti růstu *T. virens* je i produkce spor velmi vysoká. Kmen vyprodukoval po 21 dnech $3,20 \times 10^8$ spor na 1 mm^2 .

Mykoparazitické houby *C. rosea* f. *catenulata* a *C. minitans* jsou pomalu rostoucí druhy entomopatogenních hub. Druh *C. rosea* f. *catenulata* vytvořil po 21 dnech na živné půdě PDA středovou kulturu o průměru $70,42 \text{ mm}$ a druh *C. minitans* kulturu o průměru $51,33 \text{ mm}^2$. Nicméně, produkce spor na mm^2 byla téměř srovnatelná pro oba druhy.



Graf 1 - Velikost kultur (mm^2) vybraných druhů entomopatogenních a mykoparazitických hub po 21. dnech kultivace

7.1 Charakteristika růstu a vývoje vybraných druhů původců onemocnění rostlin

Základní údaje k pokusu:

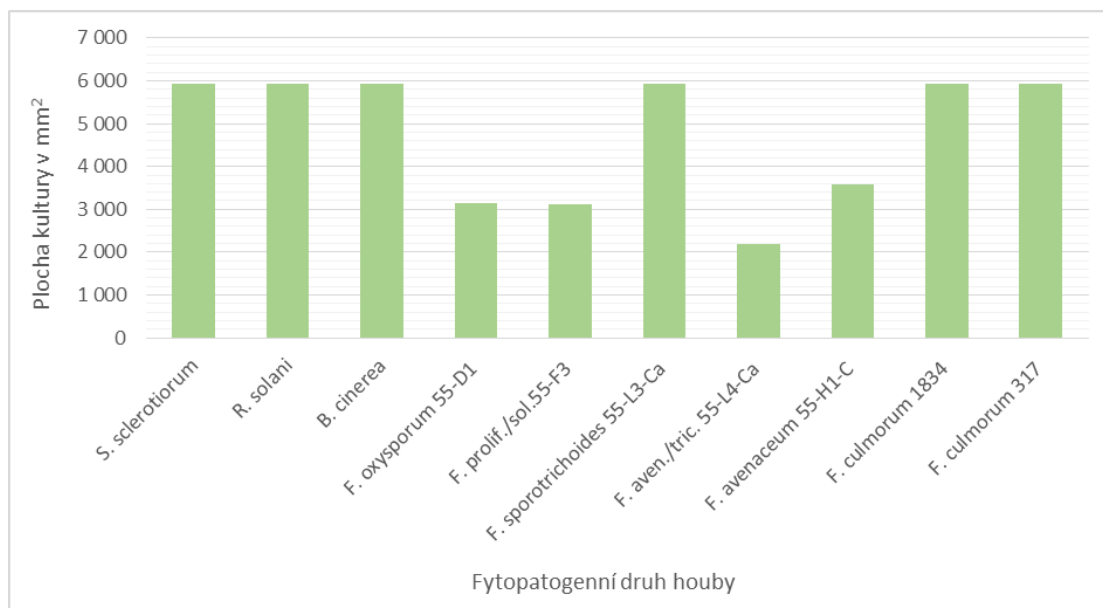
- ✓ vyříznuté bločky fytopatogenních hub o průměru 10 mm byly umístěny po jednom do středu Petriho misky s umělým živným médiem PDA
- ✓ Petriho misky byly vloženy do plastických sáčků a kultivovány v termostatu při teplotě 25±1 °C
- ✓ radiální růst a produkce spor byla hodnocena po 7 dnech
- ✓ pro hodnocení byl proveden přepočít na plochu kultury v mm²a produkci spor na 1 mm²

Růstové a produkční vlastnosti původců onemocnění rostlin byly hodnoceny pomocí středových kultur. Po 14 dnech kultivace velká část testovaných fytopatogenních druhů dosáhla okraje misky. Plocha kultury byla tak stanovena na 5 944,67 mm². Ostatní patogeny jsou pomaleji rostoucí, kde plocha kultury se pohybovala od 2 189,52 mm² do 3 579,42 mm².

| Druh fytopatogenu | Plocha kultury mm ² | Produkce spor 1 mm ² |
|---|--------------------------------|---------------------------------|
| <i>S. sclerotiorum</i> | 5 944,67±0,00 | - |
| <i>R. solani</i> | 5 944,67±0,00 | - |
| <i>B. cinerea</i> | 5 944,67±0,00 | 1,46 x 10 ³ |
| <i>F. oxysporum</i> kmen 55-D1 | 3 142,80±194,41 | 2,15 x 10 ⁵ |
| <i>F. proliferatum/solani</i> kmen 55-F3 | 3 113,95±83,65 | 1,08 x 10 ⁵ |
| <i>F. sporotrichoides</i> kmen 55-L3-Ca | 5 944,67±0,00 | 1,16 x 10 ⁴ |
| <i>F. avenaceum/tricintum</i> kmen 55-L4-Ca | 2 189,52±239,63 | 1,29 x 10 ³ |
| <i>F. avenaceum</i> kmen 55-H1-C | 3 579,42±89,99 | 2,20 x 10 ⁴ |
| <i>F. culmorum</i> kmen 1834 | 5 944,67±0,00 | 4,84 x 10 ³ |
| <i>F. culmorum</i> kmen 317 | 5 944,67±0,00 | 6,73 x 10 ¹ |

Tabulka 5 - Charakteristika druhů/kmenů fytopatogenních druhů hub

Po hodnocení růstových vlastností byla stanovena výtěžnost spor přepočtená na 1 mm². Největší množství spor vyprodukoval fytopatogen *F. oxysporum* (kmen 55-D1) a naopak nejmenší produkce spor byla zaznamenána u druhu *F. culmorum* kmene 317. U ostatních druhů se produkce spor na 1 mm² pohybovala od 1,29 x 10³ do 1,08 x 10⁵. Druh *S. sclerotiorum* a *R. solani* neprodukují žádné spory



Graf 2 - Porovnání plochy kultury u jednotlivých druhů/kmenů vybraných fytopatogenních druhů hub

7.2 Interakce entomopatogenních hub s fytopatogenními druhy

Základní údaje k pokusu:

- ✓ suspenze kmenů entomopatogenních hub o standardním titru $1,00 \times 10^7$ v 1 ml byla nanášena pomocí inokulační kličky ve formě jedné kapky na okraj Petriho misky (pro variantu *S. sclerotiorum*) nebo byla suspenze nanášena ve formě kapek na čtyři protilehlé okraje Petriho misky s umělým živným médiem PDA (čtyři druhy entomopatogenních hub)
- ✓ po zaschnutí kapky byly Petriho misky vloženy v plastických sáčcích a kultivovány v termostatu při teplotě 25 ± 1 °C
- ✓ po 7 dnech byl na každou variantu s entomopatogenní houbou umístěn terčík fytopatogenního druhu houby doprostřed Petriho misky (testováno 10 fytopatogenů)
- ✓ zároveň patogen *S. sclerotiorum* byl umístěn na protilehlý okraj misky s entomopatogenním druhem houby (duální test)
- ✓ pro každou variantu byly připraveny 3 opakování
- ✓ po 7 dnech od umístění terčíku fytopatogenu byl: a) měřen radiální růst středových kultur fytopatogenu (pro hodnocení inhibice růstu); b) měřena antagonistická zóna vzniklá mezi entomopatogenním a fytopatogenním druhem houby; c) stanovena produkce spor u druhu *B. bassiana* a *I. fumosorosea* na 1 mm^2

jedné kultury v kombinaci s fytopatogeny a zároveň stanovení produkce fytopatogenů; d) hodnocen růst a vývoj sklerocií *S. sclerotiorum*

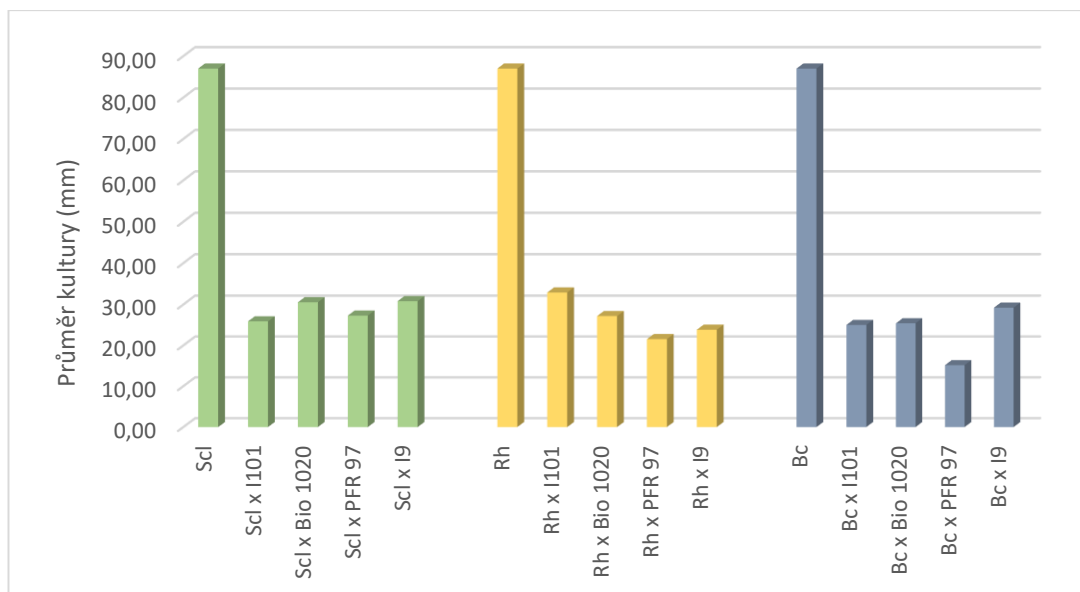
7.2.1 Inhibice růstu fytopatogenních druhů hub

Vliv entomopatogenních hub na růst a vývoj fytopatogenních druhů hub byl sledován ve vzájemných interakcích, kdy se nejdříve inokulovaly entomopatogenní houby do čtyř bodů Petriho misky (90 mm) a po 14 dnech se do středu vložil terčik nebo kapka suspenze fytopatogenu. Vliv EPF na růst patogenů byl sledován po 7 dnech od umístění terčíku fytopatogenu.

| | <i>B. bassiana</i> | <i>M. brunneum</i> | <i>I. fumosorosea</i> | <i>A. attenuatus</i> |
|---|--------------------|--------------------|-----------------------|----------------------|
| <i>S. sclerotiorum</i> | 70,23 | 64,90 | 68,61 | 64,55 |
| <i>R. solani</i> | 62,16 | 68,74 | 75,22 | 72,59 |
| <i>Botrytis cinerea</i> | 71,23 | 70,77 | 82,56 | 66,39 |
| <i>F. oxysporum</i> kmen 55-D1 | 53,85 | 64,11 | 67,28 | 60,31 |
| <i>F. proliferatum/so-</i> <i>lani</i> kmen 55-F3 | 54,52 | 66,83 | 72,09 | 66,62 |
| <i>F. sporotrichoides</i> kmen 55-L3-Ca | 68,30 | 74,19 | 86,45 | 71,62 |
| <i>F. avenaceum/tricin-</i> <i>tum</i> kmen 55-L4-Ca | 48,32 | 57,45 | 68,97 | 54,77 |
| <i>F. avenaceum</i> kmen 55-H1-C | 62,58 | 64,72 | 80,77 | 61,42 |
| <i>F. culmorum</i> kmen CF 317 | 69,62 | 73,15 | 81,72 | 77,26 |
| <i>F. culmorum</i> kmen CCF 1834 | 72,23 | 72,22 | 86,03 | 71,82 |

Tabulka 6 - Inhibice růstu (%) fytopatogenních druhů hub v kombinaci s entomopatogenními druhy, 7. den

Radiální růst ukazuje, že dochází k inhibici růstu všech fytopatogenních druhů. Některé druhy fytopatogenních hub jsou rychle rostoucí druhy, což je prokázáno v kontrolních variantách. V grafech vždy znázorněno prvním sloupcem s kódem fytopatogenu. Jedná se o kontrolu, kde fytopatogen není ovlivněn žádným jiným druhem houby. Kolonizace prostředí tak značí, že některé patogeny mohou způsobovat pro okolní rostliny v půdě problém a v případě přítomnosti klíčících rostlin mohou způsobovat jejich padání.



Graf 3 - Porovnání průměru středových kultur fytopatogenních druhů *S. sclerotiorum*, *R. solani* a *B. cinerea* v kontrolní variantě a v kombinaci s entomopatogenními druhy, 7. den

Z grafu je patrné, že všechny tři fytopatogeny *S. sclerotiorum*, *R. solani* a *B. cinerea* dosáhly v kontrolní variantě okraje Petriho misky. V případě použití většího rozměru Petriho misky by se dále rozrůstaly. Entomopatogenní houby inhibovaly růst patogenu *S. sclerotiorum*, nejmenší redukce růstu *S. sclerotiorum* byla zaznamenána v kombinaci s druhem *M. brunneum* (64,90% inhibice) a *A. attenuatus* (64,55% inhibice), zatímco největší redukce růstu patogenu 70,23 % byla zaznamenána v kombinaci s *B. bassiana*.

U patogenu *R. solani* vykazovala entomopatogenní houba *I. fumosorosea* největší redukci růstu tohoto fytopatogenu. Inhibice byla více než 75 %. Zároveň druh *A. attenuatus* způsobil velkou inhibici růstu (72,59 %). Nejméně byl růst *R. solani* ovlivněn druhem *B. bassiana*, zde byla zaznamenána inhibice téměř o 13 % menší než u *I. fumosorosea*.

| Varianta | Fytopatogenní druh | | |
|--------------------|------------------------|------------------|-------------------|
| | <i>S. sclerotiorum</i> | <i>R. solani</i> | <i>B. cinerea</i> |
| Kontrola | 87.00±0.00 c | 87.00±0.00 d | 87.00±0.00 d |
| <i>B. bassiana</i> | 25.90±2.98 b | 32.92±0.35 c | 25.03±1.69 a |

| | | | |
|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <i>M. brunneum</i> | 30.54±0.66 a | 27.20±1.37 b | 25.43±1.37 a |
| <i>I. fumosorosea</i> | 27.31±3.26 ab | 21.56±2.48 a | 15.17±0.57 b |
| <i>A. attenuatus</i> | 30.84±1.30 a | 23.85±1.16 a | 29.45±0.81 c |
| | F=4.336; df=4,20; p=0.0000 | F=1.903; df=4,20; p=0.0000 | F=1.140; df=4,20; p=0.0000 |

Tabulka 7 - Vliv entomopatogenních hub na růst a velikost kolonie vybraných fytopatogenů, průměr kultury (mm) fytopatogenu, 7. den

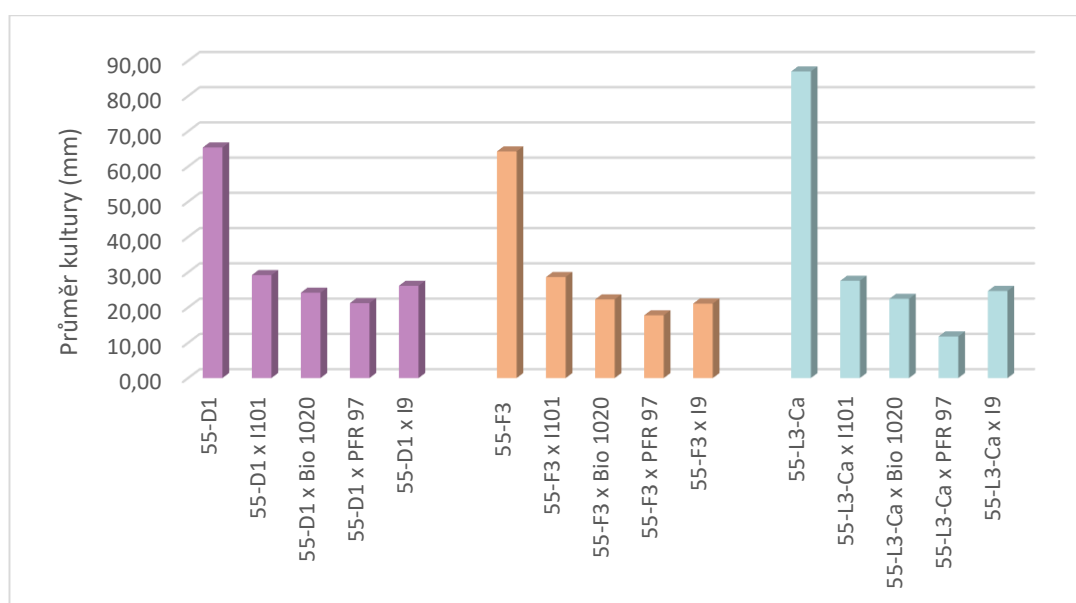
Entomopatogenní houby *I. fumosorosea*, *B. bassiana* a *M. brunneum* byly účinné v potlačení růstu a vývoje patogenu *B. cinerea*. Největší inhibici však způsobila houba *I. fumosorosea*, kde byla dosažena inhibice 82,56 %. V kontrolních variantách kolonizovaly fytopatogeny po 7 dnech celou Petriho misku, zatímco v kombinaci byla zaznamenána u fytopatogenů výrazná inhibice růstu. Ovlivnění růstu způsobené druhy entomopatogenních hub bylo statisticky významné.

| Varianta | Fytopatogenní druh | | |
|-----------------------|-----------------------------------|---|--|
| | <i>F. oxysporum</i> kmen 55-D1 | <i>F. proliferatum/so-</i> <i>lani</i> kmen 55-F3 | <i>F. sporotrichoides</i> kmen 55-L3-Ca |
| Kontrola | 65.42±0.94 d | 64.28±0.83 d | 87.00±0.00 d |
| <i>B. bassiana</i> | 29.19±1.42 c | 28.63±1.17 c | 27.58±1.78 c |
| <i>M. brunneum</i> | 24.21±2.57 ab | 22.30±0.26 a | 22.46±2.58 a |
| <i>I. fumosorosea</i> | 21.31±1.08 a | 17.78±0.71 b | 11.79±0.48 b |
| <i>A. attenuatus</i> | 26.15±1.54 bc | 21.11±0.76 a | 24.69±1.7 a |
| | F=2.611; df=4,20; p=0.0000 | F=0.641; df=4,20; p=0.0000 | F=1.140; df=4,20; p=0.0000 |

Tabulka 8 - Vliv entomopatogenních hub na růst a velikost kolonie vybraných fytopatogenů rodu *Fusarium* spp., průměr kultury (mm) fytopatogenu, 7. den

Houby rodu *Fusarium* spp. jsou druhy, mezi kterými je rozdíl v jejich růstu a tím i kolonizaci půdního prostředí. Entomopatogenní houby ovlivňovaly růst a vývoj fytopatogenu *F. oxysporum* (kmen 55-D1), který způsobuje ucpávání cévních svazků. Nejmenší redukce v růstu fytopatogenu způsobila houba *B. bassiana* (53,85% inhibice) a *A. attenuatus* (60,31% inhibice). Nejvíce ovlivnila růst houba *I. fumosorosea*.

