

## Prohlášení

Diplomová práce s názvem „**Hodnocení biologického ošetření osiva vybraných polních plodin**“ (Evaluation of biological seed treatment of different field crops) nemůže být vložena do systému STAG vzhledem ke skutečnosti, že zveřejnění dat obsažených ve výše zmíněné práci v dubnu 2016 by bránilo podání patentové přihlášky.

Diplomová práce bude v tištěné podobě k dispozici v Akademické knihovně JU.

Vedoucí diplomové práce

Ing. Andrea Bohatá, Ph.D.



Autor diplomové práce

Bc. Eva Tichá



Vedoucí katedry KSPR

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.



V Českých Budějovicích 22.4.2016

---

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH ZEMĚDĚLSKÁ  
FAKULTA**

---

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství  
Studijní obor: Zemědělské inženýrství - Rostlinolékařství  
Katedra: Katedra speciální produkce rostlinné  
Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Hodnocení biologického ošetření osiva vybraných polních plodin

Vedoucí diplomové práce: Ing. Andrea Bohatá, Ph.D.  
Konzultant diplomové práce: Ing. Monika Strejčková  
Autor diplomové práce: Bc. Eva Tichá

---

České Budějovice

2016

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

Jméno a příjmení: Bc. Eva TICHÁ  
Osobní číslo: Z14404  
Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství  
Studijní obor: Zemědělské inženýrství - Rostlinolékařství  
Název tématu: Hodnocení biologického ošetření osiva vybraných polních plodin.  
Zadávací katedra: Katedra speciální produkce rostlinné

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

Cíl diplomové práce je zaměřen na biologické ošetření semen vybraných polních plodin pomocí entomopatogenních a mykoparazitických druhů hub.

- 1) Hodnocení základních růstových parametrů kmenů mykoparazitických hub rodu *Trichoderma* a entomopatogenních druhů hub.
- 2) Testování různých adheziv pro moření osiva pomocí entomopatogenních a mykoparazitických hub.
- 3) Hodnocení účinnosti kmenů mykoparazitických hub po jejich nanesení na osivo proti významným původcům onemocnění rostlin.
- 4) Vliv biologického ošetření osiva pomocí entomopatogenních a mykoparazitických hub na biologickou aktivitu semen v laboratorních podmínkách, včetně sledování vlivu teploty na klíčivost osiva.
- 5) Vliv biologického ošetření osiva pomocí entomopatogenních a mykoparazitických hub na eliminaci patogenů v laboratorních podmínkách.
- 6) Hodnocení vzháživosti biologicky ošetřeného osiva v laboratorních a polních podmínkách.

Rozsah grafických prací: 10 - 15 stran

Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

- Agrios, G. 2005: Plant Pathology. Elsevier Academic Press, pp. 935.  
Bailey A., et al., 2010: Biopesticides. CAB International Cambridge.  
Butt T.M., Goettel M.S. 2000: Bioassays of Entomopathogenic Fungi. In: Navon A., Ascher K.R.S. (Eds.): Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. CAB International, Wallingford, UK, 95-140.  
Ciancio A., Mukerji K.G. 2008: Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria, Vol. 3. Springer Science and Business Media B.V., pp. 419.  
Esser K., Lemke P.A. 2002: The Mycota XI-Agricultural Applications. Springer, Verlag Berlin Heidelberg, pp 388.  
Butt T.M., Jackson C., Magan N. 2001: Fungi as biocontrol agents - progress, problems and potential: CAB International, Wallingford, UK, 23-69.  
Články získané z bibliografické a citační databáze Web of Science a bibliografické databáze CAB, BA, ZR.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Andrea Bohatá, Ph.D.  
Katedra speciální produkce rostlinné  
Konzultant diplomové práce: Ing. Monika Strejčková  
Katedra speciální produkce rostlinné

Datum zadání diplomové práce: 9. března 2015  
Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2016

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

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
ČESKÝCH BUDĚJOVIC  
LEHOSŤELSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Student: 143 11

L.S.

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

V Českých Budějovicích dne 9. března 2015

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, v úpravě vzniklé vypuštěním částí archivovaných Zemědělskou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích, na jejích internetových stránkách.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Děkuji Ing. Andree Bohaté, Ph.D., za metodické a odborné vedení, podnětné připomínky a cenné praktické rady, které mi poskytovala v průběhu zpracování této práce. Dále děkuji Ing. Monice Strejčkové za pomoc, rady a připomínky a zaměstnankyni Katedry speciální produkce rostlinné, Olze Divišové za vytvoření vhodných pracovních podmínek, vstřícný přístup a pomoc při zakládání laboratorních pokusů.

## ABSTRAKT

Diplomová práce je zaměřena na biologické ošetření semen vybraných polních plodin pomocí adheziv v kombinaci s entomopatogenní houbou *Metarhizium anisopliae* a mykoparazitickou houbou *Trichoderma virens*. Jako adheziva byla vybrána potravinářská aditiva guarová guma, xantanová guma a karboxymethylceluloza. V rámci experimentů v laboratorních podmínkách bylo hodnoceno procento klíčivosti obilky ječmene jarního, semen řepky ozimé a okurky seté po 24 hodinách a energie klíčení a vitalita v průběhu 2 – 5 dnů. Adheziva v kombinaci s vláknitými houbami měla pozitivní vliv na růst a vývoj zárodečných kořínek ječmene jarního a růst a vývoj klíčících rostlin u všech testovaných plodin. Proběhlo hodnocení vzcházivosti biologicky ošetřeného osiva v laboratorních a polních podmínkách. Dále byla v diplomové práci ověřována schopnost kolonizace prostředí entomopatogenní houbou *M. anisopliae*, kdy byla houba do substrátu vnesena pomocí namožených semen. Z výsledků vyplývá, že introdukovaná houba je schopna po určitém čase infikovat larvy *Tenebrio molitor* a *Galleria mellonella*.

Klíčová slova: biologická ochrana, biologické ošetření osiva, adheziva, *Trichoderma virens*, *Metarhizium anisopliae*, biologická hodnota osiva

## **ABSTRACT**

The thesis is focused on biological seed treatment of selected field crops using adhesive in combination with entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and mycoparasitic fungi *Trichoderma virens*. Guar gum, xanthan gum and carboxymethylcellulose were chosen as the adhesive. Within the experiments in laboratory conditions, the percentage of kernels germination of spring barley, winter oilseed rape and a cucumber was evaluated after 24 hours and energy of germination and vitality during 2 – 5 days.

The adhesive in combination with the filamentous fungi had positive influence on growth and development of embryonic roots of spring barley and growth and development of seedlings in all tested crops.

The evaluation of plant emergence took place under laboratory and field conditions and the plants were biologically treated. Furthermore, the ability to colonize environment of the entomopathogenic fungus *M. anisopliae* was verified in this thesis. The fungus was injected into the substrate using seed dressings.

According to the results, the introduced fungus is able to infect larvae *Tenebrio molitor* and *Galleria mellonella* after specific time.

Key words: biological protection, biological seed treatment, adhesives, *Trichoderma virens*, *Metarhizium anisopliae*, biological seed value



## **OBSAH:**

1.	ÚVOD	10
2.	LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
2.1.	Biologická ochrana	11
2.2.	Strategie v biologické ochraně	17
2.3.	Entomopatogenní houby	19
2.4.	Mykoparazitické houby	26
2.5.	Adheziva používaná v biologickém moření osiva	30
2.6.	Biologické moření osiva	32
2.7.	Biopreparáty	35
2.8.	Semenářské parametry	36
3.	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	39
4.	MATERIÁL A METODIKA	40
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY	41
6.	DISKUSE	42
7.	ZÁVĚR	43
8.	SEZNAM LITERATURY	44

## 1. ÚVOD

V dnešním moderním zemědělství je ve velké míře používáno chemické ošetření plodin proti chorobám a škůdcům. Důvodem a zároveň výhodou využívání tohoto způsobu ošetření je jednoduchá aplikace a okamžitý účinek. Ovšem jako moderní a vzdělaná společnost bychom měli myslet na důsledky a následky konvenčního (chemického) hospodaření. Rezidua pesticidů a dalších chemických látek využívaných v konvenčním zemědělství ovlivňují a budou ovlivňovat další generace a jejich zdraví. Půda bude i nadále ve větší míře kontaminovaná rezidui, což ovlivní přirozený biologický cyklus. Problém dnešní společnosti vězí v tom, že je krátkozraká a pohodlná jakkoli se omezovat na úkor svých osobních potřeb a zmírnit tím tak následky průmyslového působení na naši planetu. Bohužel, se již jednání lidí, zejména monopolních společností projevuje na stavu planety a to v globálním měřítku.

V zemědělství se jako vhodným prostředkem - ke zmírnění těchto fatálních následků, jeví využívání biologické ochrany rostlin. Tento způsob ochrany není novinkou, naopak byl v historii součástí prvních pokusů o ochranu rostlin. Díky vyhlášce o integrované ochraně rostlin, která je platná od 1. 1. 2014, je pro všechny profesionální uživatele, tedy zemědělce, povinné dodržovat legislativně zavedené zásady IOR. Součástí vyhlášky je preference využívání biologické ochrany před chemickým ošetřením plodin. Moderní prostředky biologické ochrany jsou vysoce a dlouhodobě účinné a zároveň jsou šetrné k lidskému zdraví a životnímu prostředí. Jsou nízcí či netoxické k necílovým druhům. Používané bioagens tak zvyšují bohatost, diverzifikaci a stabilitu přírodních systémů v zemědělské krajině a umožňují tak kvalitní produkci. Kromě toho, že biopreparáty nejsou toxické, jsou navíc vhodné pro alternativní systémy hospodaření. Biologickými prostředky lze též dosáhnout stejně účinného ošetření osiva jako pesticidy. Což je zároveň i cílem této diplomové práce.

Diplomová práce je zaměřena na biologické ošetření semen vybraných polních plodin pomocí entomopatogenních a mykoparazitických druhů hub za účelem vnesení těchto užitečných vláknitých hub do cílového agroekosystému pomocí namořených semen.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1. Biologická ochrana

V dnešní době je biologická ochrana odborníky chápána jako ekologicky, hygienicky i ekonomicky nejvhodnější metoda k úspěšnému potlačování škůdců (Tichá, 2001). V roce 1919, Harry Smith z kalifornské univerzity definoval biologickou ochranu jako potlačení populace škůdců působením jejich přirozených nebo introdukovaných nepřátel (Rehceigl, 2000). Populace všech živých organismů je do určité míry snižována přirozenou činností jejich predátorů, parazitů, parazitoidů, antagonistů a patogenů. Tento proces je uváděn pod pojmem „přirozená ochrana“, ale pokud jsou škůdci cíleně introdukováni do agroekosystémů je tento proces nazýván „biologická ochrana“ a organismy, které se podílejí na biologické ochraně, se nazývají přirození nepřátelé (Hajek, 2004).

Termín biologická ochrana definuje regulaci škůdců pomocí jejich přirozených nepřátel. V širším slova smyslu se užívá pro jakoukoli podporu organismů, které se nějak podílejí na regulaci populací škůdců, v omezeném významu pro cílené vysazování uměle namnožených užitečných organismů tzv. bioagens (analogicky ke slovu agens označujícímu účinnou látku) (Tichá, 2001). Cílem biologické ochrany není úplné vymýcení populací škodlivých činitelů, ale regulace jejich četnosti na přijatelnou úroveň (Van Driesche a Heinz, 2004). Regulace škodlivých organismů pod hranici ekonomické újmy je cílem aplikované biologické ochrany (DeBach, 1964).

Z hlediska množství introdukovaných bioagens proti škůdcům je za nejlepší řešení považováno optimum středních hodnot tzv. „*Goldilocks hypothesis*“. Pokud bude počet introdukovaných bioagens příliš nízký může dojít k imbreedingu, a naopak pokud bude počet bioagens vysoký, může nastat tzv. „*Allee efekt*“ (Drake *et al.*, 2004). V populacích může nastat takzvaný „*Allee efekt*“ (podle amerického ekologa W.C. Alleeho), kdy se zvyšující se velikostí populace roste zdatnost každého jejího člena. Což může vést až ke vzniku kritické populační velikosti, která je nutná k přežití populace jako celku. Tudiž klesne-li velikost populace pod tuto hodnotu, tak je pravděpodobné, že populace vymírá (Courchamp *et al.*, 2008).

Mezi pozitiva biologické ochrany patří i snižování reziduí v produktech i v potravě, zachování přirozených nepřátel a zvýšení biodiverzity ekosystémů (Lacey *et al.*, 2001). Bagar (2011) uvedl jako nevýhody biologické ochrany nutné správné určení škůdců, znalost jejich bionomie - nutná znalost bionomie užitečných organismů a působení biologických

přípravků a jejich vztahu ke škodlivým organismům - termín použití, podmínky, často omezená doba skladování – u některých typů pomalý nástup účinnosti - nutná včasnost. První zmínka o predátorech používaných jako nástroj k hubení hmyzu byla v roce 900 n. l., kdy čínští pěstitelé citrusů umísťovali mravence (*Oecophylla smaragdina* F.) na stromy jako ochranu proti jiným škůdcům (Rechcigl, 2000). Jak doplnil van den Bosch (1973) byli mravenci používáni proti listožravým škůdcům. Van den Bosch (1973) také uvádí, že první zaznamenal endoparazitismus v sedmnáctém století vědec Vallisnierim, který si všiml jedinečné asociace mezi parazitickým lumčíkem (*Apanteles glomeratus*) a škůdcem, běláskem řepovým (*Pieris rapae*).

Prvním významným úspěchem se stala introdukce australského sluněčka *Rodolia cardinalis* do Kalifornie, která vyřešila problém zavlečeného červce *Icerya purchasi* (Honěk *et al.*, 2008). Rao *et al.*, (1971) píše, že proti červci, který byl do Indie zavlečen dovozem květin z Cejlonu, bylo jako bioagens použito sluněčko *Rodolia cardinalis*.

První registrovaný mykoinsekticid byl na bázi houby (*Hirsutella thompsonii*) pod obchodním názvem Mycar<sup>®</sup>. Již v roce 1920 byla *H. thompsonii* známá tím, že způsobovala závažné nákazy u svlušek. Registrace tohoto přípravku byla zrušena v roce 1988 (Hajek, 2004).

Biologická ochrana rostlin je práce s živými organismy, a proto je ve většině případů složitější než ochrana chemická. Je třeba pamatovat, že příroda je jedinečná a musí se dbát, aby nedošlo k porušení její biologické rovnováhy (Hofmanová, 2003).

### **2.1.1 Využití biologické ochrany v různých kulturách**

#### Skleníky

Zatím je více propracována biologická regulace výskytu živočišných škůdců rostlin pěstovaných ve skleníkových podmínkách (Zidek, 1992). Skleník poskytuje příznivé podmínky pro použití biologické ochrany rostlin tj. stabilní a regulovatelné podmínky prostředí (teplota, vlhkost vzduchu, půdy), relativně dlouhé setrvání kultury a ohraničený prostor, který brání škůdcům v migraci a bioagens opustit chráněný porost (Bagar, 2011). V ČR se začala biologická ochrana ve sklenících uplatňovat začátkem osmdesátých let minulého století v tehdejším JZD Chelčice (Hofmanová, 2003). Velmi často používaným přirozeným predátorem ve sklenících proti svlušce chmelové (*Tetranychus urticae* Koch) je dravý roztoč *Phytoseiulus presimilis* (Hawkins a Cornell, 1999).

## Sady a vinice

Mezi pozitiva patří, že u sadů i vinic se jedná o víceleté kultury, proto může dojít k utvoření rovnovážného stavu ve vztahu bioagens – hostitel. Často je využíván dravý roztoč *Typhlodromus pyri* proti fytofágním roztočům (sviluška chmelová a svilučka ovocná, hálčivci). Také jsou čteně používány mikrobiální přípravky proti obalečům a dalším motýlím škůdcům (*Bacillus thuringiensis*, var. *kurstaki*, viry granulózy proti obalečům a dalším housenkám) (Bagar, 2011).

## Polní plodiny

V současných systémech hospodaření jsou populace škůdců regulovány většinou chemicky. Ve skutečnosti je biologická ochrana v polních podmínkách používána pouze proti zavíječi kukuřičnému (*Ostrinia nubilalis*). V pěstování, polních plodin a zelenin se dnes významně používají parazitické chalcidky rodu *Trichogramma* proti zavíječi kukuřičnému, můře bavlníkové, můře zelné aj. Z celosvětového pohledu je nejvýznamnější používání mikrobiálních preparátů na bázi různých kmenů bakterie *Bacillus thuringiensis*, zejména kmene *kurstaki* a *aizawai*. Využívá se též řada biopreparátů proti původcům houbových nákaz (Bagar, 2011). Lze ale podporovat přirozené nepřátele škůdců, a tak vytvářet alespoň částečnou biologickou bilanci a tím regulovat výskyt škodlivých organismů. Je důležité chránit a vytvářet přirozené biokoridory, které jsou vhodné k přezimování bioagens a tato místa musí umožňovat jejich ukrytí v době polních prací například při orbě (Hofmanová, 2003).

### **2.1.2 Přirození nepřátelé**

Hroudová *et al.*, (2006) uvádí, že se jedná o bioagens, tzv. přípravky na bázi makroorganismů, jejichž základem jsou živé organismy tzn. predátoři (draví živočichové, kteří svou kořist ihned usmrtí a pozřou), paraziti (živočichové, kteří se živí v tělech nebo na tělech hostitele, přičemž jej zpravidla usmrcují) či parazitoidi (jejich vývoj probíhá uvnitř těla hostitele a po ukončení vývoje parazitoida hostitel hyne). Bagar (2011) píše, že mikrobiální přípravky jsou založeny na bázi mikroorganismů, tedy parazitických hub, bakterií, virů a hlístic.

## První skupina přirozených nepřátel

### Makroorganismy

Bagar (2011) uvádí, že do skupiny makroorganismů patří predátoři a parazitoidi z celé řady živočišných skupin. Využívá se různých typů formulací a způsobů aplikace. Do této skupiny patří z hlediska biologického zařazení celá škála bezobratlých živočichů.

### Paraziti (parazitoidi)

Podstata parazitace spočívá v tom, že se larvy parazitických blanokřídlých vyvíjejí v různých vývojových stádiích škůdce, čímž jej zahubí. Ovšem také dospělci mohou nabodávat kukly nebo larvy a sát z nich tekutiny, čímž bychom je zařadili asi spíše mezi predátory. Larva parazitoida se ke svému hostiteli dostává různými cestami. Nejčastěji je samičí nakladeno vajíčko přímo na vajíčko nebo larvu hostitele (Kocian, 1994). Larvy se živí tkáněmi a tělními tekutinami hostitele. Při vyhledávání vhodného hostitele využívá samička parazitoida především pachové signály, v menší míře také zrakové podněty (Honěk *et al.*, 2008). Hmyzí parazitoidi se vyvíjejí uvnitř (endoparazité) nebo vně (ektoparazité) těla hostitele, což záleží na druhu parazitoida. Vývin parazitoidů je úzce spojen s jedním hostitelem a nemůže se z jednoho hostitele přesunout na jiného. Parazitoidi jsou obvykle menší než jejich hostitelé a volně žijící jsou pouze jako dospělci. Nejčastěji používanými parazitoidy ve sklenicích jsou vosičky (*Hymenoptera*), zahranující *Encarsia formosa*, *Eretmocercus eremicus*, *Aphelinus abdominalis*, *A. Alemani*, *Aphidius ervi*, *Dacnusa sibirica*, *Diglyphus isaea* a *Leptomastix dactylopii* (Heinz, 2005).

### Predátoři

Predátoři jsou volně žijící organismy, které musí pro své přežití zabít kořist a to jako dospělci nebo jako některá vývojová stádia. Predátoři jsou obvykle větší než jejich kořist. Komerčně dostupní predátoři zahrnují hmyz a roztoče, třásněnky (*Thysanoptera*), ploštice (*Hemiptera*, *Orius spp.*), zlatoočka (*Neuroptera*, *Chrysoperla spp.*), brouky (*Coleoptera*, různá slunéčka), dvoukřídli (*Diptera*) a dravé roztoče (Heinz, 2005). Predátoři mohou být polyfágní což znamená, že mají široké spektrum hostitelů (*Chrysopa carnea* Stephens), oligofágní, kteří mají omezené spektrum hostitelů (mšicožravá slunéčka nebo pestřenky) nebo monofágní, kteří jsou vázáni na jeden druh kořisti. (*Rodolia cardinalis*, která se živí

pouze škůdcem bavlníku *Icerya purchasi* a jeho blízkými příbuznými) (Quezada a DeBach, 1973).

Druhá skupina přirozených nepřátel

### Mikroorganismy

Jako mikroorganismy jsou brány organismy, které jsou dobře viditelné pouze pod mikroskopem. Tvoří velmi rozmanitou skupinu, do které patří viry, bakterie, sinice, prvoci a také mikroskopické houby a řasy. Některé mikroorganismy jsou schopny vyvolat hromadné nákazy škůdců doprovázené zhroucením jejich populací, a proto jsou již mnoho desítek let uměle kultivovány a používány při biologickém boji proti škůdcům (Tichá, 2001).

### Entomopatogenní viry

Nejvýznamnější čeleď v biologické ochraně asociovaná s hmyzem je *Baculoviridae* (tzv. bakuloviry). Viry v této skupině způsobují infekce jen u hmyzu a jsou biochemicky i geneticky velmi odlišné od virů, které napadají obratlovce, a proto jsou považovány za bezpečné pro lidi (Bailey *et al.*, 2010). První zmínka o infekci způsobené bakuloviry pochází ze starověké Číny, kdy virus napadl bource morušového (*Bombyx mori*). První záznam západní civilizace pochází z básně italského biskupa z 16. století. V 19. století byly mikroskopicky detekovány vysoce reflektivní krystaly, plující v „rozpuštěných“ zbytech mrtvých housenek či jiném hmyzu (Rechcigl, 2000).

Při potlačování škůdců v přírodě hrají prim zejména entomopatogenní viry, z nichž nejznámější jsou viry polyedrické, např. *Borrelina* napadající mnišky nebo rod *Birdia* patogenní pro housenice některých hřebenulí (Tichá, 2001). V porovnání s parazitoidy, predátory a patogeny nejsou často používány v klasické biologické ochraně. Nicméně v několika případech jejich použití dosáhlo ohromujících úspěchů (Hajek, 2004). Virové epidemie doprovázejí masová přemnožení hmyzu, obvykle končí tak, že všude visí za poslední pár nožek mrtvé housenky a jejich tělní obsah je šedavá tekutina, která třísní větve a kmeny stromů.

U polních, jednosezónních rostlin toto potřísnění nepřečká zimu a musí se nahradit umělým namnožováním a výsevem virového materiálu (Hrdý *et al.*, 1991).

Tyto přírodní fenomény se využívají pro umělé namnožování a následný výsev virózního materiálu. Jde o využití virů jaderné polyedrie a granulózy (Zidek *et al.*, 1992).

## Entomopatogenní bakterie

Čeleď *Bacillaceae* je nejvýznamnější entomopatogenní bakterie používaná v biologické ochraně. Obzvláště rody *Clostridium* a *Bacillus*. Druh *Bacillus thuringiensis* je pro své vlastnosti využíván jako biopesticid (Landa, 2002). Ještě specifitější je *Bacillus sphaericus*, který napadá pouze komáry (Tichá, 2001). Bakterie pomáhají regulovat různé druhy škůdců ještě účinněji než viry. Proto se tak významně podílejí na udržování přírodní rovnováhy. Některé druhy jsou již po desetiletí uměle množeny a používány k výrobě biopreparátů (Tichá, 2001).

Nejnámější a nejvýznamnější je sporulující tyčinkovitá bakterie *Bacillus thuringiensis*. *Bacillus thuringiensis* (Bt) je v přírodě široce rozšířený může se vyskytovat v půdě, na povrchu rostlin a v prachu ze skladovaného obilí (Bailey *et al.*, 2010). V tyčinkách při sporulaci vznikne krystal, který obsahuje prototoxin, ten umožňuje bakterii proniknout do těla hmyzu. Ve střevní trávici šťávě se rozpouští, přičemž se uvolňuje toxin, který vyvolává rozpad střevních buněk. Mezerami, které tím vzniknou, bakterie pronikají do těla hmyzu a zabíjejí jej. Ve střevě jiného hmyzu než housenek se krystal na toxické produkty neštěpí nebo jen nepatrně, takže pro jiné organismy včetně člověka je neškodný (Zidek *et al.*, 1992). Endotoxin po pozření vnímavým druhem hmyzu působí okamžité ochrnutí střeva, během 1-2 hodin zastavení příjmu potravy a následné celkové ochrnutí a úhyn organismu (Hluchý *et al.*, 2008).

Doposud bylo izolováno více než 1000 kmenů této bakterie, mezi nimiž nacházíme skupiny zvláště účinné vůči určitým hostitelům. Existuje více než 25 sérotypů *Bacillus thuringiensis*, každý s jinými vlastnostmi. Preparáty na bázi *B. thuringiensis* aktivní na komáry nejsou účinné na housenky (Zidek *et al.*, 1992). Je několik důležitých poddruhů *B.t.*, které jsou registrovány, uváděny a prodávány jako produkty proti různým škůdcům. Patří sem *Bacillus thuringiensis* subs. *aizawai* (*B.t.a.*) proti škůdcům rodu *Lepidoptera* kteří jsou méně náchylní vůči *Bacillus thuringiensis* subs. *kurstakii*, *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* proti moskytům a muchničkám a *Bacillus thuringiensis* subs. *tenebrionis* proti mandelinkám z čeledi *Chrysomelidae* (Rechcigl, 2000).

## Entomopatogenní hlístice

Vyskytují se téměř ve všech typech biotopů, včetně polí, sadů a zahrad. Jde však o půdní organismy a tak jejich přítomnost bývá lidskému oku skryta. Potenciál masového množení dělá z hlístovek vhodný prostředek pro boj s hmyzími škůdci (Nermuť *et al.*, 2012).



Hlístovky jsou sice půdní organismy, ale jediným stadiem vyskytujícím se volně v půdním prostředí je larva třetího instaru – invazní larva. Invazní larvy hlístic 3. stádia se vyskytují v půdě, ve vodě i na rostlinách. Ta má za úkol nalézt nového hostitele a proniknout do jeho těla a pro tuto činnost je náležitě vybavena. Před vnějším prostředím ji chrání zesílená kutikula a uzavření trávicí soustavy. Invazní larvy tudíž nepřijímají potravu, ale díky značným energetickým zásobám mohou přežívat velmi dlouho. V půdě přežijí několik měsíců, v laboratorní kultuře v chladovém boxu i několik let a stále si zachovávají schopnost napadnout hostitele. Do těla hmyzu se dostávají s potravou, ústním ústojím nebo řitním otvorem, dýchacími otvůrkou nebo přes tenkou pokožku mezi tělními segmenty. Po proniknutí do těla hostitele se symbiotické bakterie uvolní z těla hlístice a rozmnoží se. Při tom vylučují jed a během 24 – 48 hodin hostitele zabíjejí.

Některé druhy hlístic z rodu *Heterorhabditis* a *Steinernema* jsou laboratorně množeny a aplikovány proti půdním larvám lalokonosců či smutnic (Nermuť *et al.*, 2012, Hluchý *et al.*, 2008). Experimentální nákaza se provádí na larvách zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) (Hyršl, 2012). Pultar (2003) napsal, že hlístice *H. megidis* a *H. bacteriophora* jsou aplikovány formou zálivky zahradnického substrátu nebo přímou zálivkou rostlin. Jsou účinné proti larvám lalokonosců na hrnkových rostlinách, zahradnických školkách a na jahodách. *Phasmarhabditis hermaphrodita* je používána proti plžům.

## **2.2. Strategie v biologické ochraně**

### **2.2.1 Inokulativní introdukce – klasická biologická ochrana**

Biologická ochrana využívá živé organismy k omezování populace škůdců již od starověku. Avšak v roce 1889, A. Kobele záměrně introdukoval slunéčko australské z Nového Zélandu do kalifornských pomerančových plantáží v roce 1889. Slunéčko výborně hubilo perlovce zhoubného (*Pericerya purchasi*).

Tento mezník značí počátek moderní klasické biologické ochrany – dovoz a vypuštění organismů mimo svůj původní areál, za účelem ochrany proti jednotlivým druhům škůdců (Howarth, 1991). Landa (2002) doplnil, že se jedná o druh parazita, parazitoida, predátora nebo patogenního mikroorganismu, který je v malém množství záměrně introdukovan do nového areálu rozšíření škodlivého organismu. Bioagens zredukuje výskyt škodlivého organismu na nízkou, hospodářsky akceptovatelnou úroveň a následně se mezi nimi vytvoří dlouhodobá rovnováha. Takto vyrovnaný systém dlouhodobě zabraňuje namnožení

škodlivého organismu, které by se mohlo stát kalamitním. Typickým příkladem inokulativní reintrodukce je zavádění (rezistentních) populací dravého roztoče *Typhlodromus pyri* (Acarina; Phytoseiidae) do ovocných sadů a vinic (Landa, 2002).

Ekologický proces inokulativní introdukce umožňuje minimální vstupy technologických prvků jako je biotechnologie. Introdukce umožňuje nízkokapacitní chovy pro následnou introdukci malého množství jedinců, odběr a introdukci v místě jejich přirozeného výskytu (Pultar, 2003).

## 2.2.2 Strategie augmentativní introdukce - (augmentace – zvětšení, zesílení, rozšíření)

### Sezónní inokulativní introdukce

Jedná se o opakovanou introdukci přirozených nepřátel a bioagens, jejímž cílem je dosažení jak okamžitého, tak i dlouhodobějšího potlačení škodlivých organismů, během pěstebního cyklu. Rozdíl při porovnání inokulativní introdukce s inundativní metodou je, že ochrana není směřována pouze na jednorázové potlačení vývojového cyklu fytopatogenního mikroorganismu, ale na navození účinnosti, u které nedojde k překročení tolerovatelné úrovně (ekonomický práh škodlivosti), ani při více infekčních cyklech fytopatogenní houby. Tato metoda je využívána v rámci efektivních programů, pro ochranu různých druhů zelenin (zejména plodových) pěstovaných ve sklenicích a foliovnicích (Bagar, 2007). Například proti škůdcům molici skleníkové a molici bavlníkové v systému sezónní inokulativní introdukce používá parazitická vosička *Encarsia formosa*. Dále se proti sviluškám vysazují draví roztoči z čeledi *Phytoseiidae* a proti regulaci mšic ve sklenicích parazitické vosičky *Aphidius colemani* (Van Lenteren *et al.*, 2000). Heinz (2004) uvádí, že umělá produkce makroorganismů a kultivace mikroorganismů jsou nedílnou součástí těchto zásahů.

### Inundativní introdukce

Již existující populace je posílena vysazením přirozených nepřátel, což je podstatou této metody. Vysazení přirozených nepřátel probíhá ve velkém množství aby v období rychlého nárůstu populace škodlivých agens včas zasáhli (Bale *et al.*, 2008). Například využívání parazitických vosiček rodu *Trichogramma* (např. vosička *Trichogramma evanescens* x zavíječ kukuřičný *Ostrinia nubilalis*) patří mezi úspěšné modely této strategie. Nebo využívání biopreparátů na základě entomopatogenních mikroorganismů (např. *Bacillus*

*thuringiensis* nebo *Beauveria bassiana* x mandelinka bramborová *Leptinotarsa decemlineata*) (Landa, 2002). Příkladem může být také biologická ochrana před houbovým organismem (*Phyllachora huberi*) napadající listy fíkovníku a to pomocí hyperparazitů *Cylindrosporium concentricum* a *Dicyema pulvinata* (Junquiera a Gasparotto, 1991).