V kontrolní variantě vytvořil kmen *F. oxysporum* kolonii o průměru 65,42 mm, obdobnou velikost způsobil patogen *F. proliferatum/solani* (64,28 mm). Entomopatogenní houby způsobily u *F. proliferatum/solani* větší inhibici růstu ve srovnání s předchozím patogenem. Opět nejvíce redukovala růst fytopatogenu entomopatogenní houba *I. fumosorosea* (72,09% inhibice). Houba *B. bassiana* inhibovala růst nejméně (54,52% inhibice). Druh *F. sporotrichoides* kolonizoval Petriho misku velmi rychle, po 7 dnech dosáhla kultura jejích okrajů. U tohoto druhu patogenu způsobila opět houba *I. fumosorosea* největší redukci v růstu (86,45% inhibice). V rámci této kombinace nebyla kultura patogenu schopna téměř růstu. Ostatní tři druhy redukovaly růst méně, inhibice se pohybovala v rozmezí od 68,30 % do 74,19 %). Entomopatogenní houby statisticky ovlivnily růst všech tří výše uvedených fytopatogenních druhů hub rodu *Fusarium* spp..

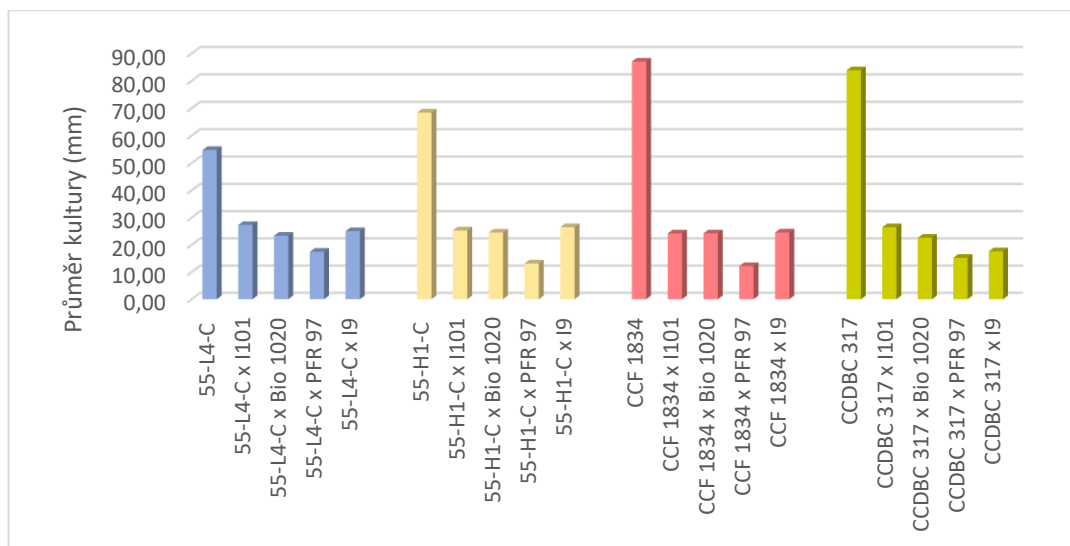


Graf 4 - Porovnání průměru středových kultur fytopatogenních druhů *F. oxysporum*, *F. proliferatum/solani* a *F. sporotrichoides* v kontrolní variantě a v kombinaci s entomopatogenními druhy

| Varianta | Fytopatogenní druh | | | |
|---------------------------------------|--|-------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | <i>F. aven./tric.</i> kmen 55-L4-Ca | <i>F. avenaceum</i> kmen 55-H1-C | <i>F. culmorum</i> kmen 317 | <i>F. culmorum</i> kmen 1834 |
| Kontrola | 54.74±0.83 d | 68.42±0.89 d | 83.85±1.87 c | 87.00±0.00 c |
| <i>B. bassiana</i> kmen CCM 8382 | 27.26±2.23 b | 25.26±0.45 ab | 26.43±2.05 b | 24.16±1.80 a |
| <i>M. brunneum</i> kmen F52 | 23.31±0.36 a | 24.48±0.67 a | 22.56±1.21 b | 24.17±1.56 a |
| <i>I. fumosorosea</i> kmen PFR 97 | 17.43±1.79 c | 13.12±0.86 c | 15.90±3.05 a | 12.15±0.51 b |
| <i>A. attenuatus</i> kmen CCM 9195 | 25.01±0.97 ab | 26.46±1.18 b | 17.59±0.70 a | 24.51±2.54 a |
| | F=1.989; df=4,20; p=0.0000 | F=0.715; df=4,20; p=0.0000 | F=3.798; df=4,20; p=0.0000 | F=2.471; df=4,20; p=0.0000 |

Tabulka 9 - Vliv entomopatogenních hub na růst a velikost kolonie vybraných fytopatogenů rodu *Fusarium* spp., průměr kultury (mm) fytopatogenu, 7. den

Druh *F. avenaceum/tricintum* vykazoval ze všech hub rodu *Fusarium* spp. nejpomalejší růst. V kontrolní variantě vytvořila houba kulturu o průměru 54,74 mm. Nejpomaleji se vyvíjel patogen v kombinaci s entomopatogenní houbou *I. fumosorosea*. Inhibice růstu byla téměř 69 %. Nejméně ovlivňovala růst patogenu houba *B. bassiana*, zde houba inhibovala růst jen ze 48,32 %. Téměř stejně inhibovaly růst patogenu druhy *M. brunneum* (57,45% inhibice) a *A. attenuatus* (54,77% inhibice). Druh *F. avenaceum* patří také mezi pomaleji rostoucí druhy v in vitro systémech. Velikost kolonie v kontrolní variantě dosáhla velikosti 68,42 mm. I u tohoto fytopatogenu ovlivnil druh entomopatogenní houby *I. fumosorosea* růst a vývoj. Ostatní druhy entomopatogenních hub vykazaly vyrovnané výsledky v inhibici růstu středové kultury *F. avenaceum*, inhibice se pohybovala od 61,42 % do 64,72 %.



Graf 5 - Porovnání průměru středových kultur fytopatogenních druhů *F. avenaceum/tricintum*, *F. avenaceum*, a dvěma druhy *F. culmorum* v kontrolní variantě a v kombinaci s entomopatogenními druhy

Druh *F. culmorum* kmen 1834 dosáhl po 7 dnech okraje misky. V testovaných variantách všechny druhy entomopatogenních hub redukovaly růst kmene. Opět se ukázalo, že druh *I. fumosorosea* je nejúčinnější vůči tomuto kmenu 1834. Kmen 317 houby *F. culmorum* byl nejméně ovlivněn působením houby *B. bassiana*, redukce byla téměř 70%, nicméně nejvíce růst tohoto kmene redukovala opět houba *I. fumosorosea* (81,72 %) spolu s *A. attenuatus* (77,26 %). Ve srovnání s růstem fytopatogenů v kontrolních variantách je patrné, že entomopatogenní houby výrazně statisticky ovlivnily jejich růst.

a) *Antagonismus mezi entomopatogenními a fytopatogenními druhy hub*

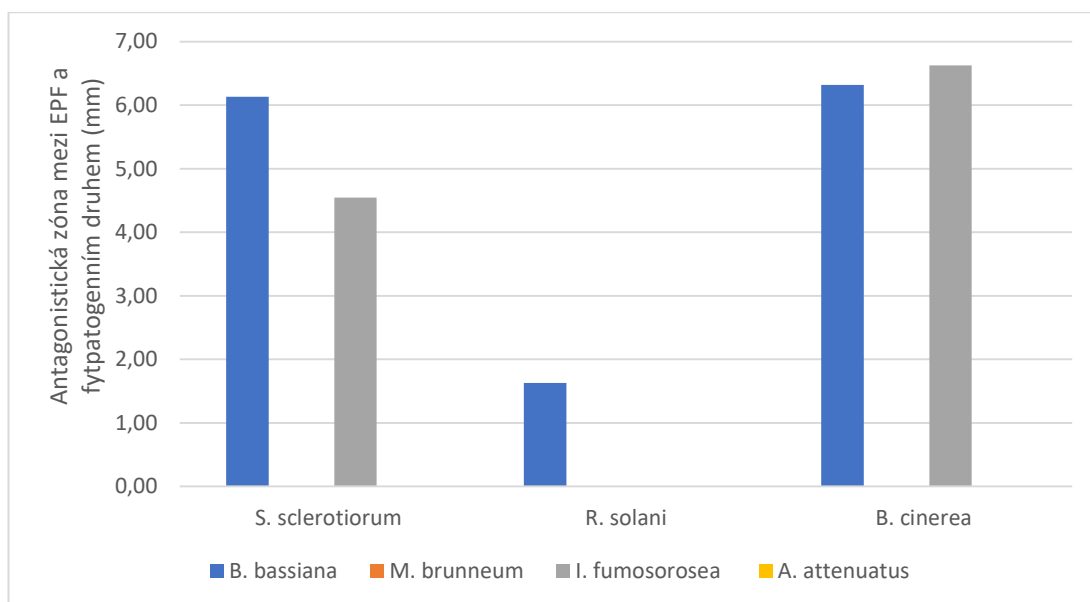
| | Fytopatogenní druh | | | | |
|---------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | <i>S. sclerotiorum</i> | <i>R. solani</i> | <i>B. cinerea</i> | <i>F. oxysporum</i> 55-D1 | <i>F. proliferans</i> 55-F3 |
| <i>B. bassiana</i> kmen I101 | 6.14±0.97 c | 1.63±0.28 b | 6.32±0.67 b | 3.83±0.80 b | 4.92±0.65 c |
| <i>M. brunneum</i> kmen F52 | 0.00±0.00 a | 0.00±0.00 a | 0.00±0.00 a | 1.09±0.52 a | 0.42±0.22 a |
| <i>I. fumosorosea</i> kmen PFR 97 | 4.55±1.34 b | 0.00±0.00 a | 6.63±0.63 b | 4.09±0.73 b | 6.16±1.39 d |
| <i>A. attenuatus</i> kmen CCM 9195 | 0.00±0.00 a | 0.00±0.00 a | 0.00±0.00 a | 0.81±0.45 a | 2.61±0.58 b |
| | F=0.7217; df=3,32; p=0.0000 | F=0.0192; df=3,32; p=0.0000 | F=0.2082; df=3,32; p=0.0000 | F=0.4141; df=3,32; p=0.0000 | F=0.3833; df=3,32; p=0.0000 |

Tabulka 10 - Statistické hodnocení zóny antagonismu mezi 4 kulturami entomopatogenních hub a fytopatogenním druhem uprostřed

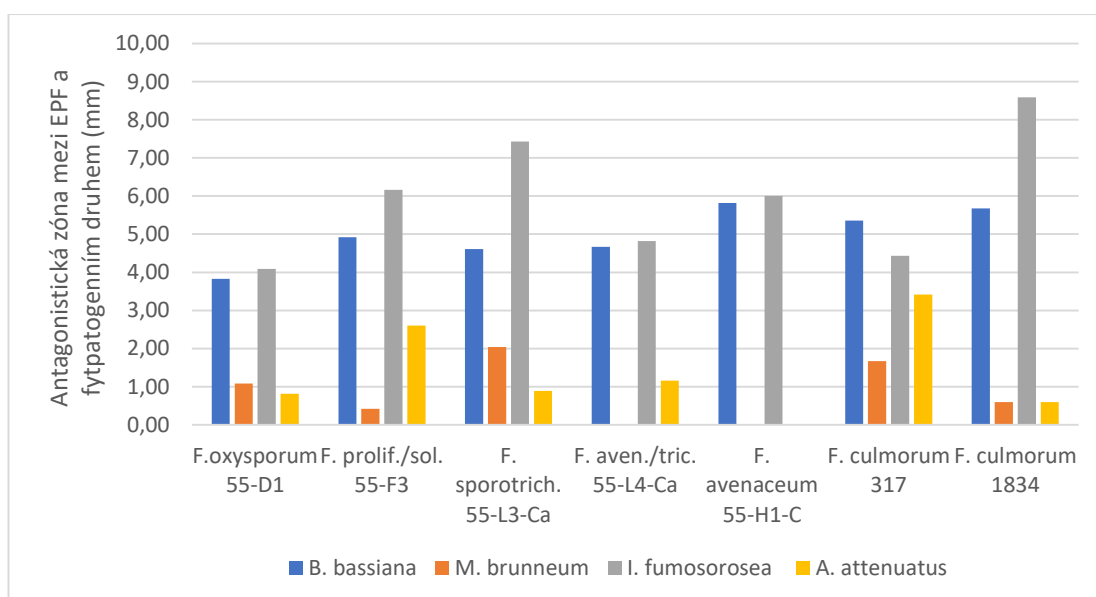
| | Fytopatogenní druh | | | | |
|--|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | <i>F. sporotrich.</i> 55-L3-Ca | <i>F. aven./tric.</i> 55-L4-Ca | <i>F. avenaceum</i> 55-H1-C | <i>F. culmorum</i> 317 | <i>F. culmorum</i> 1834 |
| <i>B. bassiana</i> kmen I101 | 4.61±0.79 b | 4.67±1.33 b | 5.82±0.72 b | 5.36±0.68 b | 5.67±1.28 b |
| <i>M. brunneum</i> kmen F52 | 2.04±1.69 a | 0.00±0.00 a | 0.00±0.00 a | 1.68±0.32 c | 0.59±0.44 a |
| <i>I. fumosorosea</i> kmen PFR 97 | 7.43±0.92 c | 4.82±2.04 b | 6.01±2.06 b | 4.43±1.75a b | 8.58±1.45 c |
| <i>A. attenuatus</i> kmen CCM 9195 | 0.89±0.49 a | 1.16±1.34 a | 0.00±0.00 a | 3.41±1.29 a | 0.60±0.56 a |
| | F=1.1442; df=3,32; p=0.0000 | F=1.9340; df=3,32; p=0.0000 | F=1.1882; df=3,32; p=0.0000 | F=0.4141; df=3,3;p=0. 0000 | F=1.0620; df=3,3; p=0.0000 |

Tabulka 11 - Statistické hodnocení zóny antagonismu mezi 4 kulturami entomopatogenních hub a fytopatogenním druhem uprostřed (pokračování tabulky)

V pokusu byla sledována interakce mezi entomopatogenními druhy hub a druhy hub způsobující onemocnění rostlin. Z výsledků vyplývá, že entomopatogenní houby vykazují antagonistický efekt na vybrané druhy fytopatogenů. Největší antagonistický efekt vykazuje entomopatogenní houba *I. fumosorosea* a *B. bassiana* u všech fytopatogenů s výjimkou *I. fumosorosea* versus *R. solani*.



Graf 6 - Antagonistická zóna medzi entomopatogennými houbami a fytopatogenným druhom (4 kultury EPF)



Graf 7 - Antagonistická zóna medzi entomopatogennými houbami a fytopatogenným druhom hub rodu *Fusarium* spp. (4 kultury EPF)

Druhy *S. sclerotiorum*, *R. solani* a *B. cinerea* nebyly nikterak potlačený druhy entomopatogenných hub *M. brunneum* a *A. attenuatus*. U hub rodu *Fusarium* byla zaznamenána i antagonistická zóna způsobená druhy *M. brunneum* a *A. attenuatus*. Zóny

byly sice slabé, ale entomopatogenní houby nedovolily kolonizovat prostředí. Druh *M. brunneum* nevykázal žádný antagonistický efekt na *Fusarium avenaceum/titicinum* kmen 55-L4-Ca a na *F. avenaceum* kmen 55-H1-C. Tento kmen nebyl také ovlivněn entomopatogenní houbou *A. attenuatus*. Vliv entomopatogenních hub na konkrétní druhy fytopatogenů byl ve všech případech statisticky průkazný.

b) Vzájemný vliv entomopatogenních hub a fytopatogenních druhů na produkci spor

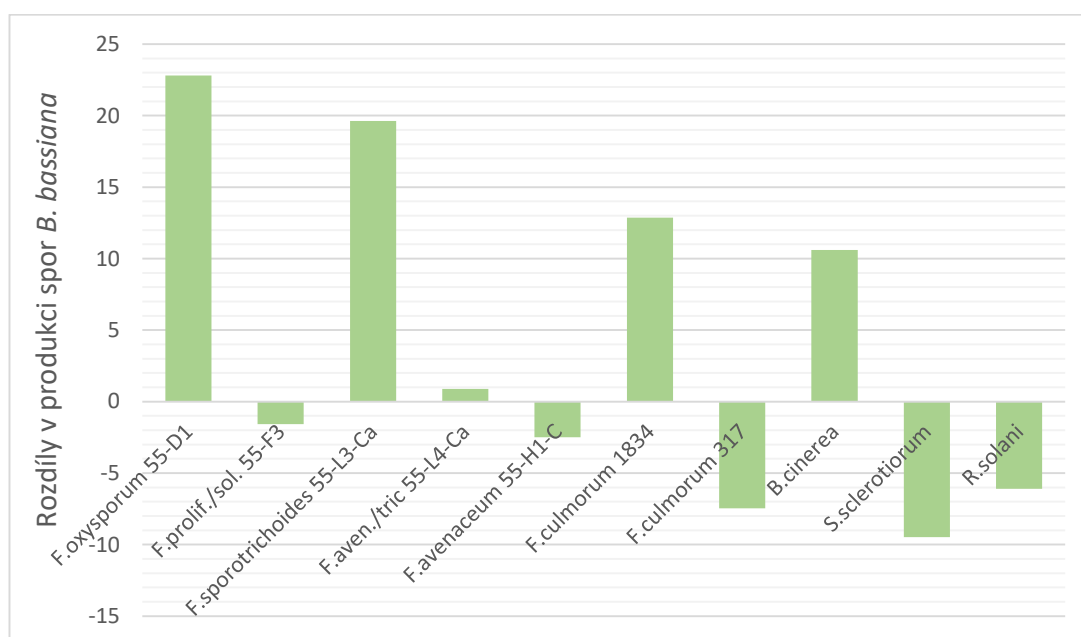
Ovlivnění produkce spor *B. bassiana* a fytopatogenů při vzájemné interakci

| | Produkce spor <i>B. bassiana</i> |
|---|---|
| Kontrola | 4,43±0,11 x 10 ⁶ |
| <i>S. sclerotiorum</i> | 4,01±0,12 x 10 ⁶ |
| <i>R. solani</i> | 4,16±0,14 x 10 ⁶ |
| <i>Botrytis cinerea</i> | 4,90±0,12 x 10 ⁶ |
| <i>F. oxysporum</i> kmen 55-D1 | 5,44±0,01 x 10 ⁶ |
| <i>F. proliferatum/solani</i> kmen 55-F3 | 4,36±0,06 x 10 ⁶ |
| <i>F. sporotrichoides</i> kmen 55-L3-Ca | 5,30±0,11 x 10 ⁶ |
| <i>F. avenaceum/tricintum</i> kmen 55-L4-Ca | 4,47±0,12 x 10 ⁶ |
| <i>F. avenaceum</i> kmen 55-H1-C | 4,32±0,09 x 10 ⁶ |
| <i>F. culmorum</i> kmen CCF 1834 | 5,00±0,14 x 10 ⁶ |
| <i>F. culmorum</i> kmen CF 317 | 4,10±0,10 x 10 ⁶ |

Tabulka 12 - Produkce spor *B. bassiana* na 1 mm² v interakci s fytopatogenními druhy hub (14. den, 25 °C)

V tabulce a grafu je zaznamenána výtěžnost spor entomopatogenní houby *B. bassiana* v interakci s vybranými druhy fytopatogenních hub. V kontrolní variantě vyprodukovala *B. bassiana* 4,43 x 10⁶ spor na 1 mm² kultury. Některé fytopatogenní

druhy/kmeny měly vliv na nárůst produkce spor *B. bassiana*. Nejlépe stimuloval k navýšení produkce spor druh *F. oxysporum* a *F. sporotrichoides*. Naopak některé druhy fytopatogenních druh potlačily sporulaci entomopatogenní houby *B. bassiana*. K výrazné redukci spor docházelo v kombinaci s patogenem *S. sclerotiorum*, *F. culmorum* kmen 317 a *R. solani*.

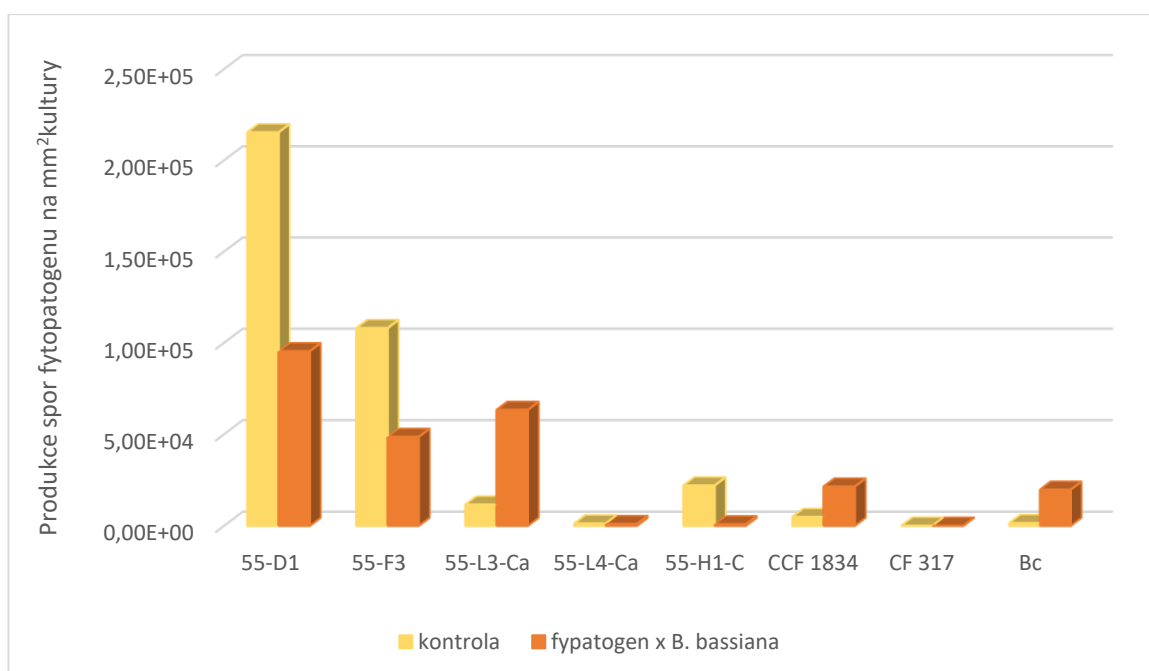


Graf 8 - Procentické vyjádření rozdílů v produkci spor *B. bassiana* na 1 mm² v interakci s fytopatogenními druhy hub (14. den, 25 °C)

V rámci experimentu byla hodnocena i produkce spor fytopatogenních druhů jak v kontrolní variantě, tak i v interakci s entomopatogenní houbou *B. bassiana*. U některých druhů/kmenů fytopatogenních hub je patrné, že měla houba *B. bassiana* vliv na snížení produkce jejich spor. K výrazné redukci tvorby spor o cca – 55 % došlo u druhů/kmenů *F. culmorum* a *F. proliferatum/solani*. U *F. avenaceum* došlo k 96 % redukci tvorby spor. Kmen 317 houby *F. culmorum* nedošlo v kombinaci s *B. bassiana* k žádné produkci spor. Naopak, produkce spor u druhu *B. cinerea* byla významně stimulována entomopatogenní houbou *B. bassiana*. Ke stimulaci tvorby spor došlo i u kmene 1834 houby *F. culmorum* a druhu *F. sporotrichoides*.

| Druh fytopatogenu | Kontrola | Produkce v interakci s <i>B. bassiana</i> |
|---|--------------------|---|
| <i>B. cinerea</i> | $1,46 \times 10^3$ | $1,97 \times 10^4$ |
| <i>F. oxysporum</i> kmen 55-D1 | $2,15 \times 10^5$ | $9,53 \times 10^4$ |
| <i>F. proliferatum/solani</i> kmen 55-F3 | $1,08 \times 10^5$ | $4,86 \times 10^4$ |
| <i>F. sporotrichoides</i> kmen 55-L3-Ca | $1,16 \times 10^4$ | $6,33 \times 10^4$ |
| <i>F. avenaceum/tricintum</i> kmen 55-L4-Ca | $1,29 \times 10^3$ | $9,67 \times 10^2$ |
| <i>F. avenaceum</i> kmen 55-H1-C | $2,20 \times 10^4$ | $7,98 \times 10^2$ |
| <i>F. culmorum</i> kmen 1834 | $4,84 \times 10^3$ | $2,14 \times 10^4$ |
| <i>F. culmorum</i> kmen 317 | $6,73 \times 10^1$ | $0,00 \times 10^0$ |

Tabulka 13 - Produkce spor fytopatogenních druhů hub v interakci s entomopatogenní houbou *B. bassiana*



Graf 9 - Rozdíl v produkci spor fytopatogenních druhů v kontrolní variantě a v interakci s *B. bassiana*

Ovlivnění produkce spor *I. fumosorosea* a fytopatogenů při vzájemné interakci

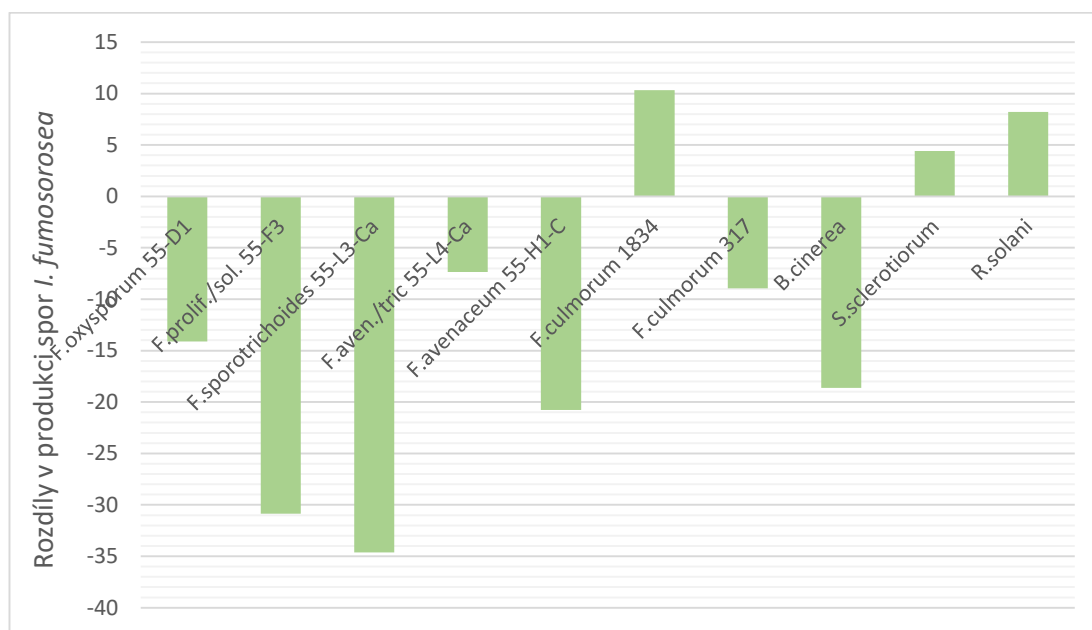
V rámci experimentů byla sledována i produkce spor entomopatogenní houby *I. fumosorosea* v interakci s vybranými fytopatogeny. V kontrolní variantě vyprodukovala *I. fumosorosea* $6,36 \times 10^5$ spor na 1 mm^2 kultury. Pouze tři fytopatogeny pozitivně ovlivnily produkci spor u *I. fumosorosea*. Ke stimulaci spor docházelo v kombinaci s patogenem *S. sclerotiorum*, *F. culmorum* kmen 1834 a *R. solani*. Ostatní fytopatogeny negativně ovlivnily produkci spor entomopatogenní houby *I. fumosorosea*. Největší pokles v produkci způsobil druh *F. sporotrichoides* (-34,64% redukce) a *F. proliferatum/solani* (-30,85% redukce).

| | Produkce spor <i>I. fumosorosea</i> |
|---|-------------------------------------|
| Kontrola | $6,36 \pm 0,05 \times 10^5$ |
| <i>S. sclerotiorum</i> | $6,64 \pm 0,05 \times 10^5$ |
| <i>R. solani</i> | $6,88 \pm 0,06 \times 10^5$ |
| <i>Botrytis cinerea</i> | $5,18 \pm 0,07 \times 10^5$ |
| <i>F. oxysporum</i> kmen 55-D1 | $5,46 \pm 0,06 \times 10^5$ |
| <i>F. proliferatum/solani</i> kmen 55-F3 | $4,40 \pm 0,08 \times 10^5$ |
| <i>F. sporotrichoides</i> kmen 55-L3-Ca | $4,16 \pm 0,06 \times 10^5$ |
| <i>F. avenaceum/tricintum</i> kmen 55-L4-Ca | $5,89 \pm 0,05 \times 10^5$ |
| <i>F. avenaceum</i> kmen 55-H1-C | $5,04 \pm 0,07 \times 10^5$ |
| <i>F. culmorum</i> kmen CCF 1834 | $7,02 \pm 0,09 \times 10^5$ |
| <i>F. culmorum</i> kmen CF 317 | $5,79 \pm 0,07 \times 10^5$ |

Tabulka 14 - Produkce spor *I. fumosorosea* na 1 mm^2 v interakci s fytopatogenními druhy hub (14. den, 25 °C)

V rámci experimentu byla opět hodnocena i produkce spor fytopatogenních druhů jak v kontrolní variantě, tak i v interakci s entomopatogenní houbou *I. fumosorosea*. Druh *F. avenaceum/tricintum* a *F. culmorum* kmen 317 nebyl schopen produkovat žádné spory v kombinaci s *I. fumosorosea*. Došlo zde k 100% redukci. Houba *I. fumosorosea* redukovala také tvorbu produkce spor u druhu *F. proliferatum/solani* a *F. avenaceum*. Na druhou stranu houba *I. fumosorosea* stimulovala výraznou tvorbu spor u druhu *B. cinerea* a u kmene 1834 druhu *F. culmorum*. Druh *F. oxysporum* produkoval též

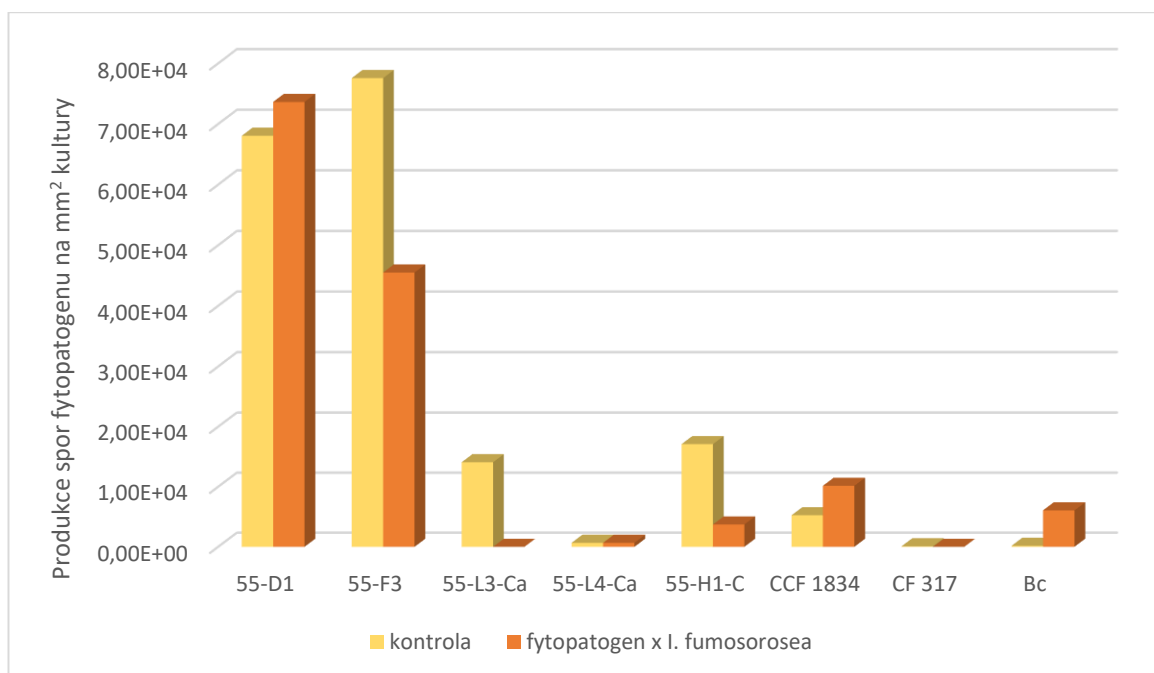
větší množství spor v interakci s *I. fumosorosea*, nicméně stimulace spor nebyla tak výrazná jako u výše uvedených druhů.