### **2.2.3 Strategie podpory a konzervace přirozených nepřátel**

Princip této strategie je součástí integrované ochrany rostlin, strategie je zejména využívaná v ekologickém systému hospodaření a v jiných alternativních typech hospodaření. Ke strategii podpory a konzervace přirozených nepřátel patří řada agroekologických a agronomických opatření (např. záměrné zakládání stabilních biokoridorů, diverzifikace hostitelských rostlin pěstovaných v polních podmínkách, minimalizace agrotechnických zásahů, atraktance přirozených nepřátel) (Landa, 2002). Ochrana přirozených nepřátel závisí více méně na změnách přirozeného prostředí, hlavním krokem je soudné používání chemického ošetřování (DeBach, 1964).

### **2.3. Entomopatogenní houby**

V druhé polovině 19. století začaly být entomopatogenní houby používány jako prostředek k ochraně proti hmyzím škůdcům (Woods, 1974). Sewify (2014) dodává, že entomopatogenní houby patří k prvním objeveným, nejčastěji popisovaným a tím pádem i nejznámější entomopatogenním mikroorganismům, které jsou v interakci s hmyzem. K jejich objevení došlo zřejmě proto, že růst těchto hub na povrchu těl hostitelů je na rozdíl od jiných skupin entomopatogenních organismů snadno vizuálně patrný. Butt *et al.*, v roce 2001 doplňují, že kvůli své účinnosti proti širokému spektru hmyzích škůdců byly entomopatogenní houby tolik zkoumány. Roku 1888 Krassilstchik započal používání entomopatogenních hub jako biopesticidů (Glare, 2004). Nejrozsáhlejší skupinu hmyzích patogenů tvoří obligátní nebo fakultativní entomopatogenní houby. Ovšem některé druhy mohou za určitých podmínek působit jako symbionty (Landa, 1994). Entomopatogenní houby se řadí do skupiny významných organismů, které regulují populace hmyzu, jsou původci přirozených epizootií. Právě tyto organismy jsou používány v ochraně rostliny jako bioagens (Butt a Goettel, 2000). Meyling a Eilenberg (2007) dodávají, že entomopatogenní organismy v agroekosystému jsou přirozenými nepřáteli hmyzích škůdců. Zvláštní skupinou jsou druhy hub, které mohou vyvolávat u různých vývojových stádií hmyzu primární onemocnění (Landa, 1998). Ainsworth (1968) doplňuje, že houbové nákazy hmyzu, které jsou běžně

rozšířené, časté a v některých případech tak závažné, že v dané lokalitě téměř vyhubí hmyzí populace. Houby mohou růst i na mrtvém substrátu organických zbytků, patogenita vůči hmyzu je jednou z možností existence (Weiser, 1966). Bakterie a viry musí proniknout přímo do těla hmyzu, aby došlo k propuknutí nákazy narozdíl od této skupiny agens stačí k vyvolání nákazy entomopatogenní houbou pouze přímý kontakt a průnik přes pokožku hmyzu (Leger a Wang, 2009). Minerály, lipidy, katecholaminy a hlavně chitin a proteiny tvoří exoskeleton hmyzu. Zejména chitinázy a proteázy umožňují napadení hostitele entomopatogenními houbami jako jsou *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Nomuraea riley* a *Aspergillus flavus* (Kramer a Muthukrishnan, 1997). Rod entomopatogenních hub *Metarhizium* a *Beauveria* produkuje sloučeniny, které jsou toxické pro zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) (Burgess a Hussey 1971). Podle Weisera (1966) hraje významnou roli u houbových nákaz vliv vnějšího prostředí, stav hostitele a dávka houbového inokula což jsou odlišné podmínky od ostatních entomopatogenních organismů. Nielsen *et al.*, (2007) píše, že hub, které jsou schopny způsobit infekci hmyzu a jeho následný úhyn je známo více jak 750 druhů. V současnosti je v biologické ochraně komerčně využíváno zhruba 25 druhů hub (Charnley, 1997).

### 2.3.1 Vývojový cyklus entomopatogenních hub

Vlastnosti patogena a hostitele ovlivní vznik a průběh infekce. Konidie podněcují houbové onemocnění a předpokladem vzniku tohoto onemocnění je přichycení konidií na povrch těla hostitele. Při prvním kontaktu vytváří konidie některých druhů hub pevnou vazbu s kutikulou hostitele, pro tento proces jsou vybaveny adhezivními látkami. Některé druhy houby jako je *Isaria fumosorosea* produkují hydrofobní konidie, které jsou silné, suché s rozdílně uspořádaným povrchem. Prvotní přilnutí konidií probíhá pomocí působení elektrostatických sil přítomných na povrchu hostitele a molekulárních interakcí nebo vzájemným působením mezi kutikulou hmyzu a konidiemi. Houba se začne vyvíjet v místě doteku (Samson *et al.*, 1988). Konidie, které jsou energeticky dostatečně vybaveny k vyklíčení, produkuje většina entomopatogenních hub. Proto nemusí dojít k absorpci externích živin. Abiotické faktory jako relativní vzdušná vlhkost a zejména teplota, tak převážně ovlivňují průběh klíčení (Landa 1994, Boucias *et al.*, 1988).

Z apresoria (tzv. terčíku) rostou infekční klíčky, které do těla hostitele proniknou přes kutikulu (Roberts a Yendol, 1971). Weiser (1966) dodává, že nákaza je ve většině případů spojena s penetrací houbových vláken kutikulou, což je podobné jako cesta nákazy

kontaktních insekticidů. Konidie mohou pronikat do hostitele také přes řitní otvor, dýchací otvory, otvor pohlavního aparátu či přes různá poranění hmyzu (Zimmermann, 2007). Houba proniká do těla hostitele pomocí penetračního hrotu. Po průniku dojde k tvorbě invazivních hyf, které rychle kolonizují tělní dutinu. Uvnitř tělní dutiny se začínají vytvářet hyfová tělíška (blastospory), která se množí pučením v hemocelu. Organismus houby musí po proniknutí do těla hostitele překonat jeho imunitní systém pomocí produkce různých toxinů a jiných sekundárních metabolitů (Inglis *et al.*, 2001). Živiny obsažené v kutikule poté živiny z vnitřních orgánů a tkání hostitele slouží jako zdroj živin pro houbu (Landa, 2002). Castrillo *et al.*, (2005) doplňují, že blastospory v krátké době vyplňují a mumifikují tělo hostitele. Fáze saprotrofní začíná po skončení parazitické fáze po usmrcení hostitele (Inglis *et al.*, 2001). Toxiny hub rodu *Entomophthora*, jsou bílkovinného charakteru. Pravděpodobně enzymy způsobují barevné změny napadeného hostitele. (Burgess a Hussey, 1971).

Osborne, Landa (1992) a Tanada, Kaya (1993) doplňují, že za vhodných podmínek dochází k tzv. proliferaci, tedy k prorůstání houby na povrch těla hostitele. Sporulací tedy tvorbou nových „sekundárních“ konidií je ukončena saprotrofní fáze a nové konidie si jsou schopny v dormantním stavu udržet životnost až po dobu několika měsíců. Šíření patogena je umožněno pasivním přenosem konidií pomocí hydrochorie nebo anemochorie. Landa (1994) dodává, že kontakt zdravých jedinců s napadenými je častým způsobem, jakým se houbové nákazy šíří. Entomopatogenní houby mohou přetrvávat i v půdním prostředí, ale šíření konidií je omezenější, než šířením konidií na migrujících jedincích, kteří zemřou na jiném místě než v místě infekce (Meyling a Eilenberg, 2007). Bailey *et al.*, (2010) tvrdí, že k tomu, aby se konidie lépe šířily, dokáží některé entomopatogenní houby ovlivnit chování hostitele tak, aby uhynul v exponované pozici, mimo jiné houby dokáží uvolňovat své spory v určité denní dobu, která je nejpříznivější pro napadení potenciálního hostitele.

### **2.3.2. Faktory ovlivňující vývoj nákaz entomopatogenních hub**

Za příznivých podmínek prostředí, zejména vlhkostních, se přirozené epizootie vyskytují nejčastěji. Také půdní struktura je mimo teploty a vlhkosti velice důležitá pro šíření infekce, zejména u půdních škůdců. Vyhubení populací mšic, larev dvoukřídleho hmyzu škodících na kořenech, housenky, populace trásněnek a koníků. Entomopatogenní houby jsou proto potenciálně důležitým a přirozeným faktorem v populacích škůdců (Coombs a Coombs, 2003). Houbový organismus může během 3 – 5 dnů prodělat ve skleníkových podmínkách

celý vývojový cyklus. Během vegetačního období v podmínkách mírného pásma prodělá houbový organismus během 7 - 21 dnů vývoj od klíčení po sporulaci (Hall, 1981).

#### Vnější vlivy ovlivňující vývoj a účinek entomopatogenních hub

Jak bylo již výše zmíněno, působení a průběh infekcí entomopatogenních organismů ovlivňuje nejvíce teplota, vlhkost a sluneční záření. Drummond *et al.*, (1987); Tanada a Kaya (1993); Inglis *et al.*, (2001) dodávají, že uvedené faktory působí na klíčení konidií, průnik invazní hyfy přes kutikulu do hostitele, proliferaci na povrch hostitele a následné šíření hub v prostředí. Entomopatogenní organismy zesynchronizují svůj životní cyklus podle vývojových stádií a podmínek prostředí (Shah a Pell, 2003). Většinou druhů entomopatogenních hub vyhovuje teplota v rozmezí 20 - 25°C. Ovšem infekce a onemocnění může proběhnout i při teplotě 15 – 30°C, ale při teplotě nad 30°C mycelium může zpomalit svůj růst a při teplotě nad 37°C může dojít až k celkovému zastavení růstu (Inglis *et al.*, 2001).

Dalším důležitým faktorem nezbytným pro klíčení konidií hub je dostatečná vlhkost nad 90 %, při této vlhkosti rostou konidie a dochází k rozvoji nákazy v populaci škůdce (Hall, 1981). Odolnost a přežívání hub je též závislé na vlhkostních podmínkách (Drummond *et al.*, 1987). Záměrně lze ovlivnit vývoj houbových organismů a to přidáním olejových substancí do kapalného prostředí konidií. Olej umožní lepší přilnavost k tělu hostitele a tím vytvoří pro konidie příznivé podmínky a omezí jejich rychlé odumírání (Butt, 2002). Významným vlivem pro přežívání konidií a jejich uvolňování je sluneční záření. Zejména ultrafialové záření může poškodit houbové organismy, toto záření je ale škodlivější než viditelné infračervené záření (Fargues *et al.*, 1997). Odolnost entomopatogenních hub je závislá na množství pigmentu, protože pigmentované konidie jsou odolnější vůči záření než konidie s menším obsahem pigmentu (Ingoffo, 1992).

### **2.3.3. Nejvýznamnější zástupci entomopatogenních hub**

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

Roku 1878 byl poprvé popsán druh *Metarhizium anisopliae*, popsal jej Metschnikov, který tento druh objevil na vrubounovitém broukovi z čeledi *Scarabeidae Anisopliae austriaca* (listopas pšeničný). V Rusku se roku 1878 provedla studie této houby za účelem kontroly larev brouků na cukrové řepě (Bischoff *et al.*, 2009). Do systému tento druh

organismu zařadil o rok později Sorokin. V současné době je druh *M. anisopliae* brán jako polyfyletický druh. Kmeny jsou členěny do 4 poddruhů: *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *majus*, *M. anisopliae* var. *lepidiotum*, *M. anisopliae* var. *acridum* (Driver *et al.*, 2000). Organismus způsobuje nákazy u více než 200 druhů a řádů hmyzu, zejména u *Orthoptera*, *Hemiptera*, *Coleoptera*, *Diptera*, *Lepidoptera* a *Hymenoptera*. *M. anisopliae* je přirozenou součástí půdní mykoflóry (Inglis *et al.*, 2001). Toto tvrzení podporuje i Bruck 2005, který píše, že tento houbový organismus se běžně vyskytuje v zemědělských i nezemědělských půdách a lesních ekosystémech mírného pásma. Studie prokázaly, že rod *Metarhizium* žije v asociaci s rhizosférou na kořenech rostlin, navíc v jejich blízkosti přežívají lépe, než když se vyskytují jen volně v půdě. Houby rodu *Metarhizium* se používají jako bioagens hmyzu zejména ve Spojených státech amerických, Brazílii, Austrálii a Filipínách (Bischoff *et al.*, 2009).

Houbový organismus *M. anisopliae* produkuje dva typy spor, vzdušné dlouhé tyčinkovité konidie, které vytvářejí kompaktní sloupce řetízků (Humber, 1997). Phialidy jsou krátké sporogenní hyfy, které jsou během saprofytické fáze označovány jako asexuální spory. Druhým typem spor jsou blastospory, které jsou produkovány v hmyzí hemolymfě (Leland, 2001). Stadium teleomorfy nebylo doposud u rodu *Metarhizium* objeveno (Driver *et al.*, 2000). Ovšem Kalina a Váňa (2005) uvádějí, že velké množství druhů se díky moderním metodám přearžuje do taxonomie pravých hub (teleomorfní „pohlavní“ stádium), přičemž tyto druhy byly zařazeny do pomocného oddělení *Deuteromycotina*. Houbový organismus *M. anisopliae* vyvolá nákazu u náchylného jedince přímým průnikem přes jeho kutikulu. Již několik dní po smrti hostitele jsou patrné příznaky napadení. Zpočátku je zřetelné bílé mycelium, které se postupně zbarvuje v závislosti na stupni sporulace do zeleného odstínu (Weiser, 1966). Infikovaný jedinec houbou *M. anisopliae* porůstá hustým, tmavě zeleným myceliem, nákazy jsou proto označovány jako „zelená muskardina“ (Hajek, 2004).

Konidiofory houby jsou větvené a tvoří útvary, které jsou podobné četným mnohoramenným svícňům. Hydrofobní vlastnosti a ochranu konidií v přirozeném prostředí poskytuje monoamin zvaný hydrophobins, který mají konidie na svém povrchu. Kombinace biochemických (enzymy) a fyzikálně mechanických vlastností (mechanický tlak penetrující hyfy) zajišťuje *M. anisopliae* penetraci do hmyzí kutikuly (Wang *et al.*, 2002). Optimální teplota pro životní cyklus většiny kmenů je 25°C, ovšem optimum může být pro jednotlivé kmeny rozdílné (Bailey, 2010). Baileyho tvrzení doplňují Boucias a Pendland

(1998) kteří píší, že některé kmeny hub rostou při teplotách pod 12° C, jiné při teplotách nad 35° C.

Variety entomopatogenních hub *M. anisopliae* var. *anisopliae* a *M. anisopliae* var. *majus*, produkují toxický sekundární metabolit zvaný destruxin. Tento metabolit byl poprvé izolován z entomopatogenní houby *Oospora destruktor*, název se zachoval do dnes (Pedras *et al.*, 2002). Destruxin je látka s insekticidními a fyto toxickými účinky, zároveň je destruxin urychluje smrt napadeného jedince, proto je důležitou podporou virulence (Hu *et al.*, 2006).

Jinými sekundárními metabolity, které byly izolovány z tohoto houbového organismu jsou swainsonin a cytochalasin. Obě tyto látky mají medicínsky významnou roli, zejména v oboru onkologie (Zimmermann, 2007). Metody, které se používají pro izolaci *M. anisopliae* jsou dvě a to metoda využívající selektivní média a metoda využívající živé návnady. Pro tento účel slouží například larvy květilék rodu *Delia*, potemníka moučného (*Tenebrio molitor*) a zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) (Klingen *et al.*, 2001; Zimmermann, 2007). Monitoring přirozeného výskytu *M. anisopliae* v různých typech půd, oblastech či zemích provádí metodou návnady (Vänninen, 1995; Klingen *et al.*, 2001; Zimmermann, 2007).

Konidie houby *M. anisopliae* slouží k výrobě biopreparátů. V *in vitro* systémech povrchových kultivací na tekutých živných půdách či na přirozených substrátech je prováděna produkce konidií (Landa, 2002). Landa (1998) doplnil, že se jedná o neekonomičtější způsob výroby. Jako substrát zajišťující živiny jsou vhodné ječné kroupy, vločky, rýže, proso, kukuřice nebo pšeničné otruby (Goettel a Inglis, 1997). Při prvních pokusech byly jako substrát využívány i pивní mláto, nakrájené sterilizované brambory, mrkev, cukrovka, řepa a naklíčená kukuřice či rozdrcené zrno kukuřice (Weiser, 1966). Důležitým pilířem výroby preparátu je zajištění dobře udržovaného kmene houby, přičemž matečné kultury musí být čistě a dokonale uchovávané, aby nedošlo k poklesu životaschopnosti a virulence konidií (Jackson *et al.*, 2010).

Na etiketách biopreparátů jdou uvedené podmínky, které musí výsledný preparát splňovat. Největší význam nese parametr CFU „Colony Forming Units“ (počet jednotek tvořících kolonie) v 1 gramu produktu. Jinými sledovanými parametry v kontrolních laboratořích jsou garance druhu/kmenu, životaschopnost konidií, virulence kmene, obsah vlhkosti biopreparátu a velikost částic formulace (Jenkins a Goettel, 1997).



## *Beauveria bassiana*

Tyto entomopatogenní organismy se vyskytují v půdě, kde zaujímají roli cizopasníku půdního hmyzu a to převážně na přezimujících stádiích. Do spektra hostitelů se řadí zástupci z řádu rovnokřídých (krtonožky), brouků (larvy a kukly chroustů, mandelinky bramborové), dvoukřídých, larvy a kukly motýlů (Humber, 1997). Roku 1834 byl tento druh houby objeven Agostinem Bassim. Vega a Posada (2005) doplňují, že rod *Beauveria* hrál významnou roli při devastování populací bource morušového (*Bombyx mori*) v Evropě v 18. A 19. století, což bylo impulzem pro vznik studia hmyzí patologie. Tento druh organismu se vyskytuje přirozeně na některých rostlinách a v půdě (Aleshina, 1980). Nákaze způsobené houbou *Beauveria bassiana* se přezdívá „bílá muskardina“ protože infikovaného jedince prorůstá bílým myceliem (Weiser, 1966). Nažloutlé až načervenalé kolonie s bezbarvou až narůžovělou spodní stranou jsou typickými znaky pro organismus *B. bassiana*. Celá řada faktorů působí na infekci a klíčení například teplotní optimum a vlhkost, stádium a vnímavost hostitele ale i kutikulární lipidy (Zimmermann, 2007). Přes místa s méně sklerotizovanou pokožkou proniká houba do těla hostitele, přičemž v místě kontaktu dochází k vývoji houby. Spora v místě doteku nabobtná a vyklíčí, klíček proniká do těla hostitele.

Dalšími místy pro průnik infekce je ústní otvor a střevo, stigmata hmyzu a pohlavní orgány. *B. bassiana* produkuje nejméně dva enzymy, které jsou nezbytné pro vývoj nákazy. Nejdříve produkuje po proniknutí do těla hostitele druhotný metabolit beauvericin, který oslabuje imunitní systém hostitele. Následně po smrti hostitele produkuje houba antibiotikum (oosporein), který konkuruje střevním bakteriím (Weiser, 1966). Preparát na bázi *B. bassiana* je nejčastěji aplikován formou postřiku konidiovou suspenzí. Účinky tohoto organismu byly zkoumány v laboratorních i polních podmínkách na různých druzích škůdců jako jsou třísněnky, molice a mšice (Legaspi *et al.*, 2000). Watson *et al.*, 1995 doplňují, že testování tohoto druhu houby bylo úspěšně prováděno i na zástupcích řádu *Diptera* (*Muscidae*) což určuje potenciál k využití v biologické ochraně proti mouchám. Navíc je tento druh organismu neškodý pro necílové organismy (Goettel *et al.*, 1990). Biopreparát na bázi *B. bassiana* je využíván v boji proti lýkožroutu smrkovému (*Ips typographus*). Uvedený způsob ochrany je využíván zejména v Německu, Švýcarsku a Rakousku. Ovšem s tímto preparátem experimentuje i Česká republika, v roce 2007 byl tento houbový organismus použit ve vybraných lokalitách NP Šumava (Landa *et al.*, 2007b).

## 2.4. Mykoparazitické houby

Mykoparazitické organismy vyvolávají různé nákazy u fytopatogenních hub, které jsou původci různých infekcí rostlin a jsou jejich přirozenými nepřáteli. Pouze v těsné asociaci hostitele a mykoparazita projeví svou aktivitu, na větší vzdálenost aktivní nejsou (Okrouhlá, 1993). Roku 1800 byly tyto organismy popsány mykology, kteří studovali choroby rostlin (Veselá, 1986). V současnosti je popsáno zhruba 1000 - 2000 druhů mykoparazitických hub, které parazitují na 2500 jiných druhů hub (Prokinová, 1996). Zájem o prostudování problematiky vztahů mikroorganismů a patogenů začal poměrně nedávno, ačkoli tyto vztahy byly známy již ve třicátých letech. Zájem o tuto problematiku nastal až v posledních letech, důvodem bylo neuvážené používání chemických pesticidů. V sedmdesátých letech propukl „boom“ biologické ochrany (Nesrsta, 1991). Přesto, že existuje celá řada houbových organismů, houby rodu *Trichoderma* nepochybně zaujímají dominantní postavení mezi prostředky biologické ochrany rostlin. Důvodem je fakt, že houby rodu *Trichoderma* mají nepřeberné spektrum hostitelů, které i snadno kolonizují.

Důvodem používání mykoparazitických hub jako bioagens, je ten, že narozdíl od půdních bakterií, mají mnohem větší schopnost šířit se v půdě a v rhizosféře, což je umožněno aktivním růstem hyf (Whipps a Lumsden, 2001). Pro růst a vývoj rostlin mají některé druhy mykoparazitických hub pozitivní účinky. Tyto organismy lze kategorizovat na parazity napadající půdní patogeny, zvláště druhy rodu *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* a na parazity hub infikující patogeny na nadzemních částech rostlin, například *Ampelomyces quisqualis*, který je původcem padlí rostlin (Sejketov, 1982).

### 2.4.1. Vývojový cyklus mykoparazitických hub

Podle mechanismu účinku se mykoparazitické houby dělí na biotrofní a nekrotrofní (destruktivní) mykoparazity. Na živých buňkách parazitují biotrofní mykoparazité, narozdíl od nekrotrofních mykoparazitů, kteří buňky hostitele napřed usmrtí. Průběh infekce nekrotrofního mykoparazita se může projevovat buď přímou penetrací do hostitele či omotáváním infekčního mycelia kolem jeho hyf (Woods, 1974). Hostitel se někdy může bránit pronikání invazní hyfy parazita či haustoria vytvářením přepážek ve svém myceliu (např. u druhů rodu *Pythium*). Hostitel se tímto pokouší oddělit již napadené části mycelia od nenapadených (Ambrožová, 2004). Ve vodě klíčí mnohé spory mykoparazitických hub, zatímco některé druhy k vyklíčení potřebují přítomnost specifických látek, které produkuje hostitel nebo tyto látky uměle přidané (Verma a Brar, 2007).

Antagonistický vztah houba – patogen je podstatou mechanismu působení těchto hub. Dle principu mechanismu mezidruhové interakce se antagonistické projevy dělí na uvedené skupiny:

Kompetice – příkladem tohoto vztahu je působení *Pseudomonas patida* vůči *Pythium ultimum* (původce padání rostlin). Principem je antagonismus projevující se „soutěží“ o živiny a prostor. Introdukovaný organismus rychle kolonizuje prostředí, je vitální, rychle roste a nedovolí patogenu se přemnožit.

Antibioza – houby rodu *Trichoderma* jsou nejznámějšími představiteli tohoto konkurenčního vztahu.

Konkurenční vztah mezi dvěma organismy nebo mezi jedním organismem a metabolickým produktem jiného organismu ke škodě jednoho z těchto organismů.

Hyperparazitismus – představitelé tohoto vztahu jsou houbové organismy *Pythium oligandrum*, *Ampelomyces*, *Conyothyrium minitans* a rod *Trichoderma*. Vztah, kde je jeden organismus (mykoparazit) potravně vázán na jiný živý organismus (hostitel), ze kterého čerpá významnou část živin a energie k zajištění své existence (Landa, 2004).

#### **2.4.2. Nejvýznamnější zástupci mykoparazitických hub**

##### *Trichoderma virens*

Synonymem pro název této mykoparazitické houby je *Gliocladium virens*. Jedná se o mykoparazita, který byl izolován ze sklerocií fytopatogena *Sclerotinia minor* v Beltsville ve Spojených státech amerických (Hebbar a Lumsden, 1999). *Trichoderma virens* byla jako jedna z prvních mykoparazitických hub použita jako bioagens v biologické ochraně rostlin. Houba tlumí růst různých fytopatogenních organismů, včetně rodu *Pythium*, *Rhizoctonia solani* a *Sclerotium rolfsii*. Pohlavní forma tohoto organismu není známá, množí se pouze nepohlavní formou (Váňa, 1996). Přítomnost této saprotrofní a mykoparazitické houby v půdě, zvyšuje její přirozenou supresivitu. *T. virens* je běžnou součástí půdní mikroflory všech typů půd, zejména těch, které jsou bohaté na organické látky. Tento houbový organismus parazituje na fytopatogenních organismech, které jsou příčinou padání klíčících rostlin. Významnými hostiteli této skupiny patří *Fusarium* spp., *Sclerotinia* spp., *Verticillium* spp., *Botrytis* spp. (Dennis a Webster 1971; Howell *et al.*, 2000, Howell 2002). Mycelium houby *T.virens* je vláknitého charakteru, hyfy jsou četně větvené, přehrádkované z větší míry tvořeno jednojadernými buňkami. V horní části se větví septické

konidiofory, jenž se vytvářejí na myceliu. Kulovité, jednobuněčné konidie se vytvářejí na konci konidioforů a to v hyalinních či jasně zbarvených masách. Konidie se tvoří postupně za sebou ve vrcholové části a všechny drží pohromadě, což jim zajišťují mucilaginózní kapénky sekretu. Bílé vatovité mycelium, které *T. virens* vytváří se později mění v zelenou barvu. Stupeň sporulace kultury přímo koreluje se zbarvením mycelia, přičemž tmavě zelené zbarvení mají plně sporulující kultury (Váňa, 1996). Produkci svých antibiotických metabolitů gliovirinu a gliotoxinu působí *T. virens* na své potenciální hostitele (Howell *et al.*, 1993; Howell a Puckhaber 2005; Hanson a Howell, 2004), tyto metabolity mají antibakteriální a fungistatické účinky (Samuels a Rehner, 1993).

Spory kmenu GL 21 izolované z *T. virens* tvoří aktivní složku biopreparátu SOILGARD™ 12% G, který je registrován ve Spojených státech amerických (Wilhite *et al.*, 1994).

#### *Coniothyrium minitans*

Roku 1947, Campbell ve spojených státech amerických jako první izoloval tuto mykoparazitickou houbu ze sklerocií fytopatogenní houby *Sclerotinia sclerotiorum*. Poté byl tento organismus izolován z půdních sklerocií ze všech kontinentů vyjma Antarktidy (Bennett *et al.*, 2006; Sandys-Winsch *et al.*, 1993.; Whipps a Gerlagh, 1992). Proti chorobám způsobeným patogenem *S. sclerotiorum* vykazuje velký potenciál využití tohoto mykoparazitického organismu jako bioagens v ochraně rostlin (Yang *et al.* 2007). Mykoparazitický organismus *C. minitans* je schopen infikovat také další druhy fytopatogenních hub jako *Sclerotinia trifolium*, *S. minor* a *S. cepivorum*, nicméně není schopna napadat sklerocia hub patřících do oddělení *Basidiomycota* (Chitrampalam *et al.*, 2010; Whipps a Gerlagh 1992). Ovšem Gerlagh *et al.*, (1996) prokázal, že mykoparazit *C. minitans* je schopen napadat i sklerocia houby *Botrytis cinerea*. McQuilken a Whipps (1995) ve své studii uvádí, že organismus *C. minitans* dokáže v půdě přežít více než rok po její aplikaci. V případě, že je půda vysoce kolonizována sklerocií patogena *S. sclerotiorum* je houba *C. minitans* schopna v půdě přežívat po dobu delší než dva roky. Bennett *et al.*, (2006) doplnil, že napadená sklerocia mají funkci přirozeného rezervoáru houby *C. minitans*. Prostřednictvím druhotných kolonizátorů mohou být pykno-spory z degradovaných sklerocií roznášeny do okolí. Houbový organismus se v půdě může šířit prostřednictvím růstu svého mycelia (Jones a Stewart, 2000). Po napadení hostitele houbou *C. minitans* se nejprve tvoří chomáčkovitě, slabé mycelium, které se díky počátku tvorby pyknid stává koncentrovanějším

a granulovitějším. Kultura *C. minitans* je z počátku světle žluté barvy a poté přechází přes světle hnědou až do olivové barvy. Vysporulovaná kultura získává tmavě hnědou až černou barvu (Jones a Stewart, 2000; Bohatá *et al.*, 2006). Během zimy, kdy teplota klesá pod 0°C je mykoparazit *C. minitans* schopen přežití (Huang a Erickson, 2002). Pravděpodobnost, že houba přežije v laboratorních podmínkách na přirozeném médiu je větší při teplotě 5 a 15°C než při 30°C (McQuilken a Whipps, 1995). Bennett *et al.*, (2006) dodávají, že větší část konidií vyloučených z pyknid *C. minitans* ztrácí v suchých podmínkách životnost po 10 měsících.

Houbový organismus *C. minitans* proniká do sklerocií buď přímo přes úroveň pigmentu, či nepřímo v místě kde je sklerocium poškozeno.

Poté organismus proniká do nepigmentované kůry a dřevě sklerocia. Pomocí mechanického tlaku penetračního hrotu a lytických enzymů penetruje houba do hostitele. Po úplné kolonizaci hostitele patogenem dochází k celkové degradaci sklerocia. Vůči působení mykoparazitické houby se vnější pigmentová vrstva chová houževnatěji, proto si degradované sklerocium zachovává tvar. Pyknospory se nacházejí uvnitř degradovaného mycelia (Bennett *et al.*, 2006).

### *Pythium oligandrum*

Druh *Pythium oligandrum* je významným zástupcem řádu *Oomycetes* (Brožová, 2004). Tento agresivní organismus parazituje na široké škále půdních patogenů. Hostitelské spektrum *P. oligandrum* je zaměřeno zejména na druhy fytopatogenních hub, které parazitují na semenech a semenáčcích (Lewis *et al.*, 1989). Houbový organismus *P. oligandrum* přežívá v půdě jako saprofyt, zároveň částečně parazituje na ostatních druzích rodu *Pythium* (*P. ultimum*, *P. debaryanum* aj.) (Rod *et al.*, 2005). Pomocí zoospor či sporangií, které vyrůstají na sporangioforech dochází k nepohlavnímu rozmnožování (Zvára a Táborský, 1985). Při teplotě 18 - 20°C dochází k tvorbě zoospor. Oospora vzniká je výsledkem splynutí samčího útvaru anteridia a samičího útvaru oogonia při pohlavním rozmnožování (Cliquet a Tirilly, 2002). Druh *P. oligandrum* se přednostně vyskytuje na povrchu radixu v oblasti mezi hypokotylem a kořenovou špičkou ve společenství s rostlinnými patogeny (Martin *et al.*, 1999). Antagonismus houby *P. oligandrum* s jinými fytopatogeny, který je zprostředkovaný jedním antimikrobiálním metabolitem, není jednoduchý proces. Nasvědčují tomu rozdílné interakce. Určitý cílový druh ovlivňuje antagonismus jakožto mnohostranný proces, což je patrné z rozsahu ultrastrukturálních

a cytochemických změn. *P. oligandrum* znásobuje svůj růst na hyfách rostlinných patogenů a kolonizuje živný substrát. Pokud je mykoparazit přenesen do čerstvého substrátu, pokračuje jeho mycelium v růstu, zatímco hyfy fytopatogennů stagnují v růstu (Benhamou *et al.*, 1999). Přímá parazitace organismu *P. oligandrum* je hlavní podstatou účinku této houby. Omezený vývoj mycelia fytopatogenních hub způsobuje ovíjení hyf *P. oligandrum*.