Graf 10 - Procentické vyjádření rozdílu v produkci spor *I. fumosorosea* na 1 mm² v interakci s fytopatogenními druhy hub (14. den, 25 °C)

| Druh fytopatogenu | Kontrola | Produkce v interakci s <i>I. fumosorosea</i> |
|---|--------------------|--|
| <i>B. cinerea</i> | $1,68 \times 10^2$ | $6,07 \times 10^3$ |
| <i>F. oxysporum</i> kmen 55-D1 | $6,81 \times 10^4$ | $7,36 \times 10^4$ |
| <i>F. proliferatum/solani</i> kmen 55-F3 | $7,76 \times 10^4$ | $4,55 \times 10^4$ |
| <i>F. sporotrichoides</i> kmen 55-L3-Ca | $1,41 \times 10^4$ | $0,00 \times 10^0$ |
| <i>F. avenaceum/tricintum</i> kmen 55-L4-Ca | $6,70 \times 10^2$ | $6,70 \times 10^2$ |
| <i>F. avenaceum</i> kmen 55-H1-C | $1,71 \times 10^4$ | $3,72 \times 10^3$ |
| <i>F. culmorum</i> kmen 1834 | $5,26 \times 10^3$ | $1,02 \times 10^4$ |
| <i>F. culmorum</i> kmen 317 | $8,41 \times 10^1$ | $0,00 \times 10^0$ |

Tabulka 15 - Produkce spor fytopatogenních druhů hub v interakci s entomopatogenní houbou *I. fumosorosea*

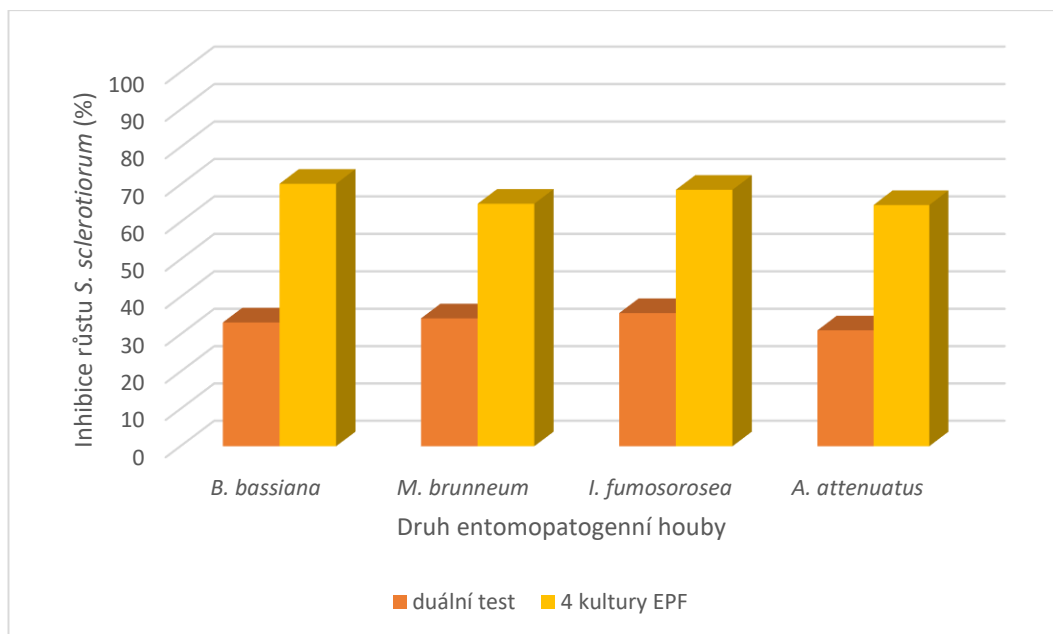


Graf 11 - Rozdíl v produkci spor fytopatogenních druhů v kontrolní variantě a v interakci s *I. fumosorosea*

c) Vliv entomopatogenních hub na růst a vývoj původce onemocnění bílé hniloby *S. sclerotiorum*

| | Duální test | | 4 kultury EPF | |
|---|---------------------|--------------|---------------------|--------------|
| | průměr kultury (mm) | Inhibice (%) | průměr kultury (mm) | Inhibice (%) |
| Kontrola <i>S. sclerotiorum</i> | 87.00±0.00 | 0 | 87.00±0.00 | 0 |
| <i>S. sclerotiorum</i> vers. <i>B. bassiana</i> CCM 8382 | 58.13±0.61 | 33 | 25.90±2.98 | 70 |
| <i>S. sclerotiorum</i> vers. <i>M. brunneum</i> kmen F52 | 57.17±0.74 | 34 | 30.54±0.66 | 65 |
| <i>S. sclerotiorum</i> vers. <i>I. fumosorosea</i> kmen PFR 97 | 55.95±2.29 | 36 | 27.31±3.26 | 69 |
| <i>S. sclerotiorum</i> vers. <i>A. attenuatus</i> kmen CCM 9195 | 59.95±0.27 | 31 | 30.84±1.30 | 65 |

Tabulka 16 - Průměry kultur a % inhibice růstu fytopatogenního druhu *S. sclerotiorum* v kombinaci s entomopatogenními druhy hub (duální test a test se 4 kulturami)

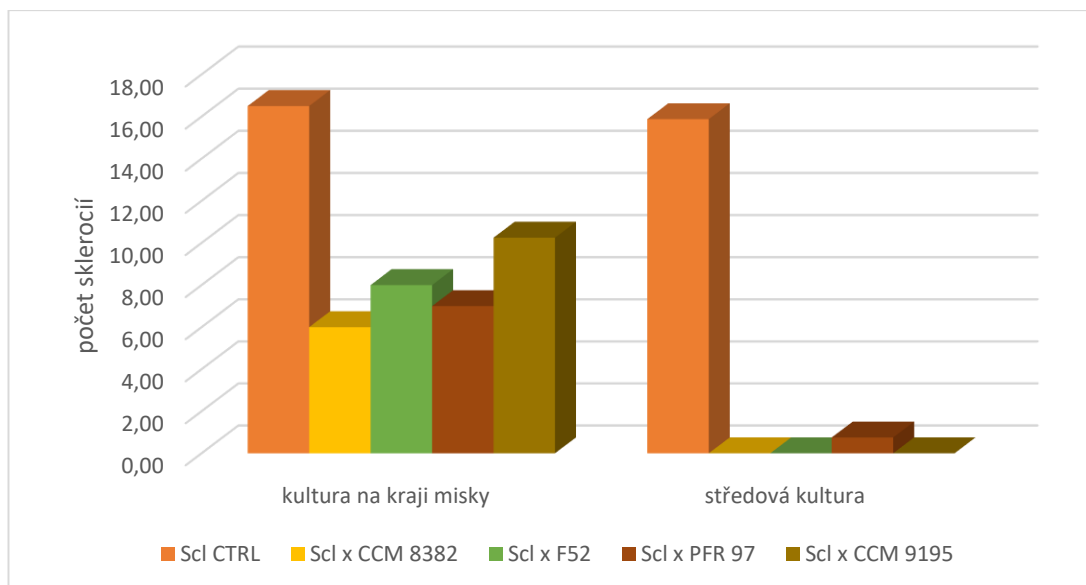


Graf 12 - Inhibice růstu fytopatogenního druhu *S. sclerotiorum* v duálním testu a testu se 4 kulturami entomopatogenních druhů hub

Růst a vývoj fytopatogenního druhu *S. sclerotiorum* byl testován v duálním testu a testu se 4 kulturami entomopatogenních hub. V duálním testu bylo dosaženo největší inhibice růstu *S. sclerotiorum* v kombinaci s houbou *I. fumosorosea* (36 %) a nejnižší inhibici způsobovala houba *A. attenuatus* (31 %). Při testu se 4 kulturami entomopatogenních hub byla středová kultura *S. sclerotiorum* výrazněji inhibována ve všech variantách. Téměř shodně inhibovaly houby *S. sclerotiorum* druhy *B. bassiana* a *I. fumosorosea* (70 a 69 %). Nižší inhibice (65%) byla dosažena druhy *M. brunneum* a *A. attentuatus*.

| | Kontrola | <i>B. bassiana</i> CCM 8382 | <i>M. brunneum</i> F52 | <i>I. fumosorosea</i> PFR 97 | <i>A.attenuatus</i> CCM 9195 |
|------------------|------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Duální test | 16,50±3,16 | 6,00±0,82 | 8,00±0,82 | 7,00±0,82 | 10,25±0,96 |
| Středová kultura | 15,88±3,27 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,75±0,95 | 0,00±0,00 |

Tabulka 17 - Vliv entomopatogenních hub na vývoj sklerocií fytopatogenní houby *S. sclerotiorum*, 10. den



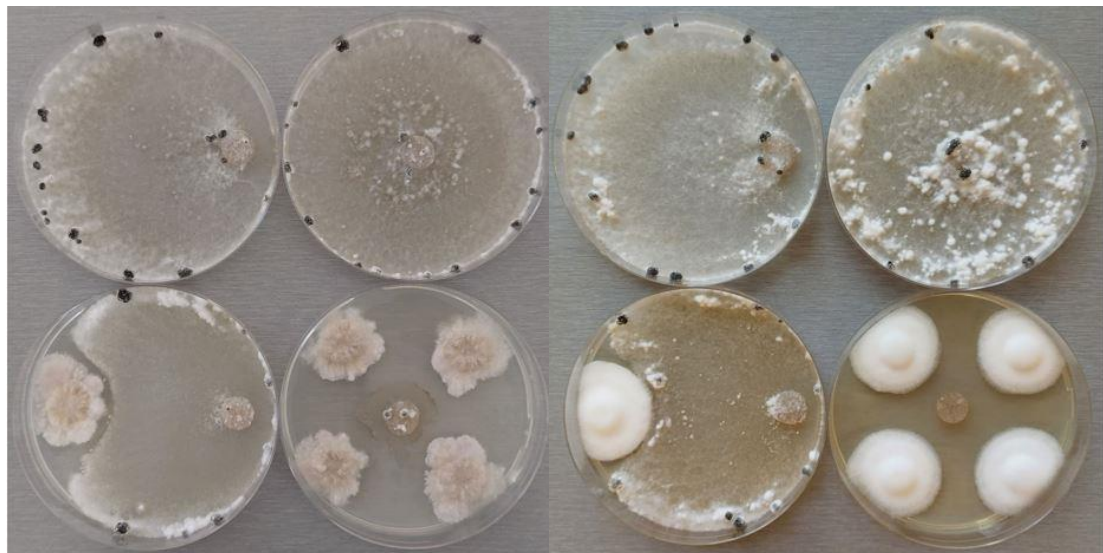
Graf 13 - Hodnocení počtu sklerocií houby *S. sclerotiorum*

Entomopatogenní houby inhibovaly tvorbu sklerocií v případě použití obou metod a to jak v duálním testu, kdy byl vždy jeden druh užitečného druhu houby na jednom okraji Petriho misky a proti němu byl na druhý okraj umístěn terčík *S. sclerotiorum*, tak i ve variantě, kdyby byly jednotlivě nainokulovány užitečné druhy hub do čtyř míst Petriho misky a bloček patogenu byl umístěn uprostřed Petriho misky. Při duálním testu byla největší redukce tvorby sklerocií způsobena entomopatogenní houbou *B. bassiana* a *I. fumosorosea*. Nejvíce sklerocií vytvořil patogen v kombinaci s *A. attenuatus*. V kontrolní variantě vytvořil patogen kolem 17 sklerocií, protože patogen *S. sclerotiorum* měl větší prostor ke kolonizaci v porovnání s druhou metodou. Menší redukci tvorby sklerocií způsobila houba *B. bassiana* v duálním testu, což je způsobeno možností kolonizace většího prostoru Petriho misky patogenem *S. sclerotiorum*. Při metodě, kde byl patogen umístěn do středu misky, docházelo k redukci růstu mycelia *S. sclerotiorum* a tím i tvorby sklerocií. Při této metodě nebyl patogen schopen vytvořit sklerocia. Pouze v kombinaci s *I. fumosorosea* byl ojediněle výskyt sklerocií patogenu zaznamenán.



B. bassiana vers. *S. sclerotiorum*

M. brunneum vers. *S. sclerotiorum*

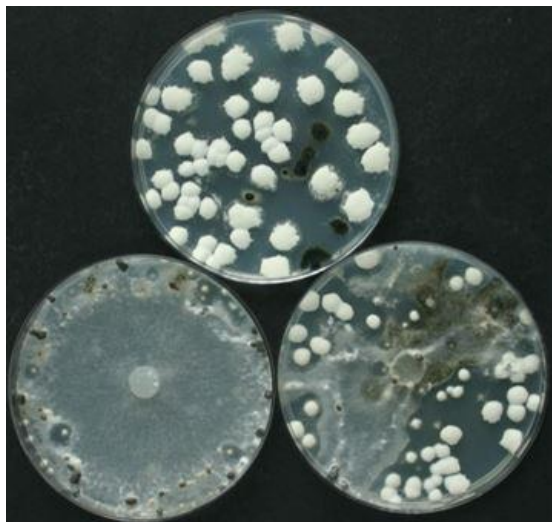


I. fumosorosea vers. *S. sclerotiorum*

A. attenuatus vers. *S. sclerotiorum*

Obrázek 1 - Vliv entomopatogenních hub na růst, vývoj a tvorbu sklerocií fytopatogenního druhu houby *S. sclerotiorum*

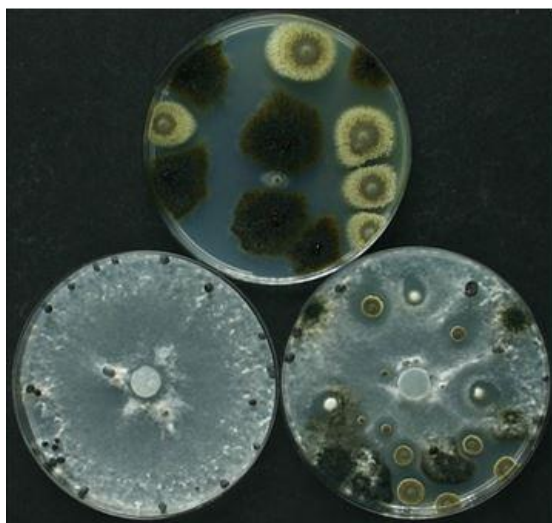
7.3 Hodnocení kompatibility entomopatogenními houbami, mykoparazitickou houbou *C. minitans* a fytopatogenní houbou *S. sclerotiorum* pomocí testu CFU



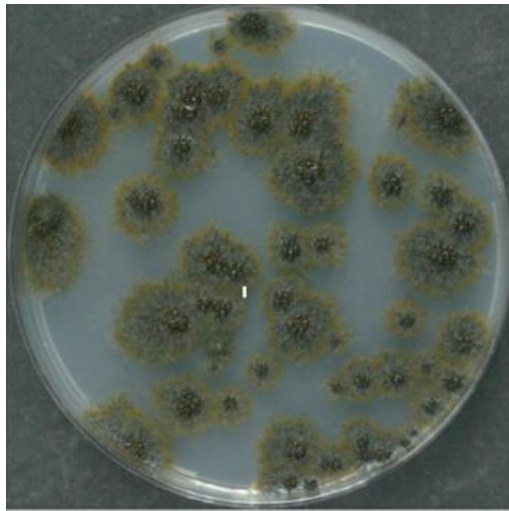
Vzájemné interakce mezi entomopatogenní houbou *B. bassiana*, mykoparazitickou houbou *C. minitans* a fytopatogenní houbou *S. sclerotiorum*. Z obrázku je patrné, že entomopatogenní houba *B. bassiana* vykazuje vysoký antagonistický efekt na fytopatogenní druh *S. sclerotiorum* a zároveň slabší efekt na *C. minitans*. Naopak u mykoparazitické houby *C. minitans* byl prokázán mykoparazitický efekt na *S. sclerotiorum*.