Mykoparazit kolonizuje ekosystém rhizosféry a rozvíjí zde své mycelium, ještě před tím, než dojde k infekci fytopatogeny. Indukce obranných mechanismů ošetřených plodin je následkem přítomnosti tohoto mykoparazitického organismu. Rostlina spustí své obranné mechanismy ještě dříve, než dojde k samotnému napadení rostliny patogenem, v případě, že je ošetřena preparátem obsahujícím spory *P. oligandrum* (Rod *et al.*, 2005). Biopreparát na bázi *P. oligandrum*, Polyversum je od roku 1992 registrován v ČR. Preparát obsahuje oospory mykoparazitického organismu *P. oligandrum* v poměru 1 x 10<sup>6</sup> spor v 1g. Biopreparát má celkem široké spektrum uplatnění, jak v zemědělství, tak v zahradničení (Kopřiva, 1997). Brožová (2002) doplňuje, že aplikace biopreparátu na bázi tohoto mykoparazita je spíše preventivního než kurativního charakteru.

## **2.5. Adheziva používaná v biologickém moření osiva**

Pazdera (2004) uvádí, že jako adheziva (pojidla) v biologickém moření osiva slouží například arabská guma, želatina, methylcelulóza nebo polyvinylalkohol. Při aplikaci spor na osivo se doporučuje osivo nejprve zvlhčit vodou s přídavkem adheziva (lepidla) na bázi polyvinylacetátu poté zaprášit preparátem a promíchat. Pro tento způsob moření je vhodné použít mořičku s dávkovačem práškových přídavků. Preparát je také možné rozmíchat v daném množství vody s adhezivem a posléze aplikovat na osivo, tato možnost je určena pro případ, že mořicí zařízení není k tomuto účelu uzpůsobené. Aplikace přípravku prostřednictvím mořičky udrží více životaschopných spor. Obvyklá dávka je 400 g preparátu na 100 kg osiva (Ondráčková, 2014).

Ve vodě rozpustné polymery slouží jako zhušťovadla, které vykazují ve vodném prostředí pseudoplastické vlastnosti. Příkladem je guma karaya, arabská guma, tragant, guarová guma, guma karob, xantanová guma, karagenan, alginátová sůl, kasein, dextran, pektin, agar, 2- aminoethyl celulóza, 2-hydroxyethyl celulóza, methylcelulóza, karboxymethylcelulóza, solný sulfát celulózy. Zhušťovadlo může být přidáváno jako pojivová formulace, například v koncentraci od 1 do 25 % hmotnosti semene (Hendrix a Turnbull, 2014).

Defang a Yafei (2009) uvádějí podstatu své studie, která spočívá v používání bezpečnějších, levnějších a k životnímu prostředí šetrnějších adheziv, které jsou na bázi polymerů. Pomocí chitosanu jako hlavní suroviny s modifikovaným hydroxidem sodným, jsou tyto složky sloučeny s regulátory růstu či jinými přísadami. Jako vhodné adhezivum pro biologické moření osiva rajčete (*Lycopersicon esculentum*) byla vyzkoušena arabská guma spolu s kaolinem jako nosičem spor *Verticillium chlamydosporium*. Mořené osivo rajčat bylo po 12 měsících skladování ve vhodných podmínkách zaseto ve sklenicích. Závěr studie dokázal, že mořené osivo sporami *V. chlamydosporium* napomáhá regulaci populace karanténního háďátka *Meloidogyne javanica*. První generace vajíček háďátek byla infikována z 37 – 82 % touto nematofágní houbou (Stirling *et al.*, 1999).

Guarová guma, jakožto pojivo na gelové bázi, byla úspěšně použita v experimentu s tkáňovými kultivačními médii. Vhodnost pojiva byla testována na semenech lnu setého (*Linum usitatissimum*) a brukve sítinovité (*Brassica juncea*). Předmětem hodnocení bylo zjištění úrovně množení axilárních výhonků, rhizogenů a embryonální odezvy. Tyto parametry dosáhly podstatně lepších výsledků než osivo kultivované pouze na agaru (Babbar *et al.*, 2005).

Elzein *et al.*, (2006) popisují studii, ve které bylo namořeno osivo čiroku (*Sorghum*) sporami *Fusarium oxysporum* (Foxy2) za účelem regulace plevelů druhu *Striga* parazitujících na kořenech čiroku. Jako testovaná adheziva byla použita arabská guma (10%, 20% a 40%), karboxymethylcelulóza (1% a 2%) a pektin. Výsledky studie prokázaly, že osivo čiroku mořené *F. oxysporum*, za použití uvedených adheziv, mělo i po více jak 8 měsících skladování vynikající vitalitu. Navíc, osivo namořené 40 % arabskou gumou v kombinaci s vysušenými chlamydosporami prokázalo největší schopnost kolonizovat všechny kořeny, včetně vláscitých kořínků hostitele (čiroku).

### **Vybraná adheziva**

Využití některých níže zmíněných adheziv použitých pro biologické ošetření osiva je již patentováno.

**Xantanová guma (E415)** – látka přírodního původu, polysacharid, který je produktem specifické bakterie *Xanthomonas campestris* (Anonym1). Tato látka má hydrokoloidní vlastnosti, proto na sebe dobře váže vodu, čehož se využívá především při náhradě lepku (Anonym2).

**Guarová guma (E412)** – galaktomannan, vyskytující se v semenech rostliny druhu *Cyamopsis tetragonolobus*, která se pěstuje především v Indii.

Jedná se o rozemletý endosperm semen této rostliny, guarová guma je získána po loupání a mletí těchto semen (Anonym3). V Evropě je guarová guma v potravinářském průmyslu využívána jako přídatná látka. Nutriční hodnoty guarové gumy: energie 794 kJ, 190 kcal; tuky: 0,9g – z toho nasycené 0,8g; sacharidy: 0,7g – z toho cukr 0,1g; bílkoviny: 5,0 g; sůl: 0,03g; vláknina: 82g; vlhkost 3,5g (Anonym4).

Karboxymethylcelulóza (CMC) (E466) – derivát celulózy s karboxymethylovými skupinami navázanými na některé z hydroxylových skupin glukopyranózových monomerů, které tvoří kostru polymeru. CMC se používá v potravinářství ke změně viskozity (k zahušťování) a ke stabilizaci emulzí v řadě výrobků (Baker, 2011).

**Arabská guma (E414)** - pryskyřice, získávaná z mízy některých druhů akácií (akácie senegalská *Acacia senegal* a akácie arabská *Acacia seyal*), které rostou v Severní Africe. Jedná se o dobře stravitelnou směs sacharidů a glykoproteinů, která se používá v potravinářství jako stabilizátor (Anonym5).

**Polyvinylacetát (PVAC)** – syntetický polymer. Připravuje se polymerací vinylacetátu (VAM). Částečnou nebo úplnou hydrolýzou polymeru se připravuje polyvinylalkohol.

**Polyvinylalkohol (PVA)** – syntetický polymer, který je rozpustný ve vodě. Tento polymer se vyrábí alkalickou hydrolýzou polyvinylacetátu např. v methanolu (Fikr a Kahovec, 2008).

## 2.6. Biologické moření osiva

Osivo ovlivňuje výnos tržního produktu, má tudíž vliv na založení optimálního porostu určité plodiny a ovlivňuje výkonnost porostu, proto je osivo významným intenzifikačním faktorem (TeKrony a Egli, 1991). Evropská komise zakázala od 1. 12. 2013, po více než deseti letech používání neonikotinoidních mořidel s účinnou látkou klothianidin, imidakloprid a thiamethoxan (Hnízdil, 2015). Již dříve před ustanovením evropské komise píše Warren a Bennett (2000), že snahou o snížení nadměrného používání syntetických chemických přípravků, které mají negativní vliv na životní prostředí, dochází k rozvoji biologických úprav osiv. Využívání hub či bakterií na místo mořidel na chemické bázi slouží k regulaci půdních patogenů a patogenů přenosných osivem. Používané bioagens jsou schopny v půdě přetrvávat po celé vegetační období a ne jen v době vzcházení klíčících rostlin, na rozdíl od chemických přípravků. Širokospektré pesticidy nejsou na rozdíl



od biologických úprav nešetří k půdnímu ekosystému a nedokáže působit pouze proti jednomu konkrétnímu patogenu v porovnání s bioagens, které jsou druhově specifické.

Proces moření osiva je chemický, biologický, mechanický, fyzikální a nebo proces utvořen kombinací těchto způsobů, který zmírňuje škodlivé působení vnějších nebo vnitřních vlivů a podporující klíčivost, následně tvorbu zdravé rostliny se zvýšeným produkčním potenciálem (Khazanda *et al.*, 2002). Procházka *et al.*, (2015) dodávají, že ošetření biologicky aktivními látkami se provádí pro podporu zdravotního stavu a vitality osiva. Moření osiva podporuje rychlejší a uniformní vzcházení rostlin i v nepříznivých půdních podmínkách (Callan *et al.*, 1990).

Hnilička (2006) píše, že pokud jsou semena obalována tenkou vrstvou polymeru s účinnými látkami, jedná se o inkrustaci, snahou je aplikovat vždy ekologicky vhodné látky. Taylor *et al.*, (1991) dodávají, že při inkrustaci nedochází k výrazné změně tvaru semene. Používaný materiál pro inkrustaci je kombinace polymeru a aditiva (např. mikroprvky, insekticid, fungicid) a barviva. Místo fungicidů se může přidávat mykoparazitická houba *Trichoderma harzianum* a ostatní druhy bioagens. Roztok polymeru s rozpuštěným aditivem je na semeno aplikován nástřikem či ponořením semene do roztoku. Po aplikaci polymeru dojde k okamžitému vysušení semene. Inkrustací se na povrchu semene vytváří několikanásobný film, tento proces může být opakován s různými aditivami.

Při biologické úpravě je nutné zachování sterilních podmínek jako prevence před kontaminací semen nežádoucími mikroorganismy. U konvenční úpravy osiv nejsou z tohoto hlediska podmínky tak přísné. Bioagens použité pro aplikaci na semena je obvykle připraveno ve formě mikrogranulí, vázané na konkrétní nosič. Jako nosič může být použit například kaolín nebo vermikulit. Směs bioagens, živin a pojidla, která se na semeno nanáší je nanášena formou inkrustace. Bioprímingem je nazýván proces moření osiva, ve kterém jsou použity bioagens spolu s konkrétním nosičem (primerem), tento proces potlačuje mnoho původců chorob vyskytujících se v půdním prostředí a původců infekce osiva (Callan *et al.*, 1990).

Proces bio – primingu:

předmáčení osiva na 12 hodin

smíchání bioagens (*Trichoderma harzianum*) s předmáčeným osivem (10 g/ 1 kg osiva)

nahromadit osivo

nahromaděné osivo pokryt vlhkými jutovými pytlí - udržení vysoké vlhkosti

inkubace osiva při vysoké vlhkosti 24 hodin při teplotě přibližně 25 – 32 °C

při vysoké vlhkosti prostředí vytvoří přilnuté bioagens ochrannou vrstvu kolem celého klíčícího semene zasít semena na klíčovla biologické moření osiva zajistí ochranu před infekcemi vyskytujícími se v půdě a napadajícími osivo, podporuje klíčení a růst klíčící rostliny (Reddy, 2012)

Biopríming osiva pomocí bakterií mnohonásobně zvyšuje množství antagonistů na mořených semenech čímž chrání rhizosféru před vniknutím patogenů (Callan *et al.*, 1990). Ovšem Mathre *et al.*, (1994) píší, že osivo namořené houbami má při teplotě půdy 10° C o něco vyšší vzcháživost než osivo namořené bakteriemi. Schopnost bioagens regulovat konkrétní patogen, množství jednotek bioagens na semeni, způsob aplikace a omezení přítomnosti patogenů v aplikačním procesu určuje efektivitu biologických úprav. Pokud množství jednotek bioagens zajistí adekvátní ochranu klíčícího semene, není nutný vysoký počet jednotek bioagens k regulaci patogenu (Nancy, 1997). Weller (1983) dodává, že úspěšní antagonisté kolonizují rhizosféru během klíčení. Shukla *et al.*, (2015) popisují studii, jejímž cílem bylo prozkoumat účinek potencionálně odolných izolátů kmenů entomopatogenní houby *Trichoderma harzianum* vůči nepříznivým abiotickým podmínkám způsobující stres u plodin. Pokus byl zaměřen na odolnost pšenice seté vůči stresu vyvolanému nepříznivým vlivem sucha. Testy byly zaměřeny na zjištění relativní vlhkosti zrna, osmotického potenciálu, transpirace, indexu stability membrány, osmotické regulace a chlorofylové fluorescence. Negativním faktorem, který ovlivňuje rostliny během působení stresových podmínek, je nahromadění toxického reaktivního kyslíku (ROS). Studie byla založena na hypotéze, že biologicky namořené osivo sníží následné poškození rostliny. Výsledky výzkumu potvrdily hypotézu, že biologicky ošetřené osivo pšenice kmeny houby *Trichoderma harzianum* prokazuje vyšší toleranci vůči suchu a má pozitivní vliv na sílu kořenového systému. Zvýší se tolerance rostliny vůči abiotickým stresům. Junges *et al.*, (2016) uvádí, že dle provedené studie, kterou popisuje, vykazovalo biologicky mořené osivo fazolu lepší růstové schopnosti díky namoření osiva sporamai hub a bakteriální buněčnou suspenzí.

Kombinace *Trichoderma spp.* a *Bacillus subtilis* podporuje růst klíčící rostliny fazolu i po té, co rostlina vyčerpá zásobní látky uložené v semenu. Toto tvrzení podporuje i Wharton (2014), který napsal, že prostřednictvím bioagens *Bacillus subtilis* a *Trichoderma harzianum* je dosaženo vyšší ochrany osiva před hnilobou a rozkladem způsobeným *Fusarium sambucinum*. Za optimálních podmínek ošetření pomocí *B. subtilis* snižuje výskyt hniloby

a rozpad semen v průměru o 66 – 84 % a ošetření pomocí *T. harzianum* v průměru o 70 – 81%.

## 2.7. Biopreparáty

Účinnost prostředků používaných v biologické ochraně závisí na biotických a abiotických podmínkách prostředí zároveň tyto prostředky působí pomaleji než chemické prostředky. Jedním z největších omezení zavedení biologických přípravků do praxe je nevyrovnanost v účinnosti těchto přípravků. V současné době se jedná o metodu čistě preventivní (Prokinová, 2015).

Pomocí *in vitro* produkčních systémů využívajících substráty a to nejčastěji semena různých druhů rostlin (rýže, proso, kukuřice, pšenice, ječmen) je vyprodukován největší počet biopreparátů. Produkce biopreparátů je technologie dvoufázová, v první fázi je vyprodukováno čisté, koncentrované inokulum, kterým je ve druhé fázi ošetřen substrát, který je sterilní či semisterilní. Po 2 – 3 týdnech kultivace je produkt připraven k finalizaci a ve výsledné formulaci je různě upravený (např. mletý) komplex „patogen - substrát“ (Grimm, 2001).

Výnosy se zvyšují použitím biopreparátů maximálně o 5 – 15 % a kromě toho není dosud známá přesná specifikace využití mnoha biopreparátů (Hýsek a Vach, 2014). Naproti tomu Abbas *et al.*, (2014) píše, že kombinace „biohnojiva“, jehož základem jsou hlízkaté bakterie, a bioagens dosáhne kumulativního účinku, což vede ke zvýšení výnosu o 25 % oproti kontrolnímu vzorku.

Okrouhlá (1993) dodává, že pouze preparát, který je dostupný veřejně má cenu pro praktické využití. Vypracování komplexních metodik a jejich následné propojení s technologií pěstování je cesta k účelnému využití, zvláště pak u jednotlivých druhů okrasných a dalších plodin.