Vzájemné interakce mezi entomopatogenní houbou *I. fumosorosea*, mykoparazitickou houbou *C. minitans* a fytopatogenní houbou *S. sclerotiorum*. Z obrázku je patrné, že houba *I. fumosorosea* vykazuje ve srovnání s *B. bassiana* výrazně nižší antagonistický efekt na fytopatogenní druh *S. sclerotiorum* a u *C. minitans* se zdá, že houba *I. fumosorosea* negativně neovlivňuje tento druh. Naopak u mykoparazitické houby *C. minitans* byl opět prokázán mykoparazitický efekt na *S. sclerotiorum*.



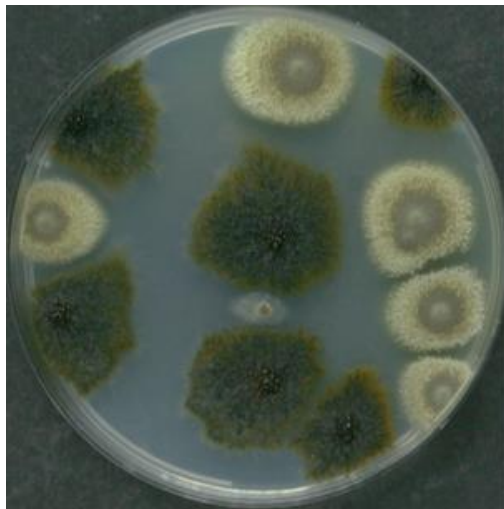
Vzájemné interakce mezi entomopatogenní houbou *M. brunneum*, mykoparazitickou houbou *C. minitans* a fytopatogenní houbou *S. sclerotiorum*. Z obrázku je patrné, že entomopatogenní houba *M. brunneum* vykazuje antagonistický efekt na fytopatogenní druh *S. sclerotiorum* a slabší efekt na houbu *C. minitans*. Mykoparazitická houba *C. minitans* opět vykazuje mykoparazitický efekt na *S. sclerotiorum* i v kombinaci s *M. brunneum*. Na obrázku je patrná kontaminace houbou *B. bassiana*. Tato kontaminace opět potvrzuje antagonismus na *S. sclerotiorum*.



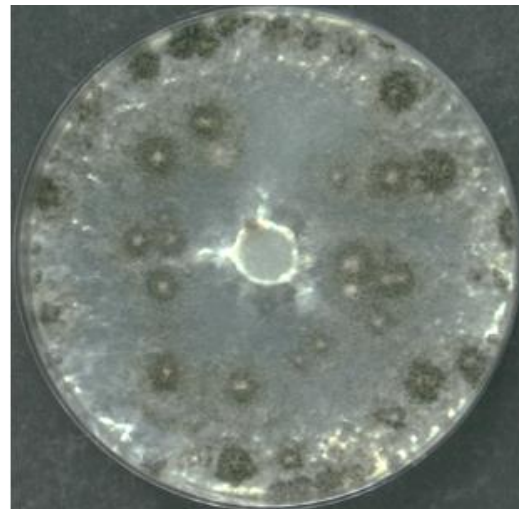
Kontrolní varianta *C. minitans*



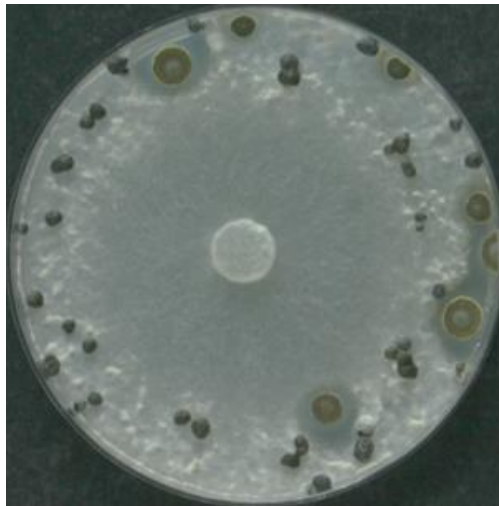
Kontrolní varianta *M. brunneum*



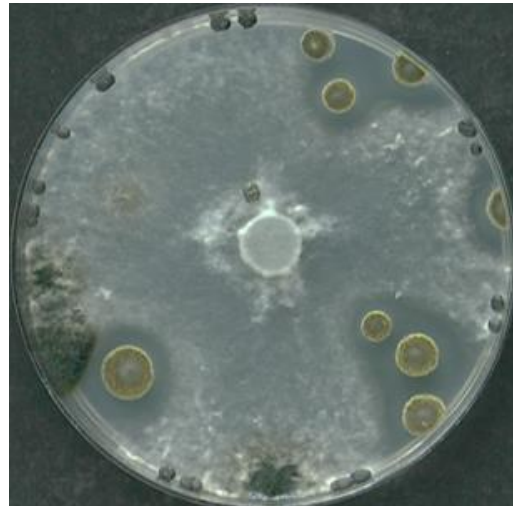
Interakce mezi *C. minitans* a *M. brunneum*



Interakce mezi *C. minitans* a *S. sclerotiorum*



Interakce mezi *M. brunneum* a *S. sclerotiorum*



Vzájemná interakce 3 druhů hub

Obrázek 2 - Detailní dokumentace antagonistického a mykoparazitického efektu v interakce mezi entomopatogenní houbou *M. brunneum*, mykoparazitickou houbou *C. minitans* a fytopatogenní houbou *S. sclerotiorum* pomocí testu CFU

7.4 Interakce mezi mykoparazitickými a fytopatogenními druhy hub

Základní údaje k pokusu:

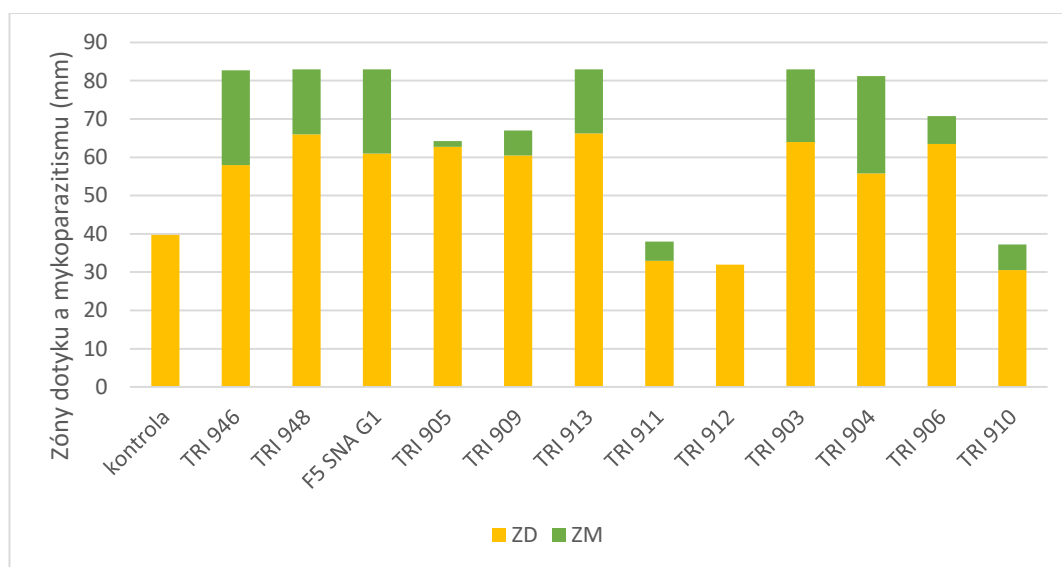
- ✓ suspenze kmenů mykoparazitických hub rodu *Trichoderma* o standardním titru $1,00 \times 10^7$ v 1 ml byla nanášena pomocí inokulační kličky ve formě kapky na jeden okraj Petriho misky s umělým živným médiem PDA
- ✓ na protilehlý okraj byl umístěn bloček vybraných druhů fytopatogenních hub
- ✓ po zaschnutí kapky byly Petriho misky vloženy v plastických sáčcích a kultivovány v termostatu při teplotě 25 ± 1 °C
- ✓ zóna dotyku a zóna mykoparazitismu byla hodnocena po 7 dnech inkubace

| Kmen | Zóna mykoparazitismu v interakci <i>Trichoderma</i> s patogeny (mm) | | | | |
|--------------|---|---|---|-------------------------------------|--------------------------------|
| | <i>B. cinerea</i> | <i>F. proliferatum</i> /solani kmen 55-F3 | <i>F. avenaceum</i> /tricinatum kmen 55-L4-Ca | <i>F. avenaceum</i> kmen 55-H1-C | <i>F. culmorum</i> kmen 317 |
| TRI 946 | 24,75 ± 3,20 | 1,50 ± 0,58 | 2,25 ± 0,50 | 2,75 ± 0,50 | 2,25 ± 0,50 |
| TRI 948 | 17,00 ± 0,82 | 25,25 ± 0,50 | 2,25 ± 0,50 | 25,75 ± 0,96 | 3,75 ± 0,96 |
| F5 SNA G1 | 22,00 ± 1,41 | 3,00 ± 0,00 | 4,50 ± 1,29 | 6,50 ± 1,29 | 3,25 ± 0,50 |
| TRI 905 | 1,50 ± 0,58 | 0,75 ± 0,50 | 2,00 ± 0,00 | 22,25 ± 1,50 | 5,75 ± 0,50 |
| TRI 909 | 6,50 ± 2,89 | 26,75 ± 0,50 | 21,00 ± 0,00 | 21,75 ± 0,50 | 3,00 ± 1,41 |
| TRI 913 | 16,75 ± 0,50 | 1,75 ± 0,50 | 22,25 ± 0,96 | 23,75 ± 0,96 | 12,75 ± 0,96 |
| TRI 911 | 5,00 ± 0,82 | 2,25 ± 0,50 | 1,25 ± 0,50 | 1,25 ± 0,50 | 0,00 ± 0,00 |
| TRI 912 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 1,00 ± 0,50 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 |
| TRI 903 | 19,00 ± 3,74 | 1,75 ± 0,50 | 1,75 ± 0,50 | 18,75 ± 0,96 | 4,00 ± 0,82 |
| TRI 904 | 25,50 ± 3,70 | 0,00 ± 0,00 | 3,00 ± 0,82 | 16,75 ± 0,96 | 1,75 ± 0,50 |
| TRI 906 | 7,25 ± 2,63 | 5,00 ± 2,83 | 0,00 ± 0,00 | 21,50 ± 1,00 | 1,75 ± 0,96 |
| TRI 910 | 6,75 ± 0,50 | 1,25 ± 0,50 | 1,25 ± 0,50 | 2,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 |

Tabulka 18 - Hodnocení zóny mykoparazitismu v interakci hub rodu *Trichoderma* s vybranými fytopatogenními druhy (měřeno 7. den od inokulace hub)

V kontrolní variantě došlo k dotyku obou kultur patogenu *B. cinerea* uprostřed Petriho misky, tj. ve vzdálenosti 41,5 mm od jejího okraje. Kmeny Tri 913 a Tri 948 hub rodu

Trichoderma spp. rostly nejrychleji ze všech variant. Zóna dotyku v interakci s fytopatogenní houbou *B. cinerea* byla vytvořena ve vzdálenosti 66,25 mm (Tri 913) resp. 66,00 mm (Tri 948) od okraje misky, kde byl kmen *Trichoderma* spp. nainokulován. Kmeny Tri 910, Tri 911 a Tri 912 kolonizovaly Petriho misku výrazně pomaleji, hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 30,50 do 33,00 mm. U všech variant byla měřena i zóna mykoparazitismu. Nejlepší mykoparazitickou schopnost prokázal kmen Tri 904 (25,5 mm), zároveň kmen Tri 946 prokázal vysokou míru mykoparazitismu. Kmen Tri 912 jako jediný nebyl schopen parazitovat na patogenu *B. cinerea*.

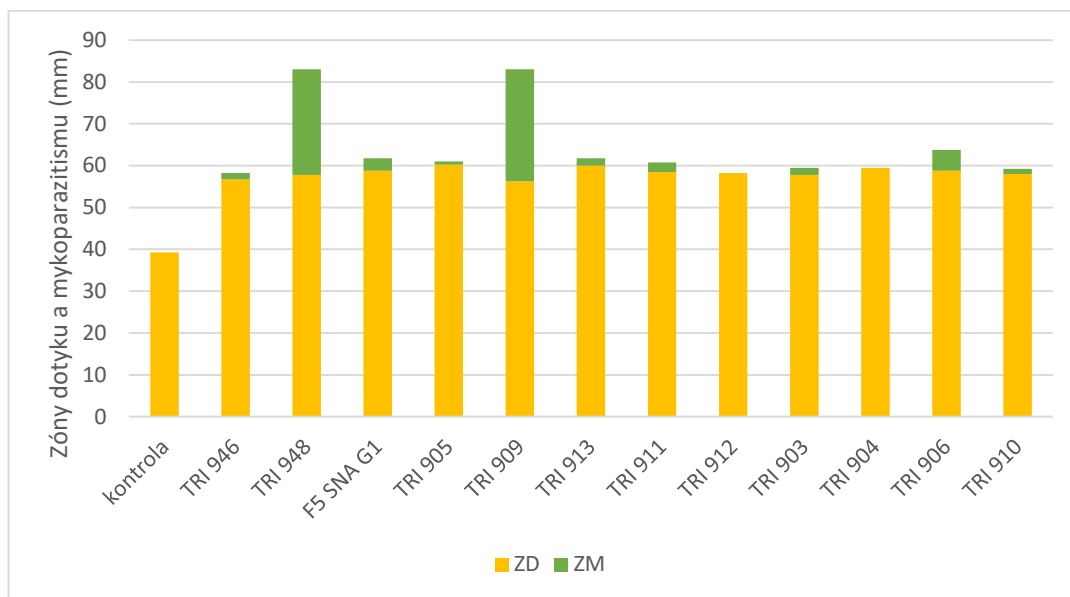


Graf 14 - Hodnocení zóny dotyku a zóny mykoparazitismu mezi kmeny hub rodu *Trichoderma* a fytopatogenním druhem *Botrytis cinerea*

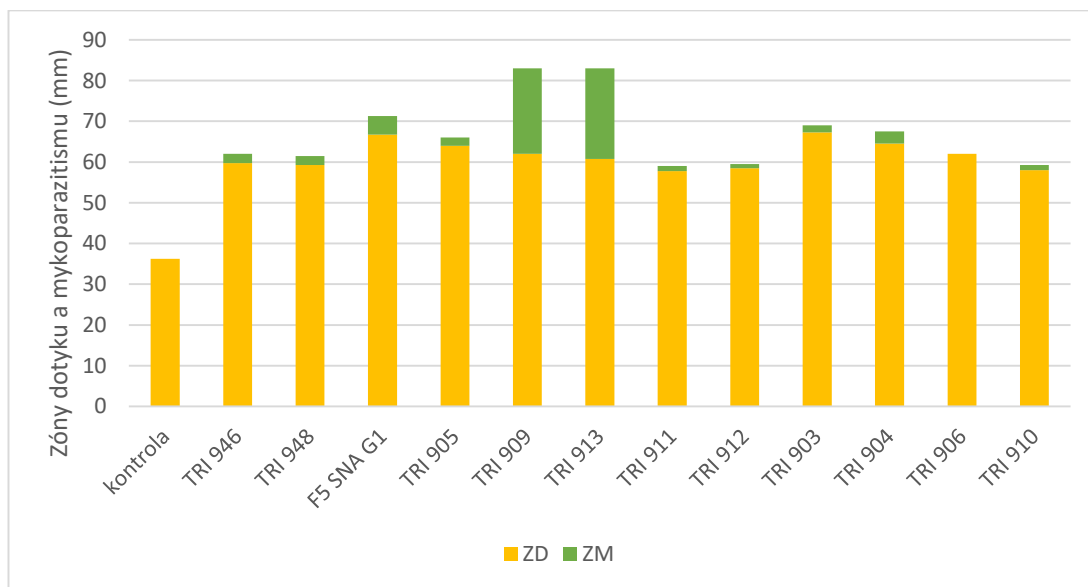
Houby rodu *Trichoderma* se střetly s fytopatogenní houbou *Fusarium proliferatum/solanii* ve vzdálenosti od 56,25 do 60,25 mm. Kolonizace Petriho misek houbami druhu *Trichoderma* byla velmi vyrovnaná. Nejvýraznějšího mykoparazitického efektu bylo dosaženo u kmenů Tri 909 (26,75 mm) a Tri 948 (25,25 mm). Kmeny Tri 912 a Tri 904 neprokázaly mykoparazitické efekt na tohoto fytopatogenu.

Druh *F. avenaceum/tricintum* kmen 55–L4–Ca v kontrolní variantě kolonizoval Petriho misku nejpomaleji z testovaných fytopatogenních druhů (36,25 mm). Zóna dotyku mezi kmeny rodu *Trichoderma* spp. a kmenem 55-L4-Ca se pohybovala v rozmezí od 67,25 mm (kmen Tri 903) do 57,71 mm (Tri 911). Opět byla zaznamenána téměř shodná rychlost růstu u všech druhů/kmenů *Trichoderma* spp. Nejlepší efekt mykoparazitismu byl prokázán u kmene Tri 913 (22,25 mm) a Tri 909 (21,00 mm). U

kmene Tri 906 nedošlo k přerůstání fytopatogenního druhu, zóna mykoparazitismu je rovna nule. Zároveň kmene Tri 912, Tri 911 a Tri 910 prokázaly nejmenší schopnost parazitace fytopatogenu.



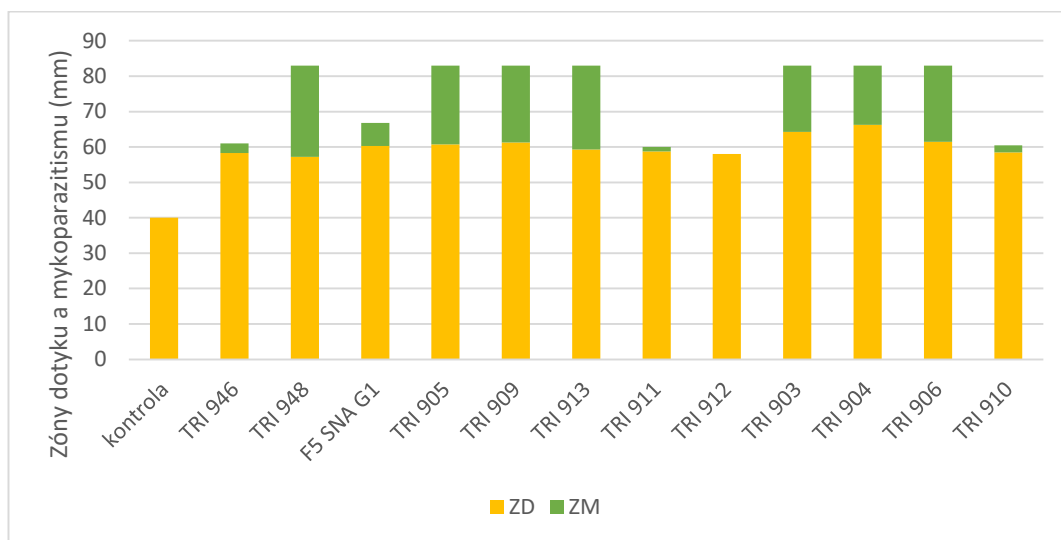
Graf 15 - Hodnocení zóny dotyku a zóny mykoparazitismu mezi kmene hub rodu *Trichoderma* a fytopatogenním druhem *Fusarium proliferatum/solani* kmen 55-F3



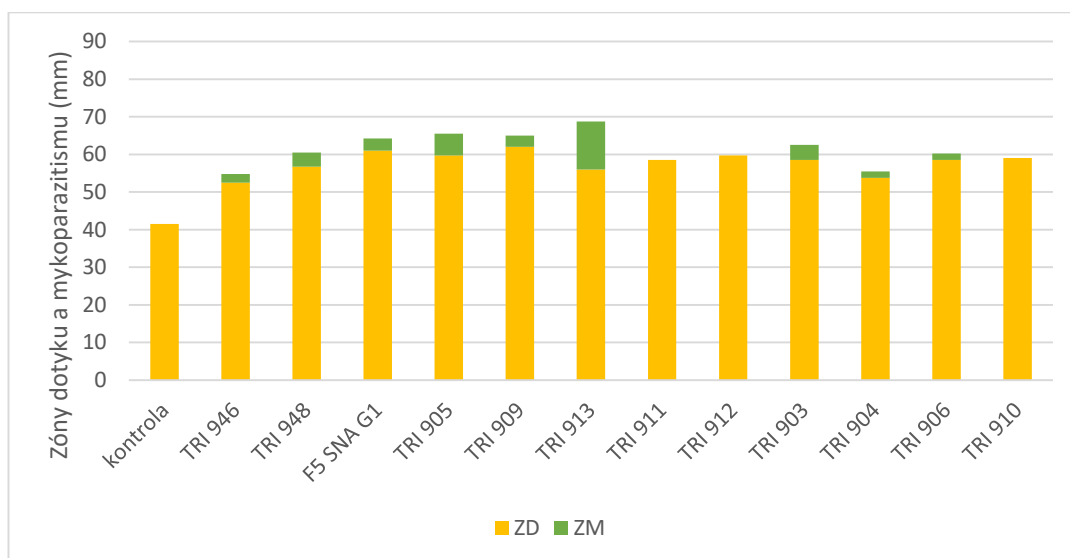
Graf 16 - Hodnocení zóny dotyku a zóny mykoparazitismu mezi kmene hub rodu *Trichoderma* a fytopatogenním druhem *Fusarium avenaceum/tricinctum* kmen 55-L4-Ca

U fytopatogenního druhu *Fusarium avenaceum* (kmen 55 H1 C) bylo dosaženo výrazného mykoparazitického jevu u 7 kmenů *Trichoderma* spp. Sedm kmenů *Trichoderma*

spp. prokázalo výraznou schopnost parazitismu fytopatogenního druhu *Fusarium avenaceum* (kmen 55 H1 C). Mykoparazitická zóna u těchto 7 kmenů se pohybovala od 21,50 mm do 25,75 mm. Největší zónu zajistil kmen Tri 948, naopak nejmenší parazitace byla prokázána u 3 kmenů (Tri 910, Tri 911 a Tri 946). U kmene Tri 912 nedošlo po sedmi dnech k mykoparazitickému efektu.



Graf 17 - Hodnocení zóny dotyku a zóny mykoparazitismu mezi kmeny hub rodu *Trichoderma* a fytopatogenním druhem *Fusarium avenaceum* kmen 55-H1-C



Graf 18 - Hodnocení zóny dotyku a zóny mykoparazitismu mezi kmeny hub rodu *Trichoderma* a fytopatogenním druhem *Fusarium culmorum* kmen 317

Kmen 317 fytopatogenního druhu *Fusarium culmorum* byl z testovaných druhů nejméně přerůstán houbami rodu *Trichoderma*. Zóna mykoparazitismu se pohybovala v rozmezí od 12,75 mm (Tri 913) do 1,75 mm (Tri 904 a Tri 906). Petriho misky bez mykoparazitického efektu byly zaznamenány u kmenů Tri 911, Tri 912 a Tri 910.

8 Diskuse

Entomopatogenní a mykoparazitické houby hrají významnou roli v biologické ochraně rostlin. Entomopatogenní houby způsobují primární infekce na hmyzu, a v přírodě tak způsobují primární epizootie (Inglis et al. 2001). Entomopatogenní houby se vyskytují po celém světě, v podmínkách mírného pásma jsou izolovány převážně z půdních vzorků (Medo & Cagáň 2008). V diplomové práci byl testován vliv entomopatogenních hub na vybrané převážně půdní patogeny. V experimentech byl při vzájemných interakcích prokázán antagonistický efekt. Vzájemné interakce byly testovány metodou 4 kultur, kdy entomopatogenní houba byla aplikována ve 4 místech Petriho misce a doprostřed byl položen bloček fytopatogenu. Z výsledku je patrné, že nejvíce odolný proti entomopatogenním houbám byl fytopatogen *R. solani*. Druh *R. solani* nebyl entomopatogenními druhy nikterak potlačen, pouze *B. bassiana* prokázala malou míru redukce. Proti fytopatogenu *S. sclerotiorum* a *B. cinerea* nejvíce účinkovala houba *B. bassiana* a *I. fumosorosea*. Oba tyto druhy potlačily růst všech testovaných fytopatogenů. Druhy *M. brunneum* a *A. attenuatus* neprokázaly žádný pozitivní efekt v potlačení *S. sclerotiorum* a *B. cinerea*. U hub rodu *Fusarium* docházelo k tvorbě antagonistických zón způsobených entomopatogenními houbami. Výjimku tvořil druh *F. avenaceum* kmen 55-H1-C, tento kmen nebyl opět potlačen druhem *M. brunneum* a *A. attenuatus*. Obdobné výsledky prokázali Tomilova et al. (2020), kteří testovali v porostu brambor účinnost *Metarhizium robertsii* a *B. bassiana* na *Rhizoctonia*. Hlízy brambor mořili užitečnými druhy hub a prokázali, že *B. bassiana* snížila výskyt choroby *Rhizoctonia* na stoncích a stolonech bramboru, naopak snížení výskytu *Rhizoctonia* nebylo prokázáno u porostu, kde byly hlízy mořeny *M. robertsii*. Nicméně oba druhy užitečných druhů hub snížili tvorbu sklerocií (vloček) na nových hlízách. Jaber & Alananbeh (2018) zkoumali antagonistickou aktivitu houbových entomopatogenů *Beauveria bassiana* (kmen NATURALIS) a *Metarhizium brunneum* (kmen F-52) proti třem druhům *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. culmorum* a *F. moniliforme*) „in vitro“ prostřednictvím duálních testů. Oba houbové entomopatogeny významně inhibovaly všechny druhy hub rodu *Fusarium*, přičemž způsoby účinku byly kompetice o niku nebo nutriční zdroje a antibiόza. Barra-Bucarei et al. (2019) testovali nativní kmeny *B. bassiana* proti *B. cinerea* v duálních testech a zároveň sledovali endofytický růst u sazenicích rajčat a chilli papriček. Deset kmenů *B. bassiana* vykázalo významný antagonismus v duálním testu proti *B. cinerea*, kdy se inhibice pohybovala v rozmezí

30 a 36 %. U kmenů *B. bassiana* byl prokázán endofytismus. Deset nativních kmenů kolonizovalo sazenice rajčat a osm kmenů kolonizovalo chilli papričky. Mykoparazitický efekt vykazují i entomopatogenní druhy hub na patogeny fyloplánu, jako je padlí a rzi (Folorunso et al. 2022, Kavková a Čurn 2005). Druhy entomopatogenních hub rodu *Lecanicillium* spp. jsou schopny po aplikaci regulovat populace mšic společně s patogenem *Sphaerotheca fuliginea* způsobující padlí (Goettel et al. 2008).

Mykoparazitické houby jsou organismy, které potlačují původce onemocnění rostlin. Nejvýznamnější druhy, které se v ochraně rostlin využívají, jsou kosmopolitně rozšířené a jejich zdrojem výskytu je půdní prostředí. Náleží sem zejména druhy hub rodu *Trichoderma* spp., *Clonostachys* spp. a *Coniothyrium minitans*. Ve světě je registrována celá škála biopreparátů na bázi těchto hub (Kaewchai et al. 2009). Druhy *Trichoderma* spp. vykazují antagonistické vlastnosti vůči jiným houbám a mikroorganismům, většinou prostřednictvím konkurence, antibiocy a mykoparazitismu (Modrzewska et al. 2022). *Trichoderma* spp. produkují enzymy, které rozkládají buněčnou stěnu jiných druhů hub. Mezi enzymy, které se nejčastěji podílejí na mykoparazitismu, patří ty, které rozkládají chitin (Harman et al. 2008). Při testování vybraných druhů/kmenů proti vybraným patogenům (*B. cinerea*, *F. avenaceum*, *F. proliferatum/solani*, *F. avenaceum/tricintum* a *F. culmorum*) byl v diplomové práci prokázán jejich mykoparazitický efekt. Zároveň byla pozorována kompetice o prostor. Druhy *Trichoderma* spp. jsou rychle rostoucí druhy, proto osidlovaly rychleji niku v podobě Petriho misky obsahující živnou půdu. Intenzita parazitace mycelia vybraných fytopatogenů byla rozdílná. Téměř nulový efekt byl pozorován u kmene TRI 912. Naopak nejlepší účinnost vykazaly kmeny TRI 946, TRI 948, TRI 913, TRI 903, TRI 904, TRI 906 u fytopatogenů *B. cinerea* a *F. avenaceum* kmen 55-H1-C. Modrzewska et al. (2022) prokázali, že druhy *T. viride*, *T. viridescens* a *T. atroviride* inhibovaly růst *Fusarium culmorum* a *F. cerealis* s průměrnou mírou inhibice 33 % až 54 % v závislosti na kmeni *Trichoderma*. Kmeny druhu *T. koningiopsis* prokázaly vysokou účinnost při potlačování rostlinných patogenů, včetně *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, původcem fusariového vadnutí rajčat (Moreno et al., 2009). Fan et al. (2024) testovali několik kmenů *T. asperellum* proti plísni šedé *B. cinerea*. Jejich kmen T7 vykázal vysokou aktivitu proti růstu mycelia, zejména pak snižoval klíčivost spor *B. cinerea*. Kmen se podílel na ochraně plodů a listů jahodníku před plísní šedou. You et al. (2016) testovali izoláty v duálním testu proti *B. cinerea* v laboratorních podmínkách. Sledovali intenzitu růstu *Trichoderma* spp. na koloniích *B. cinerea*. Ze všech

kmenů vybrali 28 izolátů, které dále podrobili testu na klíčovost semen rajčat. Čtyři vybrané izoláty (*T. harzianum*: T-21 a T-68; *T. koningiopsis*: T-35 a T-51) byly hodnoceny z hlediska účinků podporujících růst a vyvolávajících rezistenci na sazeničkách rajčat a z hlediska účinku potlačujícího sporulaci *B. cinerea* na odumřelých listech rajčat. Na základě výsledků zjistili, že izoláty T-21, T-51 a T-68 potlačily sporulaci *B. cinerea* o 62,8 %, 66,1 % a 63,7 % ve srovnání s kontrolním ošetřením. Na základě této polyfaktoriální charakteristiky zjistili, že kmen T-51 druhu *T. koningiopsis* je slibným kandidátem v potlačení *B. cinerea*. V diplomové práci byl prokázán také mykoparazitismus u *C. minitans* v duálním testu, resp. testu CFU „Colony forming units“ na patogen *S. sclerotiorum*. Rabeendran et al. (2006) testovali osm izolátů *Trichoderma hamatum*, *T. rossicum* *T. virens*, *C. minitans* a *Clonostachys rosea*, které byly přidány do pěstebních substrátů pro přesazování nebo vysazování sazeniček salátu na místo zamořené *S. minor*. Při sklizni zjistili, že kmeny *T. hamatum* a *C. minitans* snížily výskyt choroby o 30-50 % ve srovnání s neošetřenou kontrolou při velmi vysokém tlaku chorob. Oba druhy hub účinně kolonizovaly rhizosféru salátů a okolní půdu, a díky této kolonizaci došlo k ochraně kořenového systému před infekcí *S. minor*. V testu CFU, kdy byla na jednu Petriho misku inokulována suspenze entomopatogenní houby spolu s *C. minitans* a následně vložen bloček patogenu *S. sclerotiorum* byly zaznamenány interakce mezi jednotlivými druhy hub. Z entomopatogenních hub byly takto testovány druhy *B. bassiana*, *M. brunneum* a *I. fumosorosea*. Všechny entomopatogenní houby vykazaly antagonistický efekt na *S. sclerotiorum*. Výrazné antagonistické zóny vykazala houba *B. bassiana* a *M. brunneum*, naopak *I. fumosorosea* vykazala nízký antagonismus vůči *S. sclerotiorum*. Z testovaných entomopatogenních hub působila antagonisticky na kolonie *C. minitans* nejvíce houba *B. bassiana*, nicméně efekt byl malý. Druh *C. minitans* parazitoval na myceliu i sklerociích *S. sclerotiorum*. Mykoparazitický efekt *C. minitans* nebyl prokázán v kombinaci s entomopatogenními druhy hub. Ve variantě, kde byla inokulována houba *C. minitans* a následně dodán patogen *S. sclerotiorum*, nedošlo k tvorbě sklerocií. Vliv na tvorbu sklerocií *S. sclerotiorum* závisí na koncentraci spor v suspenzi jednotlivých druhů užitečných hub. Čím je koncentrace spor v 1 ml větší, tím více dochází k potlačení jejich tvorby. Na základě těchto výsledků by se mohlo pro praktické využití doporučit, jaká koncentrace spor entomopatogenních a mykoparazitických hub by měla být aplikována do porostu infikovaného *S. sclerotiorum*, aby nedošlo k tvorbě vysokého počtu

sklerocií. Zároveň lze doporučit pro potlačení fytopatogenních druhů hub v praktických podmínkách entomopatogenní houbu *B. bassiana* a *I. fumosorosea*. Nejvýznamnější závěr DP je také, že lze provádět tank-mix entomopatogenních a mykoparazitických hub a ten, že entomopatogenní druhy hub mohou hrát velkou roli v potlačení fytopatogenních druhů kulturních plodin. Jejich použití proti škůdcům může doprovázet sekundární efekt na potlačení vývoje fytopatogenních druhů. Zároveň z literatury prokázaný endofytický růst může podpořit růst a vývoj pěstovaných plodin.