### CONTANS<sup>®</sup> WG

Contans<sup>®</sup> WG je biologický fungicid, který obsahuje 100 g.kg<sup>-1</sup> aktivních spor *Coniothyrium minitans*. Houba je vysoce specializovaný mykoparazit, který v půdě napadá pouze sklerocia patogenů *Sclerotinia sclerotiorum* a *Sclerotinia minor*. Přípravek Contans<sup>®</sup> WG je určen pro dekontaminaci půdy od sklerocií, které zcela parazituje a degraduje (Toussaint, 2015).

Svoboda (2007) dodává, že přípravek je schopen zlikvidovat až 95 % sklerocií v půdním profilu do hloubky 10 cm během jedné vegetační sezóny. Spory *C. minitans* pronikají malými průduchy či trhlinami přes povrchovou vrstvu do vnitřních částí sklerocia, jehož buněčný obsah využívá prostřednictvím parazitace jako živný substrát a vytváří zde pyknidy a konidie. Následkem působení je totální destrukce celého sklerocia, které není již dále schopno infikovat kulturní rostliny. Po dobu 1 – 2 let přežívají pyknospory *C. minitans* na sklerociích.

## **SUPRESIVIT<sup>®</sup>**

Supresivit<sup>®</sup> je přípravek na bázi mykoparazitické houby *Trichoderma harzianum*, která kolonizuje svými vyklíčenými konidiami a následným myceliem povrch kořenů trav a indukuje vznik rezistence vůči rostlinným patogenům. Po celou dobu vegetace zůstává mycelium aktivní na kořenovém systému rostliny a svou schopností aktivní parazitace fytopatogenů zabraňuje jejich rozvoji. Komplexní působení houby má za následek vývoj zdravé a odolné rostliny vůči stresu (Straka, 2007). Nesrsta (2002) dodává, že základem komerčního preparátu SUPRESIVIT, je kmen houby *T. harzianum*, který nese označení SMTN/RH/Su. Kmen je účinný proti celé řadě fytopatogenních hub včetně *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia* spp., *Verticilium* spp. a dalším. Janauer (2007) doplňuje, že technologie použití tohoto přípravku používá máčení semen v suspenzi a vhodné je i provádět moření suchou cestou. Supresivit je možné používat jako preventivní opatření při přípravě substrátů, jeho zapravením do zeminy. Běžné dávkování činí 400 g přípravku na 1 ha, nejlépe v době před vypuknutím infekce (Straka, 2007). Komerční druhy produktů na bázi hub rodu *Trichoderma*, používané v zahraničí jsou Trichodex, RootShield a Binab TF WP.

## **2.8. Semenářské parametry**

V životním cyklu rostlin jsou klíčení a vzcházení kritickými etapami, přičemž nedostatečné vzcházení rostlin je zapříčiněno nevhodným založením porostu, zejména v období sucha. Možnostmi jak zvýšit a zlepšit uniformitu a rychlost klíčení je využití biologického moření osiva nebo další pokrok v rozvoji různých druhů inokul (Singh, 2015). Posklizňové úpravy jako jsou čištění a kalibrace, sjednocují fyzikální charakteristiky, které docilují uniformity výkonu semen u většiny plodin. Při využívání těchto úprav hraje zásadní roli znalost vitality osiva, mimo rutinně stanovovanou klíčivost, protože pouze vitální osivo je zárukou rychlého a uniformního klíčení a vzcházení. Použití kvalitního osiva k těmto

nestandardním úpravám je nutností (Pazdera, 2002). Gan, Stobbe a Moes (1992) doplňují, že vitalita osiva významně ovlivňuje průběh a intenzitu odnožování tj. počáteční růst a vývin. Problematika dlouhodobého skladování osiva souvisí s nízkou vitalitou semen a rychlým poklesem klíčivosti což utváří ekonomický problém. Neznalost objektivních metodik k vyjádření vitality těžko skladovatelných druhů plodin je příčinou mnoha problémů (Hosnedl a Honsová, 2004). Dormantní a neživá semena jsou z pohledu fyziologů příčinou snížené klíčivosti osiva.

Z biochemického hlediska se zpravidla jedná o nevyrovnanou bilanci látek podporující klíčené a látek klíčení potlačujících (Copeland a McDonald, 1995).

Laboratorní testy klíčivosti jsou cíleně vedeny za optimálních podmínek pro semena každého botanického druhu. Důvodem je stanovení absolutního počtu klíčivých semen ve vzorku, opakovatelnost a reprodukovatelnost (Hosnedl, 2003). Nelze opomenout ani technické podmínky při klíčení, přesnost definice vadných klíčků a zkušenosti pracovníka semenářské laboratoře (subjektivní vyhodnocování klíčících rostlin) (Gan, Stobbe a Moes, 1992). Základní dělení partií osiva dle kvality je dáno údaji o klíčivosti osiva, které je zásadním kritériem (Copeland a McDonald, 1995).

Zda je klíčící rostlina „normální“ (vykazuje-li potenciál pro další vývoj v požadovanou rostlinu) nebo anomální (nevykazuje-li potenciál pro vývoj v normální rostlinu) rozhoduje pracovník semenářské laboratoře.

Dobrá vysvětlitelnost, ucelenost, reprodukovatelnost, objektivita, nízká cena a rychlost jsou základními požadavky na test klíčivosti. V praxi test klíčivosti tyto podmínky nespĺňuje, neboť průběh testu vyžaduje přesnou regulaci teploty, kontrolu vlhkosti, občas světlo, vhodné substráty pro klíčení semen, vhodná zařízení pro odstranění dormance semen a způsobilé pracovníky (Pedersen, 1993).

### **Ošetřování semen obilovin pomocí plazmy**

V poslední době se začala pozornost vědců zaměřovat směrem k ošetření semen polních plodin pomocí plazmy. Cílem je deaktivace a ničení nebezpečných látek.

Plazma je indukovaná mikrovlnami a vybuzená elektromagnetickým zářením s rozsahem frekvencí 300 MHz až 10 GHz. Modifikace povrchu se využívá k ovlivnění vlastností semen při zasazování (smáčivost a rychlost klíčení). Pomocí studeného plazmového výboje Gliding Arc a vzduchového plazmatu je ošetřováno osivo, a toto ošetření vede k výraznému poklesu kontaktního úhlu kapky se semenem. Což znamená, že kapka je vstřebávána větším

povrchem semene, semeno je tedy lépe zavlažováno (Boromashenko, Grynyov, Boromashenko a Drori, 2012). Krmenčík a Kysilka, 2001 uvádějí, že podstatou ošetření osiva plazmatem je rozklad tří základních a vysoce rozšířených mykotoxinů, které kontaminují jídlo a krmivo. Jedná se o mykotoxiny Aflatoxin, který je produktem plísní rodu *Aspergillus*, Deoxynivalenol (Vomitoxin) a Zearalenon, který je produktem plísní *Fusarium*. Čtyři základní faktory plazmového výboje a jejich kombinace vedou k destrukci buněk bakterií. Faktory jsou ultrafialové záření, teplota, nabité a reaktivní částice. Tento proces je ovlivněn volbou pracovního plynu a rychlostí jeho průtoku (Laroussi a Leipold, 2004). Studií, kterou provedli Selcuk a Basaran (2008) byl prokázán vysoký potenciál využití plazmatu k degradaci mykotoxinů, který může být účinně zužitkován v ošetřování potravin a krmiv.

Pracovním plynem byl vzduch či fluorid sírový (SF<sub>6</sub>). Pro experiment bylo použito osivo několika druhů obilovin a luštěnin, například pšenice, ječmen, oves, čočka, žito, kukuřice a cizrna. Vědci se zaměřili zejména na destrukci patogenních hub rodu *Aspergillus* a *Penicillium*, nejčastější původce kažení skladovaných semen. Uvedené mykotoxiny snižují kvalitu semen tím, že snižují nutriční hodnoty a vytváří zabarvení a úporné zápachy. Výsledek ošetření osiva závisí nejen na pracovním plynu a době ošetřování, ale také na druhu a morfologii semen. Použití fluoridu sírového jako pracovního plynu při době ošetřování 15 minut, bylo dosaženo nejlepších výsledků, přičemž bylo dosaženo snížení obsahu plísní o 3log. V celkové míře došlo ke snížení obsahu plísní pod 1 % od počátečního stavu v závislosti na kontaminaci.

### **3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Následující pasáž „CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE“ o rozsahu 1 strany je vypuštěna z důvodu podávání patentové přihlášky a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Zemědělské fakultě JU.

#### **4. MATERIÁL A METODIKA**

Následující pasáž „MATERIÁL A METODIKA“ o rozsahu 11 stran je vypuštěna z důvodu podávání patentové přihlášky a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Zemědělské fakultě JU.



## **5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY**

Následující pasáž „EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY“ o rozsahu 50 stran je vypuštěna z důvodu podávání patentové přihlášky a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Zemědělské fakultě JU.

## **6. DISKUSE**

Následující pasáž „DISKUSE“ o rozsahu 7 stran je vypuštěna z důvodu podávání patentové přihlášky a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Zemědělské fakultě JU.

## **7. ZÁVĚR**

Následující pasáž „ZÁVĚR“ o rozsahu 3 stran je vypuštěna z důvodu podávání patentové přihlášky a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Zemědělské fakultě JU.

## 8. SEZNAM LITERATURY

- ABBAS, M. T. Original Article: Bio-preparates support the productivity of potato plants grown under desert farming conditions of north Sinai. *Journal of Advanced Research* [online]. 2014, 5(1), 41-48 [cit. 2016-03-14]. DOI: 10.1016/j.jare.2012.11.004. ISSN 20901232. Dostupné z: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).
- ACEVES, A., A. Rebolledo a L. Gutierrez. *Trichoderma* species in soils cultivated with mango and affected by mango malformation, and its inhibitory potential on *Fusarium oxysporum* and *F. subglutinans*. *Revista Mexicana de Fitopatologia* [online]. 2001,19(2),154-160[cit.2016-04-11].ISSN0185-3309.Dostupnéz: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092009000100003](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092009000100003).
- AINSWORTH, G. C. a A. S. SUSSMAN. *The Fungi, Volume III, The fungal population*, Academic Press, New York and London, 1968, 621.
- ALESHINA, O. A. Composition and prospects for study of the entomopathogenic fungi of the USSR. *Review of Applied Entomology*, 1980, 68: 83-84.
- AMBROŽOVÁ, J.: *Mikrobiologie v technologii vod. Mikrobiologie v technologii vod. 1.* Praha: VSCHT, 2004, s. 74. ISBN 80 - 7080-534.
- BABBAR, S.B., R. Jain a N. Walia.: Guar gum as a gelling agent for plant tissue culture media. *In vitro cellular & developmental biology. Plant* [online]. 2005, 41(3), 258-261 [cit. 2016-04-24]. ISSN 1054-5476. Dostupné z: [http://aims.fao.org/serials/c\\_57b6eff4](http://aims.fao.org/serials/c_57b6eff4).
- BABU, A. G., J. Shim a K. S.Bang. *Trichoderma virens* PDR-28: a heavy metal-tolerant and plant growth-promoting fungus for remediation and bioenergy crop production on mine tailing soil. *Journal of Environmental Management* [online]. Elsevier, 2014, 132(1), 129-134[cit.2016-04-11].ISSN0301-4797.Dostupnéz: <https://www.agronomy.org/publications/jeq>.
- BAGAR, M. Biologická ochrana rostlin. In: *EPOS: metodické listy*. 12. 2011. Dostupné z: <http://www.eposcr.eu/wp-content/uploads/2011/04/ML12-Biologicka-ochrana.pdf>.
- BAILEY, A., D. Chandler, W.P Grant., J. Greaves, G. Prince a M. Tatchell *Biopesticides: pest management and regulation*. CAB International, Wallingford, 2010, UK, 88-90.
- BAILEY, A.. *Biopesticides: pest management and regulation*. *Biopesticides: pest management and regulation / Alistair Bailey .. [et al.]*. 2011. ISBN 9781845935597.
- BALE S. J., J.C., Van Lenteren a F. Bigler. *Biological Control and Sustainable Food Production*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 2008, 363 : 761776.

- BARONCELLI, R., L. Moncini a F. Matarese. Two endopolygalacturonase genes in *Trichoderma virens*: in silico characterization and expression during interaction with plants. *Journal of Phytopathology* [online]. 2016, 164(1), 18 -28 [cit. 2016-04-11]. ISSN 0931-1785. Dostupné z: <http://www.nal.usda.gov/>.
- BEGUM, M. M., M. Sariah a A. Bin Puteh. Field performance of bio-primed seeds to suppress *Colletotrichum truncatum* causing damping-off and seedling stand of soybean. *Biological control* [online]. 2010, 53(1), 18 - 23 [cit. 2016-04-13]. ISSN 1049-9644. Dostupné z: <http://firstsearch.oclc.org/journal=1049-9644;screen=info;ECOIP>.
- BENHAMOU, N. a K. Picard. La résistance induite: une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes. *Phytoprotection*, 1999, 80: 137-168.
- BENNETT, A. J., C. Leifert a J.M. Whipps. Survival of *Coniothyrium minitans* associated with sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38(1): 164-172.
- BISCHOFF, V., S. Nita a L. Neumetzler. Trichome birefringence and Its Homolog AT5G01360 Encode Plant-Specific DUF231 Proteins Required for Cellulose Biosynthesis in *Arabidopsis*, 2009.
- BLONDHEIM, W. a A. P. Patton. Treated seed, method of seed treatment and compositions therefor. USA. Užiténý vzor 790, 822. 3. únor 1959.
- BOHATÁ, A., Z. Landa a L. Leitner. Standard Evaluation of different strains of mycoparasitic fungus *Coniothyrium minitans*. *Agroregion, Collection of Scientific Papers*, Faculty of Agriculture in Ceske Budejovice. Series for Crop Sciences, 2006, 16: 2, 99-106. 13.
- BORMASHENKO, E., R. Gryniov, Y. Bormashenko a E. Drori. Cold Radiofrequency Plasma Treatment Modifies Wettability and Germination Speet of Plant Seeds. *Scientific Reports*. 17. 10. 2012, 2:741, s. 1-8. DOI: 10.1038/srep00741.
- BOUCIAS D. G., J. C. Pendland. Principles of insect pathology, Kluwer Academic Publishers, 1988, p. 354 – 358. [cit. 2016-01-12] - Dostupné z: <http://books.google.cz/books?id=fpuMPQfSlzMC&printsec=frontcover&dq=Tolypocladium+terricola#v=onepage&q=Tolypocladium%20terricola&f=false>.
- BROŽOVÁ, J. Biologická rozmanitost v České republice. Současný stav a trendy. Ministerstvo životního prostředí. Praha, 2004, ISBN-80-7212-344-0. 7-18.
- BURGES, H. D., Microbial control of insects and mites. Microbial control of insects and mites / Edited by H. D. Burges, N. W. Hussey 1971.

BURGES H. D. a N.W. Hussey. Microbial control of insect and mites, academic press INC.1971,133 - 825.

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

BUTT, M. T. Use of Entomopathogenous Fungi or the Control of Insect Pests. In: Esser K., Lemke P.A. (Eds.): *The Mycota XI.-Agricultural Applications*. Springer, Verlag Berlin Heidelberg, 2002, 111-134.

CALLAN, N.V., D.E. Mantre a J.B Miller. Bio-priming seed treatment for biological control of *Pythium ultimum* preemergence damping-off in sh2 sweet corn. 74 [online]. 1990, 5, 368-372 [cit. 2016-04-24]. ISSN 0191-2917. Dostupné z: <http://www.apsnet.org/pd/top.asp>.

CASTRILLO, L. A., D. W. Roberts a J. D. Vandenberg. The fungal past, present, and future: Germination, ramification, and reproduction, *Journal of Invertebrate Pathology*, 2005, 89: 46 – 56.

CLIQUET, S. a Y. Tirilly. Development of a defined medium for *Pythium oligandrum* oospore production. *Biocontrol Science and Technology*, 2002, 12 (4): 455-467.

COOMS, J. a R. F. Cooms. A dictionary of biological control and integrated pest management. 3rd edition. CPLPress. Newbury. UK, 2003, 310.

COPELAND, L. O. a M. B. McDonald. *Principles of Seed Science and Technology*. Springer, 1995.

CONTRERAS-CORNEJO, K. A., L. Macias-Rodriguez, R. Alfaro-Cuevas a J. Lopez-Bucio. *Trichoderma* spp. improve growth of *Arabidopsis* seedlings under salt stress through enhanced root development, osmolite production, and Na<sup>+</sup> elimination through root exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions* [online]. American Phytopathological Society (APS Press), 2014, 25(6), 503-514 [cit. 2016-04-11]. ISSN 0894-0282. Dostupné z: [http://aims.fao.org/serials/c\\_efe8a66a](http://aims.fao.org/serials/c_efe8a66a).

COURCHAMP, F., L. Berec, J. Gascoigne. *Allee effects in ecology and conservation*. Oxford University Press, New York, New York, 2008, 272, ISBN 978-0-19-956755-3.

DeBACH, P. *Biological control by natural enemies*. Biological control by natural enemies / Paul DeBach. 1974. 845 s. ISBN 0521098351.

DEFANG, Z. a S. Yafei. Preparation and application of a novel environmentally friendly organic seed coating for rice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2009,

89(13), 2181-2185 [cit. 2016-04-24]. ISSN 0022-5142. Dostupné z: [http://aims.fao.org/serials/c\\_d634ab9d](http://aims.fao.org/serials/c_d634ab9d).

DRAKE, J. M. a Lodge, D. M. Allee effects, propagule pressure and the probability of establishment: Risk analysis for biological invasions. *Biological Invasions* 8, 365–375 (2006).

DRIVER, F., R. J. Milner a J.W. Trueman. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, 2000, 104: 134-150.

DRUMMOND, J., J.B. Heale a A.T. Gillespie. Germination and effect of reduced humidity on expression of pathogenicity in *Verticillium lecani* against the glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. *Annals of Applied Biology*, 1987, 111: 193-201.

ELZEIN, A., J. Kroschel a V. Leth. Seed treatment technology: An attractive delivery system for controlling root parasitic weed *Striga* with mycoherbicide. *Agris* [online]. 2006, 16(1-2), 3-26 [cit. 2016-03-27]. ISSN 0958-3157. Dostupné z: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301074996>.

ETHUR, L., E. Blume, M. Muniz a C. A. da Silva. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. *Scientific Electronic Library Online* [online]. 2005, 30(2) [cit. 2016-04-13]. ISSN 0100-4158. Dostupné z: <http://www.scielo.br/>.

ENTESARI, M., F. Sharifzadeh, M. Ahmadzadeh a M. Farhangfar. Seed biopriming with *Trichoderma* species and *Pseudomonas fluorescens* on growth parameters, enzymes activity and nutritional status of soybean. *International Journal of Agronomy and Plant Production* [online]. 2013, 4(4), 610-619 [cit. 2016-04-22]. ISSN 2051-1914. Dostupné z: <http://ijappjournal.com/wp-conte>.

FARGUES, J., M. S. Goettel, N. Smith, A. Ouedraogo a M. Rougier. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. *Mycologia*, 1997, 83(3): 383-392.

FERRIGO, D., A. Raiola, R. Rasera a R. Causin. *Trichoderma harzianum* seed treatment controls *Fusarium verticillioides* colonization and fumonisin contamination in maize under field conditions. *Crop Protection* [online]. 2014, 65(28), 51-56 [cit. 2016-04-22]. ISSN 0261-2194. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/sci..>

FIKR, J. a J. Kahovec. *Názvosloví organické chemie*. Vydání 2. ISBN 80-7346-017-3, 2008.

FILATOVA, I., et al. Plasma-radiowave stimulation of plant seeds germination and inactivation of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the International Plasma Chemistry Society*, 2009, 19: 627.

FLOYD, R. Vegetable seed treatments [online]. 1990 [cit. 2016-03-09]. Dostupné z: <http://www.agric.wa.gov.au/agency/pubns/farmnote>.

FOROUTAN, A. Evaluation of *Trichoderma* isolates for biological control of wheat *Fusarium* foot and root rot. *Romanian Agricultural Research* [online]. 2003, 30(5), 335 - 342 [cit. 2016-04-11]. ISSN 1222-4227. Dostupné z: <http://www.incda-fundulea.ro/rar>.

GAN, Y, E. H. Stobbe a J. Moes. Relative Date of Wheat Seedling Emergence and Its Impact on Grain Yield. *Crop Science*. 1992 (32).

GEISTLINGER, J., J. Zwanzig a S. Heckendorff. SSR markers for *Trichoderma virens*: their evaluation and application to identify and quantify root-endophytic strains. *Diversity* [online]. 2015, 7(4), 360-384 [cit. 2016-04-11]. ISSN 1424-2818. Dostupné z: <http://ovidsp.tx.ovid.com/sp-3.19.0a/ovidweb.cgi?&s=pkmifpaikmddepoencikfaiblocjaa00&complete+reference=s.sh.52%7c2%7c1>.

GLARE, T. R. Biotechnological potential of entomopathogenic fungi. In: Arora, D.K., editor. *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications, Mycology Series*, Marcel Dekker, NY, 2004, 21: 79–90.

GRIMM, C. Economic feasibility of a small-scale production plant for entomopathogenic fungi in Nicaragua. *Crop-Protection*. 2001, 20: 7, 623-630.

GUO, X., et al. Proteins in the Cocoon of Silkworm Inhibit the Growth of *Beauveria bassiana*. *PloS one*, 2016, 11.3: e0151764.

HAJEK, A. *Natural enemies an introduction to biological control*. Cambridge university press, 2004, 366.

HALL, A. R. Whitefly control with fungi. In: Hussey, N.W., Scopes, N. (Eds). *Biological test control-the greenhouse experience*. Cornell University Press. Ithaca. New York, 1985, 116–118.

HANDRIX, W. a G. Turnbull. Canola seed treatment composition and method. Dow Agrosciences Llc. USA. Užitný typ US20140274687 A1. 12. 12.3.2014.

HANSON, L. E. a C. R. HOWEL. Elicitors of Plant Defense Responses from Biocontrol Strains of *Trichoderma virens*. *Phytopatology*, 2004, 94(2):171-6.

HARMAN, T. a A. Stasz. Combining Effective Strains Of *Trichoderma harzianum* And Solid Matrix Priming To Improve Biological Seed Treatments. *Plant disease* [online]. Dep horticultural sciences, Cornell Univ, New York state agricultural exp station, Geneva 14456,



USA., 1989, 73(8), 631-637. [cit. 2016-03-23]. ISSN 0191-2917. Dostupné z: <http://ovidsp.tx.ovid.com>.

HAWKINS, A. B. Theoretical approaches to biological control. Theoretical approaches to biological control / edited by Bradford A. Hawkins and Howard V. Cornell. 1999. ISBN 0521572835. Agris [online]. Springer-Verlag, 56(4), 441-450 [cit. 2016-03-27]. ISSN1386-6141. Dostupné z: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301959749>.

HAWKINS A. B. a H. V. Cornell. Theoretical approaches to biological control, Cambridge university press, 1999, 167 s.

HEBBAR, K. P. a R. D. Lumsden. Biological kontrol of seedling diseases. In: Hall F.R., Menn J.J. (Eds): Biopsticides-use and delivery. Humana Press, Totowa, New Jersey, 1999, 155-170.

HEINZ, K. M. Biocontrol in protected culture. Biocontrol in protected culture / Kevin M. Heinz, Roy G. Van Driesche and Michael P. Parrella, editors. 2004. ISBN 1883052394.

HEINZ, R. Van Driesche, M. Parrella. Bio control in protected culture, Ball publishing, 2004, 535.

HERAUX, M.G. Farah, S.G. Hallett a K.G. Ragothama. Composted chicken manure as a medium for the production and delivery of *Trichoderma virens* for weed control. *HortScience* 2005, 40(5), 1394-1397. ISSN 0018-5345.

HLUCHÝ, M., P. Ackermann a M. Zacharda. Ochrana ovocných dřevin a révy v ekologické a integrované produkci, Brno, Biocont laboratory, FINDR Český Těšín, 2008, 489.

HNILÍČKA, F. Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2006 [online]. ČZU, Praha: VURV, 2006 [cit. 2016-03-09]. ISBN ISBN80-86555-85-2. Dostupné z: <http://www.vurv.cz/files/Publications/ISBN80-86555-85-2.pdf#page=13>

HNÍZDIL, M. Důsledky setí převážně nemořené osiva řepky. Úroda. Praha. Profi press, 2015, (2), 40, ISSN 2464-5427.

HOFMANOVÁ, D. Predátoři a parazitoidi v ochraně rostlin, Úroda, Profi press, Praha, 2003, [cit.2016-02-12] Dostupné z: <http://uroda.cz/predatori-a-parazitoidi-v-ochrane-rostlin/>

HOSNEDL, V. a H. Honsová. Možnosti hodnocení vitality osiva zelenin a květin [online]. In: .ČZU, Praha, 2004, s. 1-5 [cit. 2016-03-10]. Dostupné z: [http://www.agris.cz/Content/files/main\\_files/64/142105/hosned.pdf](http://www.agris.cz/Content/files/main_files/64/142105/hosned.pdf).

HONĚK, A., J. Lukáš, Z. Martinková, O. Pultar a M. Řezáč. Význam predátorů a parazitoidů v integrovaných systémech ochrany rostlin. Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha-Ruzyně, 2008. 64.

HOWARTH, G. F. Environmental Impacts of Classical Biological Control, Annual Review of Entomology, Vol. 36: 485-509, 1991, (Volume publication date January 1991), DOI: 10.1146/annurev.en.36.010191.002413, [cit.2016-02-1].

HOWELL, C. R., R. D. Stipanovic a R. D. Lumsden. Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling diseases. Biocontrol Sci. Technol., 1993, 3: 435-441.

HOWELL, C.R., L.E. Hanson, R.D. Stipanovic a L.S. Puckhaber. Induction of *Trichoderma* species. Transactions of the British Mycological Society, 2000, 71: 469-474.

HOWELL, C. R. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp." Phytopathology, 2002, 92(2): 177-180.

HOWELL, C.R. a L.S. Puckhaber. A study of the characteristics of „P” and „Q” strains of *Trichoderma virens* to account for differences in biological control efficacy against cotton seedling diseases. Biological Control, 2005, 33:217-222.

HRDÝ, I. et al. Biopesticidy v zemědělství, MZE ČR, 1991, 103, ISBN: 80 – 901874-041-2.

HROUDOVÁ, Z., P. Zákravský a T. Frantík. Ecological differentiation of Central European *Bolboschoenus* taxa and their relationship to plant communities. – Folia Geobot, 1999, 34: 77–96.

HU, Q. B., S. X. Ren, J. H. Wu, J. M. Chang a P. D. Musa. Investigation of destruxin A and B from 80 *Metarhizium* strains in China, and the optimization of cultural conditions for the strain MaQ10. Toxicon, 2006, 48: 491-498.

HUANG, H. C. a R.S. Erickson. Overwintering of *Coniothyrium minitans*, a mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum*, on the Canadian prairies. Australasian Plant Pathology, 2002, 31, 291–293.

HUMBER, A. Richard. Fungi: Identification. In: Lacey L.A. (Ed.): Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, London, 1997, 153-185.

HYRŠL, P. Biologická ochrana rostlin pomocí entomopatogenních hlístic a testování její účinnosti, Masarykova univerzita, 2012, [cit. 2016-02-1] Dostupné z: [www.chempoint.cz/biologicka-ochrana-rostlin-pomoci-entomopatogennich-hlistic-a-testovani-jeji-ucinnosti](http://www.chempoint.cz/biologicka-ochrana-rostlin-pomoci-entomopatogennich-hlistic-a-testovani-jeji-ucinnosti).

HÝSEK, J. a M. Vach. Nové biopreparáty a jejich účinek. Úroda. Profi press, 2014, 62(12), 66. ISSN 0139-6013.

CHITRAMPALAM, P., T. A. Turini, M. E. Matheron a B. M. Pryor. Effect of *sclerotium* density and irrigation on disease incidence and on efficacy of *Coniothyrium minitans* in suppressing lettuce drop caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis.*, 2010, 94:1118-1124. Dostupné z: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS-94-9-1118>.

CHARNLEY, A. K. Entomopathogenic Fungi and Their Role in Pest Control. In: Esser K., Lemke P.A. (Eds): *The Mycota IV.-Environmental and Microbial Relationships*. Springer, Verlag Berlin Heidelberg, 1997, 185-201.

CHO, C.T., B.J. Moon a S.Y. Ha. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* causing cucumber wilt by *Gliocladium virens* and *Trichoderma harzianum*. *Korean Journal of Plant Pathology* [online]. 1989, 5(3), 239-249 [cit. 2016-04-12]. ISSN 0256-8608. Dostupné z: [http://aims.fao.org/serials/c\\_932b0e12](http://aims.fao.org/serials/c_932b0e12).

CHAVERRI, P., M. Liu a K.T.A. Hodge. A monograph of the entomopathogenic genera *Hypocrella*, *Molleriella*, and *Samuelsia* gen. nov (Ascomycota, Hypocreales, Clavicipitaceae), and their aschersonia-like anamorphs in the Neotropics. *Studies in Mycology*, 2008, 60: 1-66.

IGNOFFO, C. M. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. *Florida entomol.* 1992 75(4): 516-525.

JANAUER, V. Supresivit biofungicidní přípravek na ochranu p,roti houbovým chorobám v lesních školkách. In: *Ekodisk* [online]., 1999 [cit. 2016-03-16]. Dostupné z: <http://www.mzp.cz/ris/ais-ris-info-copy.nsf/4d735ff9c7e64b58c12569e7001a2d9c/2b81bcc372878687c12569ae0034e4aa?OpenDocument>.

INGLIS, G. D., M.S. Goettel, T.M. Butt a H. Strasser. Use of Hyphomycetes fungi for manging Insect Pests. In: Butt T.M., Jackson C., Magan N. (Eds.): *Fungi as biocontrol agents – progress, problems and potential*. CAB International, Wallingford, UK, 2001, 23-69.

JACKSON, M.A., Ch.A. Dunlap a S.T. Jaronski. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioControl*, 2010, 55(1): 129-145.

JENKINS, N. E. a M. S. Goettel. Methods for mass-production of microbial control agents of grasshoppers and locusts. *Memoirs Entomological Society of Canada*, 1997, 171: 37-48.

JONES, E. E., A. Stewart. Selection of mycoparasites of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* isolated from New Zealand soils. *New Zealand. Journal of Crop and Horticultural Science*, 2000, 28, 105–114.