Závěr

- ✓ Entomopatogenní houby vykazují antagonistický efekt na původce onemocnění rostlin.
- ✓ Mykoparazitické houby *Trichoderma* spp. a *C. minitans* vykazují mykoparazitický efekt na vybrané původce onemocnění rostlin a zároveň vykazují kompetici mezi testovanými mikroorganismy, jedná se o kompetici prostorovou i nutriční.
- ✓ Druh *Isaria fumosorosea* se jeví jako nejúčinnější druh entomopatogenní houby v potlačení růstu a vývoje všech testovaných fytopatogenních druhů hub. U některých fytopatogenních druhů hub způsobila *I. fumosorosea* více než 80% inhibici jejich růstu.
- ✓ Entomopatogenní houba *Beauveria bassiana* redukovala nejvíce tvorbu a vývoj sklerocií patogenu *S. sclerotiorum*.
- ✓ Entomopatogenní houby vykazují velmi slabý antagonismus na *C. minitans* a naopak výrazný antagonistický efekt *S. sclerotiorum* v jejich vzájemné interakci při použití testu „Colony forming units“. Houba *C. minitans* vykazuje mykoparazitický efekt na *S. sclerotiorum*.
- ✓ Nejvíce testovaných druhů/kmenů hub rodu *Trichoderma* spp. je schopna výrazně parazitovat na fytopatogenních druzích *B. cinerea* a *F. avenaceum*. Jde o kmeny TRI 946, TRI 948, TRI 913, TRI 903, TRI 904, TRI 906.
- ✓ Fytopatogenní druhy *F. proliferatum/solani* kmen 55–F3, *F. avenaceum/tricintum* kmen 55–L4–Ca a *F. culmorum* kmen 317 byly vůči houbám rodu *Trichoderma* spp. odolnější.
- ✓ Kmen TRI 912 byl neúčinný na testované fytopatogenní druhy, s výjimkou druhu *F. avenaceum/tricintum* kmen 55–L4–Ca, nicméně u tohoto druhu byla zaznamenána minimální mykoparazitická aktivita.
- ✓ Na základě laboratorního pokusu lze usuzovat, že současná aplikace (tank-mix) mykoparazitické houby *C. minitans* spolu s entomopatogenními houbami, může hrát významnou roli v potlačení fytopatogenního druhu *S. sclerotiorum*. Důležité bude testovat, v jaké koncentraci by měly být jednotlivé druhy užitečných hub aplikovány.

-
- ✓ Entomopatogenní druhy hub mohou hrát velkou roli v potlačení fytopatogenních druhů kulturních plodin. Vedle primárního efektu, tj. způsobení primárního onemocnění hmyzu, vykazuje tato skupina hub právě výrazný sekundární efekt na růst a vývoj fytopatogenních druhů.

Seznam použité literatury

- Alkan, N., Espeso, E. A., & Prusky, D. (2013). Virulence regulation of phytopathogenic fungi by pH. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(9), 1012-1025.
- Alkhaibari, A. M., Carolino, A. T., Yavasoglu, S. I., Maffei, T., Mattoso, T. C., Bull, J. C., Samuels, R. I., & Butt, T. M. (2016). *Metarhizium brunneum* Blastospore Pathogenesis in *Aedes aegypti* Larvae: Attack on Several Fronts Accelerates Mortality. *PLoS pathogens*, 12(7), e1005715.
- Andrews, J. H. (1992). Biological control in the phyllosphere. *Annual review of phytopathology*, 30(1), 603-635.
- Araújo, W. L. D., Lacava, P. T., Marco, J., Lima, A. O. D. S., Sobral, J. K., Azevedo, J. L. D., & Pizzirani-Kleiner, A. A. (2010). Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos.
- Baker K.F., Cook R.J. (1974): Biological control of plant pathogenes. The American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota, 196.
- Bamisile B.S., Senyo Akutse K., Dash C.K., Qasim M., Ramos Aguila L.C., Ashraf H.J., Huang W., Hussain M., Chen S., Wang L. (2020). Effects of Seedling Age on Colonization Patterns of Citrus limon Plants by Endophytic *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and Their Influence on Seedlings Growth. *Journal of Fungi*, 6:29.
- Barra-Bucarei L., France Iglesias A., Gerding González M., Silva Aguayo G., Carrasco-Fernández J., Castro J.F., Ortiz Campos J. (2019). Antifungal Activity of *Beauveria bassiana* Endophyte against *Botrytis cinerea* in Two Solanaceae Crops. *Microorganisms* 8, 65.
- Bennett A.J., Leifert C., Whipps J.M. (2006): Survival of *Coniothyrium minitans* associated with sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(1): pp. 164-172.
- Beys-da-Silva, W. O., Rosa, R. L., Berger, M., Coutinho-Rodrigues, C. J. B., Vainstein, M. H., Schrank, A., Santi, L. (2020). Updating the application of *Metarhizium anisopliae* to control cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*, 107812.
- Bidochka, M. J., Leger, R. J. S., & Roberts, D. W. (1997). Mechanisms of deuteromycete fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. *The Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 129(S171), 213-224.
- Bing, L. A., & Lewis, L. C. (1991). Suppression of *Ostrinia nubilalis* (Hübner)(Lepidoptera: Pyralidae) by endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Environmental entomology*, 20(4), 1207-1211.
- Bischoff J.F., Rehner S.A., Humber R.A. (2009): A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101: 512-530.
- Dash, C. K., Bamisile, B. S., Keppanan, R., Qasim, M., Lin, Y., Islam, S. U., Wang, L. (2018). Endophytic entomopathogenic fungi enhance the growth of *Phaseolus vulgaris* L.(Fabaceae) and negatively affect the development and reproduction of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Microbial pathogenesis*, 125, 385-392.
- De Faria M.R., Wraight S.P. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43: 237-256.
- Dolatabad, H. K., Javan-Nikkhah, M., & Shier, W. T. (2017). Evaluation of antifungal, phosphate solubilisation, and siderophore and chitinase release activities of endophytic fungi from *Pistacia vera*. *Mycological Progress*, 16, 777-790.

-
- Du C., Yang B., Wu J., Ali S. (2019). Identification and Virulence Characterization of Two *Akanthomyces attenuatus* Isolates Against *Megalurothrips usitatus* (Thysanoptera: Thripidae). *Insects* 10: 168.
- Dunlop, R. W., Simon, A., Sivasithamparam, K., & Ghisalberti, E. L. (1989). An antibiotic from *Trichoderma koningii* active against soilborne plant pathogens. *Journal of Natural Products*, 52(1), 67-74.
- Dyakov, Y. T., & Zinovyeva, S. V. (2007). Plant parasite microorganisms. In Comprehensive and molecular phytopathology (pp. 19-47). Elsevier.
- Eichmann, R., & Hüchelhoven, R. (2008). Accommodation of powdery mildew fungi in intact plant cells. *Journal of Plant Physiology*, 165(1), 5-18.
- Elena, G. J., Beatriz, P. J., Alejandro, P., & Lecuona, R. E. (2011). *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin promotes growth and has endophytic activity in tomato plants. *Adv Biol Res*, 5(1), 22-27.
- Fan Q.S., Lin H.J., Hu Y.J., Jin J., Yan H.H., Zhang R.Q. (2024). Biocontrol of strawberry Botrytis gray mold and prolong the fruit shelf-life by fumigant *Trichoderma* spp. *Biotechnology Letters*.
- Folorunso E.A., Bohatá A., Kavkova M., Gebauer R., Mraz J. (2022). Potential use of entomopathogenic and mycoparasitic fungi against powdery mildew in aquaponics. *Frontiers in Marine Science*, 9: 992715.
- Gabarty A, Salem H.M, Fouda M.A, Abas A.A, Ibrahim A.A. 2014. Pathogenicity induced by the entomopathogenic fungi beauveria bassiana and metarhizium anisopliae in agrotis ipsilon (hufn.). *J Radiat Res Appl Sci*. 7(1):95–100.
- Gao Q, Jin K, Ying S-H, Zhang Y, Xiao G, Shang Y, et al. 2011. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *Plos Genet*. 7(1):e1001264.
- Gao, Y., Xie, Y. P., Xiong, Q., Liu, W. M., & Xue, J. L. (2015). Ultrastructural exploration on the histopathological change in *Phenacoccus fraxinus* infected with *Lecanicillium lecanii*. *PloS one*, 10(1), e0117428.
- Gerlagh M., Whipps J. M., Budge S.P., Goossen van de Geijn H.M. (1996). Efficiency of isolates of *Coniothyrium minitans* as mycoparasites of *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum* and *Botrytis cinerea* on tomato stem pieces. *European Journal of Plant Pathology*, 10:787–793.
- Goettel M.S., Koike M., Kim J.J., Aiuchi D., Shinya R., Brodeur J. (2008). Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes and plant diseases. *Journal of Invertebrate Pathology* 98, 256–261.
- Gourlay, A. H. (2018). Insect resistance to microbial control agents: mechanisms and implications for management. *Journal of invertebrate pathology*, 153, 64-75.
- Hall R. A. (1985). Whitefly control with fungi. In: Hussey N. W., Scopes N. (Eds.): *Biological test control – the greenhouse experience*. Cornell University Press, Ithaca, New York, 116-118.
- Harman G.E., Björkman T., Ondik K., Shores M. (2008). Changing paradigms on the mode of action and uses of *Trichoderma* spp. for biocontrol. *Outlooks on pest management*, 19, 24–29.
- Haverkort, A. J., Struik, P. C., Visser, R. G. F., & Jacobsen, E. J. P. R. (2009). Applied biotechnology to combat late blight in potato caused by *Phytophthora infestans*. *Potato research*, 52, 249-264.
- Helmy, N. M., & Parang, K. (2023). Cyclic Peptides with Antifungal Properties Derived from Bacteria, Fungi, Plants, and Synthetic Sources. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 16(6), 892.

-
- Hu, M., Li, Q. L., Yang, Y. B., Liu, K., Miao, C. P., Zhao, L. X., & Ding, Z. T. (2017). Koninginins RS from the endophytic fungus *Trichoderma koningiopsis*. Natural product research, 31(7), 835-839.
- Chatterton S., Jayaraman J., Punja Z. K. (2008). Colonization of cucumber plants by the biocontrol fungus *Clonostachys rosea f. catenulata*. Biological Control, 46: 267–278.
- Chatterton S., Punja Z. K. (2009). Chitinase and β -1,3-glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea f. catenulata* against fungal plant pathogens. Canadian Journal of Microbiology 55: 356–367.
- Chatterton S., Punja Z. K. (2010). Factors influencing colonization of cucumber roots by *Clonostachys rosea f. catenulata*, a biological disease control agent. Biocontrol Science and Technology 20: 37–55.
- Chet I., Benhamou N., Haran S. (1998). Mycoparasitism and lytic enzymes. In: Harman GE, Kubicek CP (eds) *Trichoderma and Gliocladium*, vol 2. Enzymes, biological control and commercial applications. Taylor and Francis London, 153-171.
- Chitrampalam, P., Cox, C. A., Turini, T. A., Pryor, B. M. (2010): Efficacy of *Coniothyrium minitans* on lettuce drop caused by *S. minor* in desert agroecosystem. – Biological Control 55: 92-96.
- Inglis G. D., Goettel M. S., Butt T. M., Strasser H. (2001). Use of hyphomycetes fungi for managing insect pests. In: Butt T. M., Jackson C., Magan N. (Eds): Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. CAB International, Wallingford, UK, 23-69.
- Islam, W., Adnan, M., Shabbir, A., Naveed, H., Abubakar, Y. S., Qasim, M., Ali, H. (2021). Insect-fungal-interactions: A detailed review on entomopathogenic fungi pathogenicity to combat insect pests. Microbial Pathogenesis, 159, 105122.
- Jaber, L. R., & Enkerli, J. (2017). Fungal entomopathogens as endophytes: can they promote plant growth?. Biocontrol Science and Technology, 27(1), 28-41.
- Jaber L.R., Alananbeh K.M. (2018). Fungal entomopathogens as endophytes reduce several species of *Fusarium* causing crown and root rot in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). Biological Control 126, 117–126.
- Jackson, D., Skillman, J., & Vandermeer, J. (2012). Indirect biological control of the coffee leaf rust, *Hemileia vastatrix*, by the entomogenous fungus *Lecanicillium lecanii* in a complex coffee agroecosystem. Biological control, 61(1), 89-97.
- Jash S., Pan S. (2008). Variability in antagonistic activity and root colonizing behaviour of *Trichoderma* isolates. Journal of Tropical Agriculture, 45(1): 29-35.
- Jing Y, Liang C. 2016. *Ampelomyces quisqualis* HMLAC05119 v1.0. Joint Genome Institute.
- Jones, E. E., Stewart, A. (2000). Selection of mycoparasites of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* isolated from New Zealand soils. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 28, 105–114.
- Kaewchai S., Soyong K., Hyde K.D. (2009). Mycofungicides and fungal biofertilizers. Mycopathologia 164, 81–89.
- Kavková M., Čurn V. (2005). *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a potential mycoparasite on *Sphaerotheca fuliginea* (Ascomycotina: Erysiphales). Mycopathologia 159: 53–63.
- Landa Z. (2002). Biologická ochrana zahradních rostlin proti chorobám a škůdcům v polních podmínkách, ve sklenících a fóliovnících. In: Demo M., Hričovský I. (Eds.): Trvalo udržateľné technológie v záhradníctve. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 225-280.

-
- Landa Z., Bielikova L., Osborne L. S., Bobkova P. (2001b). Assessment of isolation of entomogenous fungi collected from spruce bark beetle *Ips typographus* L. (*Coleoptera, Scolytidae*) in Bohemian Forest. *Silva Gabreta*, 6, 259-272.
- Landa Z., Bohatá A., Kalista M. (2008): Záměrné využívání autochtonních kmenů vybraných druhů entomopatogenních hub. Jihočeská univerzita, České Budějovice, 47 p.
- Landa Z., Bohatá A., Šimková J., Skalický A., Doul L., Kalista M. (2010). Potential of local strains of entomopathogenic fungi as components of ecologically based program of protective treatments against spruce bark beetle *Ips typographus*. Aktuality šumavského výzkumu IV, Správa NP a CHKO Šumava, Vimperk, s. 61-65.
- Landa Z., Hornak P., Osborne L. S., Novakova A, Bursova E. (2001a). Entomogenous fungi associated with spruce bark beetle *Ips typographus* L. (*Coleoptera, Scolytidae*) in Bohemian Forest. *Silva Gabreta*, 6, 273-286.
- Landa Z., Křenová Z., Vojtěch O. (2007). Využití houby *Beauveria bassiana* v ochraně proti lýkožroutu smrkovému. *Lesnická práce*, 10, 14-15.
- Li, Y., et al. "Mycoparasitism: mechanisms and applications." *Microbiology Spectrum* 7 (2019).
- Lin, Y., Hussain, M., Avery, P. B., Qasim, M., Fang, D., Wang, L. (2016). Volatiles from plants induced by multiple aphid attacks promote conidial performance of *Lecanicillium lecanii*. *PloS one*, 11(3), e0151844.
- Manganiello, G., Sacco, A., Ercolano, M. R., Vinale, F., Lanzuise, S., Pascale, A., Woo, S. L. (2018). Modulation of tomato response to *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma harzianum* and its secondary metabolite harzianic acid. *Frontiers in microbiology*, 9, 1966.
- Medo J., Cagán Ľ. (2011). Factors affecting the occurrence of entomopathogenic fungi in soils of Slovakia as revealed using two methods. *Biological Control* 59: 200–208.
- Mishra, N., Khan, S. S., & Sundari, S. K. (2016). Native isolate of *Trichoderma*: a biocontrol agent with unique stress tolerance properties. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 1-23.
- Modrzewska M., Błaszczuk L., Stępień Ł., Urbaniak M., Waśkiewicz A., Yoshinari. T, Bryła M. (2022). *Trichoderma* versus *Fusarium* - Inhibition of Pathogen Growth and Mycotoxin Biosynthesis. *Molecules* 27: 8146.
- Moreno C.A., Castillo F., Gonzalez A., Bernal D., Jaimes Y., Chaparro M., Gonzalez C., Rodriguez F., Restrepo S., Cotes A.M. (2009). Biological and molecular characterization of the response of tomato plants treated with *Trichoderma koningiopsis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 74, 111–120.
- Mukherjee, P. K., Mendoza-Mendoza, A., Zeilinger, S., & Horwitz, B. A. (2022). Mycoparasitism as a mechanism of *Trichoderma* mediated suppression of plant diseases. *Fungal Biology Reviews*, 39, 15-33.
- Murdoch, W. W., Briggs, C. J., Nisbet, R. M. (2000). *Consumer-resource dynamics*. Princeton University Press.
- Naranjo-Ortiz, M. A., Gabaldón, T., 2019. Fungal evolution: major ecological adaptations and evolutionary transitions. *Biological Reviews* 94 (4), 1443-1476.
- Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of agricultural science*, 144(1), 31-43.
- Orduño-Cruz, N., Guzmán-Franco, A. W., Rodríguez-Leyva, E., López-Collado, J., Valdéz-Carrasco, J. M., Mora-Aguilera, G. (2011). Susceptibility of the cactus weevil *Metamasius spinolae* to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*

-
- under laboratory and field conditions. *Journal of applied microbiology*, 111(4), 939–948.
- Pedrini, N., Crespo, R., & Juárez, M. P. (2007). Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(1-2), 124-137.
- Perincherry L, Lalak-Kańczugowska J, Stępień Ł. 2019. Fusarium-Produced Mycotoxins in Plant-Pathogen Interactions. *Toxins*, 11: 664.
- Polišenská I., Nedomová L., Tvarůžek L. (2007). Fuzáriové mykotoxiny v ovsu. *Obilnářské listy*, 15 (1): s. 9-11.
- Pong K. K., Ramle M., Wahizatul A. A., Norman K., Siti R. A. (2017). Genetic variation of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Isaria amoenerosea* and their pathogenicity against subterranean termite, *Coptotermes curvignathus*. *J. Oil Palm Res.*, 29:35–46.
- Poveda, J. (2021). Cyanobacteria in plant health: Biological strategy against abiotic and biotic stresses. *Crop Protection*, 141, 105450.
- Prahl, R. E., Khan, S., & Deo, R. C. (2023). Ampelomyces mycoparasites of powdery mildews A review. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 45(4), 391-404.
- Rabeendran N., Jones E.E., Moot D.J., Stewart A. (2006). Biocontrol of *Sclerotinia lettuce* drop by *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma hamatum*. *Biological Control* 39: 352–362.
- Rajani, P., Rajasekaran, C., Vasanthakumari, M. M., Olsson, S. B., Ravikanth, G., Shaanker, R. U. (2021). Inhibition of plant pathogenic fungi by endophytic *Trichoderma* spp. through mycoparasitism and volatile organic compounds. *Microbiological Research*, 242, 126595.
- Rehner S. A., Minis A. M., Sung G. H., Luangsa-ard J. J., Devotto L., Humber R. A. (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103: 1055-1073.
- Reino, J. L., et al. "Harzianic acid, a microbial volatile organic compound with antifungal and plant growth promoting activities." *Frontiers in Microbiology* 9 (2018): 2813.
- Roberts, D. W., & St Leger, R. J. (2004). *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Advances in applied microbiology*, 54(1), 1-70.
- Rodriguez, M. A., Cabrera, G., Gozzo, F. C., Eberlin, M. N., & Godeas, A. (2011). *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: Mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. *Journal of Applied Microbiology*, 110, 1177–1186.
- Safavi, S. A. (2013). In vitro and in vivo induction, and characterization of Beauvericin Isolated from *Beauveria bassiana* and its bioassay on *Galleria mellonella* larvae. *J. Agr. Sci. Technol.* 15, 1–10.
- Sandys-Winsch C., Whipps J. M., Gerlagh M., Kruse M. (1993). World distribution of the sclerotial mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *Mycological Research*, 97(10):1175–1178.
- Seyoum E, Bateman RP, Charnley AK. 2002. The effect of *Metarhizium anisopliae* var *acridum* on haemolymph energy reserves and flight capability in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *J Appl Entomol.* 126(2-3):119–124.
- Shahbaz, M., Palaniveloo, K., Tan, Y. S., Palasuberniam, P., Ilyas, N., Wiart, C., Seelan, J. S. S. (2024). Entomopathogenic fungi in crops protection with an emphasis on bioactive metabolites and biological activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(7), 1-22.

-
- Shin, T. Y., Lee, M. R., Park, S. E., Lee, S. J., Kim, W. J., Kim, J. S. (2020). Pathogenesis related genes of entomopathogenic fungi. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 105(4), e21747.
- Shrestha, B., Hyun, M. W., Oh, J., Han, J., Lee, T. H., Cho, J. Y., Kang, H., Kim, S. H., Sung, G. (2014). Molecular evidence of a teleomorph-anamorph connection between *Cordyceps scarabaeicola* and *Beauveria sungii* and its implication for the systematics of *Cordyceps* sensu stricto. *Mycoscience*, 55, 231-239.
- Schroers H. J. (2001). A monograph of Bionectria (*Ascomycota*, *Hypocreales*, *Bionectriaceae*) and its *Clonostachys* anamorphs. *Stud Mycol.*, 46: 1–214.
- Schuster A., Schmoll M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87:787–799.
- Sinha, K. K., Choudhary, A. K., & Kumari, P. (2016). Entomopathogenic fungi. In *Ecofriendly pest management for food security* (pp. 475-505). Academic Press.
- St Leger, R. J., & Butt, T. M. (2016). *Beauveria bassiana*: Biology, ecology, and control of insect pests. Springer.
- St Leger, R. J., Wang, C., Fang, W. (2011). New perspectives on insect pathogens. *Fungal Biology Reviews*, 25(2), 84-88.
- Sung G. H., Hywel-Jones N. L., Sung J. M., Luangsa-Ard J. J., Shrestha B., Spatafora J. W. (2007). Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in mycology*, 57: 5-59.
- Toledo A. V., Virla E., Humber R. A., Paradell S. L., Lastra C.C.L. (2006). First record of *Clonostachys rosea* (Ascomycota: Hypocreales) as an entomopathogenic fungus of *Oncometopia tucumana* and *Sonesimia grossa* (Hemiptera: Cicadellidae) in Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92: 7–10.
- Tomilova O.G., Shaldyaeva E.M., Kryukova N.A., Pilipova Y.V., Schmidt N.S., Danilov V.P., Kryukov V.Y., Glupov V.V. (2020). Entomopathogenic fungi decrease *Rhizoctonia* disease in potato in field conditions. *PeerJ* 8, e9895.
- Tsavkelova E. A., Aleksandrova A. V., Cherdyntsera T. A., Kolomeitseva G. L. (2005). Netrusov AI. Fungi associated with the Vietnamese tropical orchids. *Mikol Fitopatol*, 39: 46–52.
- Tucker, S. L., & Talbot, N. J. (2001). Surface attachment and prepenetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annual review of phytopathology*, 39(1), 385-417.
- You J., Zhang J., Wu M., Yang L., Chen W., Li G. (2016). Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato. *Biological Control* 101: 31–38.
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, C. M. J. (2006). Induced resistance against plant pathogens. *Annual review of phytopathology*, 44(1), 353-385.
- Vázquez, M. B., Barrera, V., & Bianchinotti, V. (2015). Molecular identification of three isolates of *Trichoderma harzianum* isolated from agricultural soils in Argentina, and their abilities to detoxify in vitro metsulfuron methyl. *Botany*, 93(11), 793-800.
- Vega F. E. (2007). Naming names: The etymology of fungal entomopathogens. In: Ekesi S., Maniania N. K. (Eds.): *Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management*. Research Signpost, Kerala, 1-11.
- Viterbo A., Inbar J., Hadar Y., Chet I. (2007). Plant disease biocontrol and induced resistance via fungal mycoparasites. *The Mycota IV: environmental and microbial relationships*. Springer, Heidelberg, Germany, 127-146.

-
- Viterbo A., Ramot O., Chernin L., Chet I. (2002). Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1), 549-556.
- Wargane, V. S., Parate, S. R., Bramhankar, S. B., Rakhonde, P. N., Sonune, B. D., Mane, K. K., & Lavhe, N. V. (2020). Cultural and morphological characterizations of *Beauveria bassiana*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(1), 591-594.
- Whipps JM & Gerlagh M (1992) Biology of *Coniothyrium minitans* and its potential for use in disease biocontrol. *Mycological Research* 96: 897–907.
- Xiong, C., Li, Q., Li, S., Chen, C., Chen, Z., & Huang, W. (2017). In vitro anti-microbial activities and mechanism of 1-octen-3-ol against food-related bacteria and pathogenic fungi. *Journal of oleo science*, 66(9), 1041-1049.
- Xu, Y., Zhan, J., Wijeratne, E. M., Burns, A. M., Gunatilaka, A. A., and Molnár, I. (2007). Cytotoxic and Antihaptotactic beauvericin analogues from precursor directed biosynthesis with the insect pathogen *Beauveria bassiana* ATCC 7159. *J. Nat. Prod.* 70, 1467–1471.
- Yang L., Miao H. J., Li G. Q., Yin L. M., Huang H. C. (2007): Survival of the mycoparasite *Coniothyrium minitans* on flower petals of oilseed rape under field conditions in central China. *Biological Control*, 40(2): 179-186.
- Yang R., Han Y. C., Li G. Q., Jiang D. H., Huang H. C. (2007): Suppression of *Sclerotinia sclerotiorum* by antifungal substances produced by the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *Eur J Plant Pathol.*, 119:411–420.
- Zhang, X., Yang, Y., Zhang, L. (2010). Ultrastructure of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during cuticle penetration in the locust, *Locusta migratoria* (Insecta: Acrididae). *Journal of Orthoptera Research*, 19(1), 115-119.
- Zhao, H., Zhou, T., Xie, J., Cheng, J., Chen, T., Jiang, D., & Fu, Y. (2020). Mycoparasitism illuminated by genome and transcriptome sequencing of *Coniothyrium minitans*, an important biocontrol fungus of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Microbial genomics*, 6(3), e000345.
- Zimmermann G. (2007a). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17: 553- 596.
- Zimmermann G. (2007b). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 17: 879-920.
- Zimmermann G. (2008). The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paeecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paeecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. *Biocontrol Science and Technology*, 18(9): 865-901.

Seznam obrázků

| | |
|---|----|
| Obrázek 1 - Vliv entomopatogenních hub na růst, vývoj a tvorbu sklerocií fytopatogenního druhu houby <i>S. sclerotiorum</i> | 56 |
| Obrázek 2 - Detailní dokumentace antagonistického a mykoparazitického efektu v interakce mezi entomopatogenní houbou <i>M. brunneum</i> , mykoparazitickou houbou <i>C. minitans</i> a fytopatogenní houbou <i>S. sclerotiorum</i> pomocí testu CFU | 59 |

Seznam tabulek

| | |
|--|----|
| Tabulka 1 - Souhrnná tabulka morfologických znaků u kmenů hub rodu <i>Trichoderma</i> | 28 |
| Tabulka 2 - Testované fytopatogenní druhy hub | 29 |
| Tabulka 3 - Radiální růst, plocha kultury a výtěžnost spor vybraných druhů entomopatogenních hub | 36 |
| Tabulka 4 - Radiální růst, plocha kultury a výtěžnost spor vybraných druhů mykoparazitických hub | 36 |
| Tabulka 5 - Charakteristika druhů/kmenů fytopatogenních druhů hub | 38 |
| Tabulka 6 - Inhibice růstu (%) fytopatogenních druhů hub v kombinaci s entomopatogenními druhy, 7. den | 40 |
| Tabulka 7 - Vliv entomopatogenních hub na růst a velikost kolonie vybraných fytopatogenů, průměr kultury (mm) fytopatogenu, 7. den..... | 42 |
| Tabulka 8 - Vliv entomopatogenních hub na růst a velikost kolonie vybraných fytopatogenů rodu <i>Fusarium</i> spp., průměr kultury (mm) fytopatogenu, 7. den | 42 |
| Tabulka 9 - Vliv entomopatogenních hub na růst a velikost kolonie vybraných fytopatogenů rodu <i>Fusarium</i> spp., průměr kultury (mm) fytopatogenu, 7. den | 44 |
| Tabulka 10 - Statistické hodnocení zóny antagonismu mezi 4 kulturami entomopatogenních hub a fytopatogenním druhem uprostřed..... | 46 |
| Tabulka 11 - Statistické hodnocení zóny antagonismu mezi 4 kulturami entomopatogenních hub a fytopatogenním druhem uprostřed (pokračování tabulky) | 46 |
| Tabulka 12 - Produkce spor <i>B. bassiana</i> na 1 mm ² v interakci s fytopatogenními druhy hub (14. den, 25 °C) | 48 |
| Tabulka 13 - Produkce spor fytopatogenních druhů hub v interakci s entomopatogenní houbou <i>B. bassiana</i> | 50 |
| Tabulka 14 - Produkce spor <i>I. fumosorosea</i> na 1 mm ² v interakci s fytopatogenními druhy hub (14. den, 25 °C)..... | 51 |
| Tabulka 15 - Produkce spor fytopatogenních druhů hub v interakci s entomopatogenní houbou <i>I. fumosorosea</i> | 52 |
| Tabulka 16 - Průměry kultur a % inhibice růstu fytopatogenního druhu <i>S. sclerotiorum</i> v kombinaci s entomopatogenními druhy hub (duální test a test se 4 kulturami)..... | 53 |

| | |
|---|----|
| Tabulka 17 - Vliv entomopatogenních hub na vývoj sklerocií fytopatogenní houby <i>S. sclerotiorum</i> , 10. den | 54 |
| Tabulka 18 - Hodnocení zóny mykoparazitismu v interakci hub rodu <i>Trichoderma</i> s vybranými fytopatogenními druhy (měřeno 7. den od inokulace hub)..... | 60 |

Seznam grafů

| | |
|--|----|
| Graf 1 - Velikost kultur (mm ²) vybraných druhů entomopatogenních a mykoparazitických hub po 21. dnech kultivace | 37 |
| Graf 2 - Porovnání plochy kultury u jednotlivých druhů/kmenů vybraných fytopatogenních druhů hub | 39 |
| Graf 3 - Porovnání průměru středových kultur fytopatogenních druhů <i>S. sclerotiorum</i> , <i>R. solani</i> a <i>B. cinerea</i> v kontrolní variantě a v kombinaci s entomopatogenními druhy, 7. den | 41 |
| Graf 4 - Porovnání průměru středových kultur fytopatogenních druhů <i>F. oxysporum</i> , <i>F. proliferatum/solani</i> a <i>F. sporotrichoides</i> v kontrolní variantě a v kombinaci s entomopatogenními druhy | 43 |
| Graf 5 - Porovnání průměru středových kultur fytopatogenních druhů <i>F. avenaceum/tricintum</i> , <i>F. avenaceum</i> , a dvěma druhy <i>F. culmorum</i> v kontrolní variantě a v kombinaci s entomopatogenními druhy | 45 |
| Graf 6 - Antagonistická zóna mezi entomopatogenními houbami a fytopatogenním druhem (4 kultury EPF) | 47 |
| Graf 7 - Antagonistická zóna mezi entomopatogenními houbami a fytopatogenním druhem hub rodu <i>Fusarium</i> spp. (4 kultury EPF) | 47 |
| Graf 8 - Procentické vyjádření rozdílu v produkci spor <i>B. bassiana</i> na 1 mm ² v interakci s fytopatogenními druhy hub (14. den, 25 °C)..... | 49 |
| Graf 9 - Rozdíl v produkci spor fytopatogenních druhů v kontrolní variantě a v interakci s <i>B. bassiana</i> | 50 |
| Graf 10 - Procentické vyjádření rozdílu v produkci spor <i>I. fumosorosea</i> na 1 mm ² v interakci s fytopatogenními druhy hub (14. den, 25 °C)..... | 52 |
| Graf 11 - Rozdíl v produkci spor fytopatogenních druhů v kontrolní variantě a v interakci s <i>I. Fumosorosea</i> | 53 |
| Graf 12 - Inhibice růstu fytopatogenního druhu <i>S. sclerotiorum</i> v duálním testu a testu se 4 kulturami entomopatogenních druhů hub | 54 |
| Graf 13 - Hodnocení počtu sklerocií houby <i>S. sclerotiorum</i> | 55 |
| Graf 14 - Hodnocení zóny dotyku a zóny mykoparazitismu mezi kmeny hub rodu <i>Trichoderma</i> a fytopatogenním druhem <i>Botrytis cinerea</i> | 61 |
| Graf 15 - Hodnocení zóny dotyku a zóny mykoparazitismu mezi kmeny hub rodu <i>Trichoderma</i> a fytopatogenním druhem <i>Fusarium proliferatum/solani</i> kmen 55–F362 | |

| | |
|---|----|
| Graf 16 - Hodnocení zóny dotyku a zóny mykoparazitismu mezi kmeny hub rodu <i>Trichoderma</i> a fytopatogenním druhem <i>Fusarium avenaceum/tricintum</i> kmen 55-L4-Ca | 62 |
| Graf 17 - Hodnocení zóny dotyku a zóny mykoparazitismu mezi kmeny hub rodu <i>Trichoderma</i> a fytopatogenním druhem <i>Fusarium avenaceum</i> kmen 55-H1-C..... | 63 |
| Graf 18 - Hodnocení zóny dotyku a zóny mykoparazitismu mezi kmeny hub rodu <i>Trichoderma</i> a fytopatogenním druhem <i>Fusarium culmorum</i> kmen 317 | 63 |

Seznam použitých zkratek

EPF - Entomopatogenní houby

MPF – Mykoparazitické houby

Fyt – Fytopatogen

IMG - Inhibice růstu mycelia v %