- JUNGES, E. Biopriming in bean seeds. *Acta Agriculturae Scandinavica: Section B, Soil* [online]. 2016, 66(3), 207-214 [cit. 2016-03-12]. DOI: 10.1080/09064710.2015.1087585. ISSN 09064710. Dostupné z: <http://eds.b.ebscohost.com>.
- JUNQUEIRA, N. T. V. a L. Gasparotto. Controle biológico de fungos estromdticos casadores de doneas foliares em Seringueira, pp. 307-331. In: Anon., *Conrole Biologico de Doen. De Plantas. Orig. W. Bettiol.*, Brasilia, EMBEAPA, 1991.
- KALINA T. a J. Váňa. Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Karolinum, Praha, 2005, 229-236.
- KABALUK, J. a J. D. Ericsson. *Metarhizium anisopliae* Seed Treatment Increases Yield of Field Corn When Applied for Wireworm Control. *Agronomy journal* [online]. 2007, 99(5), 1377-1381 [cit. 2016-04-12]. ISSN 0002-1962. Dostupné z: <https://www.agronomy.org/publications/aj>.
- KEYSER, Ch. A., K. Thorup-Kristensen a N.V. Meyling. *Metarhizium* seed treatment mediates fungal dispersal via roots and induces infections in insects. *Fungal Ecology* [online]. 2014, 11, 121-131 [cit. 2016-04-22]. ISSN 1754-5048. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/sci..>
- KEYSER, Ch. A., B. Jensen a N. V. Meyling. Dual effects of *Metarhizium* spp. and *Clonostachys rosea* against an insect and a seed-borne pathogen in wheat. *Pest Management Science* [online]. 2016, 72(3), 517-526 [cit. 2016-04-22]. ISSN 1526-498X. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/d..>
- KHAZANDA, R. et al. Effects of number of winter wheat crops grown successively on fungal communities on wheat roots. In: *Applied soil ecology: Elsevier*. December 1999, 13(3):271- 282. ISSN: 0929-1393.
- KLINGEN, I., R. Meadow, T. Aandal. Mortality of *Delia floralis*, *Galleria mellonella* and *Mamestra brassicae* treated with insect pathogenic hyphomycetous fungi. *Journal of Applied Entomology*, 2001, 126: 231-237.
- KOCIAN, M. Maximalizace biologických metod v systému integrované ochrany ovoce, Přirození nepřátelé škůdců v intergrované ochraně ovocných sadů. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha – Ruzyně, 1994, 172.
- KOPŘIVA, J. Ochrana. *Zahradnictví*, 1997, 6: 11.
- KRAMER, J. K. a S. Muthukrishnan. Insect chitinases: Molecular biology and potential use as Biopesticides. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 1997, 27: 887-900.

- KRMENČÍK, P. a J. Kysilka. Zearalenony. Toxikon [online]. 1. 1. 2001 [cit. 2016-04-5]. Dostupné z: <http://www.biotox.cz/toxikon/mikromycety/zearalenon.php>
- LANDA, Z. Entomopatogenní houby v biologické ochraně rostlin (habilitační práce). ZF JU, České Budějovice, 2014, 19-33.
- LANDA, Z. Biologická ochrana zahradních rostlin proti chorobám a škůdcům v polních podmínkách, ve sklenících a fóliovnících. In: Demo M., Hričovský I. (Eds.): Trvalo udržatelné technologie v záhradnictve. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2002, 225-280.
- LACEY, L. A., R. Frutos, H. K. Kaya a P. Vail. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They have a future? *Biological control*, 2001, 21: 230 – 248.
- LARKIN, R. P. a D.R, Fravel. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato. *Phytopatology* [online]. 1998, 88(8), 1022 - 1028 [cit. 2016-04-12]. ISSN 0031-949X. Dostupné z: <http://apsjournals.apsnet.org/loi/phyto>.
- LAROUSSE, M. a F. Leipold. Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2004, 233 (1-3), 81-86. DOI: 10.1016/j.ijms.2003.11.016. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S138738060400003X>.
- LEGASPI, J. C., T. J. Poprawski a B.C. Legaspi. Laboratory and field evaluation of *Beauveria bassiana* against sugarcane stalkborers (Lepidoptera: Pyralidae) in the Lower Rio Grande Valley of Texas. *Journal of Economic Entomology*, 2000, 93 (1): 54-59.
- LEGER, ST. J.R. a Wang. Entomopathogenic Fungi and the Genomics Era. In: Stock S.P., Vandenberg J., Glazer I., Boemare N. (Eds): *Insect Pathogens Molecular Approaches and Techniques*. CAB International, London, 2009, 16: 365-368.
- LELAND, J. E. Environmental-stress tolerant formulations of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* for control of African Desert Locust (*Schistocerca gregaria*). Ph.D. Thesis. Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, 2001.
- LIAO, Wen -Te, T. O'Brien a W. Fang. Plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots. *Applied microbiology and biotechnology* [online]. 2014, 98(16), 7089-7096 [cit.2016-04-12]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://www.nal.usda.gov/>.
- LINSLEY, J. Environmental Impacts of Classical Biological Control, *Annual Review of Entomology*, Gressitt Center for Research in Entomology, (36): 485-509, 1991, [cit. 2016-06-

2]Dostupnéz:<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.en.36.010191.002413?journalCode=ento>.

WHIPPS, J.M, Lumsden R.D. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. In: Butt T, Jackson C, Magan N, eds. Fungal biocontrol agents—progress, problems and potential. Wallingford: CAB International, 2001.

MARJANSKA -CICHON, B., R. Mietkiewski a A. Sapieha-Waszkiewicz. The spectrum and occurrence of entomopathogenic fungi in soils from apple orchards. Institut national de la recherche agronomique, Centre de Versailles-Grignon [online]. 2005, 58(1), 113-124 [cit. 2016-04-13]. ISSN 0065-0951. Dostupné z: [http://aims.fao.org/serials/c\\_8302d275](http://aims.fao.org/serials/c_8302d275).

MARTIN, P. A. W., R. F. W. Schroder, T. J. Poprawski, J. J. Lipa, D. Sosnowska, E. Hausvater a V. Rasoch. Vliv vysokých teplot na citlivost mandelinky bramborové (Coleoptera: Chrysomelidae) k *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin v Polsku, České republice a v USA, Vědecké práce – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, 1999, 13: 69 – 77.

McQUILKEN, M.P, J.M. Whipps. Production, survival and evaluation of solid-substrate inocula of *Coniothyrium minitans* against *Sclerotinia sclerotiorum*. Eur J Plant Pathol., 1995, 101:101–110.

MEEKES, E.T.M., S. Van Voorst, N.N. Joosten, J.J. Fransen a J.C. Van Lenteren. Persistence of the fungal whitefly pathogen, *Aschersonia aleyrodis*, on three different plant species, Mycological research, 2000, 104: 1234-1240.

MEYLING, N. V. a J. Eilenberg. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. Biological Control 43,2007, 145–155.

NANCY, W., D.E. Mathre, B. James and S. Charles. Biological seed treatments: Factors involved in efficacy. Horticultural Science, 1997, 32: 179-183.

NERMUŤ, J., V. Půža a Z. Mráček. Entomopatogenní a moluskoparazitické hlístice – neviditelní půdní zabijáci, 2012, [cit.2016-02-1] Dostupné z: <http://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/entomopatogenni-a-moluskoparaziticke-hlistice-nevi.pdf>.

NESRSTA, M. *Trichoderma* pro biologickou ochranu proti rostlinným patogenům. Zahradnictví[online].2002,11(4)[cit.2016-03-15].Dostupnéz: <http://zahradaweb.cz/trichoderma-pro-biologickou-ochranu-proti-rostlinnym-patogenum/>.

NIELSEN, CH., A. B. Jensen a J. Eilenberg. Survival of entomophthoralean fungi infecting aphids and higher flies during unfavorable conditions and implications for conservation biological kontrol. – In: EKESI S. 2007.

O'CALLAGHAN, W.P., G. Cross a G. Mecatti. Suspension medium. Přihlášeno 22.5.1979.

OKROUHLÁ, M. Biologické zdroje pro nechemickou ochranu rostlin, (II.Deuteromycetes, *Trichoderma harzianum* Rifai aggr.), Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha, 1993, 42-48, ISSN 0862-3562.

ONDRÁČKOVÁ, E. Metodika biologické ochrany rostlin s využitím hub rodu *Clonostachys* [online]. Šumperk: Agritec, 2014 [cit. 2016-03-26]. ISBN 978-80-87360-32-3.Dostupné: [http://www.agritec.cz/sites/default/files/metodika\\_biologicke\\_ochrany\\_rostlin\\_s\\_vyuzitim\\_hu\\_b\\_rodu\\_clonostachys.pdf](http://www.agritec.cz/sites/default/files/metodika_biologicke_ochrany_rostlin_s_vyuzitim_hu_b_rodu_clonostachys.pdf).

OSBORNE, S. L. a Z. Landa. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. Florida Entomology, 1992, 75 (4): 456-471.

PAZDERA, J. Vliv hydratace a dehydratace na vitalitu osiva salátu (*Lactuca sativa* L.). ČZU, Praha, 2002. Disertační práce.

PAZDERA, J. Předset'ové úpravy osiv zelenin pro zvýšení jejich kvality. *Zahradnictví* [online]. Profi Press, 2004, 11(6), 5-7 [cit. 2016-03-26]. Dostupné z: <http://zahradaweb.cz/predsetove-upravy-osiv-zelenin-pro-zvyseni-jejich-kvality/>.

PEDERSEN, L. H. Effects of seed vigor and dormancy on field emergence, development and grain-yield of winter-wheat (*Triticum-aestivum* L) and winter barley (*hordeum-vulgare* L). Seed Science and Technology [online]. 1993, 21(1), 159-178 [cit. 2016-03-13]. ISSN 02510952. Dostupné z: <http://eds.b.ebscohost.com>.

PEDRAS, M.S.C., L.I Zaharia., D.E. Ward. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation and biological activity. *Phytochemistry*, 2000, 59: 579-596.

PHILIP, T., D., D. Sharma a H.R. Shivapratap. Antagonistic effect of *Trichoderma* and *Gliocladium virens* on two foliar pathogens of mulberry [*Colletotrichum gloeosporioides*, *Pestalotiopsis disseminata*]. *Séricologia* [online]. 2000, 40(1), 109 -121 [cit. 2016-04-13]. ISSN 0250-3980. Dostupné z: <http://www.versailles-grignon.inra.fr/>.

PROCHÁZKA, P. et al. Zvýšení produkční schopnosti sóji mořením osiva. Úroda. Praha. Profi press, 2015,(11), 30, ISSN 0139-6013.

PROKINOVÁ, E. Biologická ochrana proti houbovým chorobám rostlin. ÚZPI, Rostlinná výroba, 1996, 7:12.

PROKINOVÁ, E. Biologické ošetření osiva pšenice. Úroda. Profi press, 2015, 63(6), 32. ISSN 0139 - 6013.

PULTAR, O. Základní metodiky použití biologické ochrany rostlin v temperovaných prostorách. In: Honěk A., Martinková Z., Stejskal V. (Eds.): Predátoři a parazitoidi v biologické ochraně polních kultur, skleníků a skladovaných komodit. 2003, 18-36, VURV, Praha-Ruzyně.

PULTAR, O. Biologická ochrana skleníkových kultur, 2003, [cit.2016-02-3]Dostupné z:<http://zahradaweb.cz/biologicka-ochrana-sklenikovych-kultur/>.

QUEZADA, R. Juan a P. DeBach. Bioecological and population studies of the cottony-cushion scale, *Icerya purchasi* Mask., and its natural enemies, *Rodolia cardinalis* Mul. and *Cryptochaetum iceryae* Will., in southern California. Hilgardia [online]. 1973, 20(41), 631-668 [cit. 2016-03-28]. DOI: 10.3733/hilg.v41n20p631. Dostupné z: <http://hilgardia.ucanr.edu/Abstract/?a=hilg.v41n20p631>.

RAFI, H a S. Dawar. Effects of bio-priming of leguminous and non-leguminous crop seeds in the management of root rot fungi and growth of crop plants. *International Journal of Biology and Biotechnology* [online]. 2014, 11(2-3), 375-382 [cit. 2016-04-22]. ISSN 1810-2719. Dostupné z: <http://www.ijbbku.com>.

RAO, A. S, M. A. Ghani , G. Sankaran. A review of the biological control of insects and other pests in South-East Asia and the Pacific region. Commonwealth Agric.Bureaux Farnham Royal Technical Communication. Commonwealth Institute of Biological Control (UK). no. 6, 75-76, 1971.

RAO A. S. Antifungal properties of native *Trichoderma* isolates against *Sclerotium rolfsii* and *Pythium aphanidermatum* infecting tobacco. *Journal Of Environmental Biology / Academy Of Environmental Biology, India* [online]. 2015, 36(6), 1349-53 [cit. 2016-03-22]. ISSN 02548704.

REDDY, P. Bio - priming of seeds. Springer [online]. 2012, 83 - 90 [cit. 2016-03-10]. ISSN 978-81-322-0723-8. Dostupné z: [http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-81-322-0723-8\\_6](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-81-322-0723-8_6).

RECHCIGL J., N. Rechcigl. Biological and biotechnological control of insect pests, CRC Press LLC, USA, 2000, 359.

RIBA, G. a S. Marcandier. Influence de l'humidite relative sur l'agressivite et la viabilite des souches de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin et de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, hyphomycetes pathogenes de la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* Hubn. Institut



national de la recherche agronomique, Centre de Versailles-Grignon [online]. [cit. 2016-04-13]. Dostupné z: <http://www.versailles-grignon.inra.fr/>.

ROBERTS, D. W. a W. G. Yendol. Use of fungi for microbial control of insect – In: Burges H. D. & Hussey N. W. (eds.): Microbial control of insect and mites, Academic press, London, 1971, 125 – 150.

ROD, J., M. Hluchý, J. Prášil, K. Zavadil, I. Somssich a M. Zacharda. Obrazový atlas chorob a škůdců zeleniny střední Evropy, Biocont Laboratory, spol s r.o., Brno, 2002, 392.

SAMSON, R. A., H. C. Evans a J.-P. Latgé. Atlas of entomopathogenic Fungy – Springer-Verlag, Berlin, 1988, 187 p.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma* a review of biology and systematics of the genus. *Mycological Research*, 1996, 100, 923-935.

SEJKETOV, G.Š. Griby rodu *Trichoderma* ich ispolzovanie v praktike. Nauka Kazachskoj SSSR, Alma-Ata, 1982, 248.

SELCUK, M., L. Oksuz a P. Basaran. Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by cold plasma treatment. *Bioresource Technology*. 2008, roč. 99, č. 11, s. 5104-5109. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.09.076. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852407007894>.

SEWIFY, G. H. Efficacy of Entomopathogenic Fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for Controlling Certain Stored Product Insects. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* [online]. 2014, 24(1), 191-196 [cit. 2016-03-17]. ISSN 11101768. Dostupné z: <http://eds.a.ebscohost.com>.

SHAH, A. Firdous a J. K. PELL. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 61(5-6): 413–423.

SHUKLA, N. Seed biopriming with drought tolerant isolates of *Trichoderma harzianum* promote growth and drought tolerance in *Triticum aestivum*. *Annals of Applied Biology* [online]. 2015, 166(2), 171-182 [cit. 2016-03-11]. DOI: 10.1111/aab.12160. ISSN 00034746.

SINGH, H. Seed priming techniques in field crops - A review. *Agricultural Reviews* [online]. 2015, 36(4), 251-264 [cit. 2016-03-13]. DOI: 10.18805/ag.v36i4.6662. ISSN 02531496. Dostupné z: <http://eds.b.ebscohost.com>.

SOBOWALE A, A. Odebode, K. Cradwell. Suppression of growth of *Fusarium verticillioides* niren. Using strains of *Trichoderma harzianum* from maize (*zea mays*) plant parts and its rhizosphere, *journal of plant protection research*, 49(4), 2009, 465.

SOOKCHAOY, K. a J. Jomduang. Efficacy of *Gliocladium virens* in controlling *Sclerotium* blight of barley in small scale field trials. Rajamangala Institute of Technology. Lampang Campus, Lampang (Thailand). Lampang Agricultural Research and Training Center) [online]. 1997, , 302 - 308 [cit. 2016-04-12]. Dostupné z: <http://thaiagris.lib.ku.ac.th/eng/>.

STIRLING, G.R. a K.A. Licastro. Development of commercially acceptable formulations of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium*. *Agris* [online]. 1999, 11(3), 217-223,[cit.2016-03-26].Dostupnéz:<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US1997083483>.

STRAKA, J. Supresivit: účinné trávnickové antibiotikum. Green: Časopis českého svazu greenkepperů [online]. 2007, 15(4) [cit. 2016-03-15]. Dostupné z: <http://www.casopis-green.cz/articles/view/40-supresivit-ucinne-travnikove-antibiotikum>.

SVOBODA, L. Použití přípravku Contans WG je doprovázeno vysokou mírou rentability [online]. Sborník z konference „Prosperující olejniny“. Kamenný Újezd, 2007 [cit. 2016-03-14].Dostupnéz:[http://konference.agrobiologie.cz/2007-12-12/31\\_svoboda\\_pouziti\\_pripavku\\_\\_contans\\_wg\\_je\\_doprovazeno\\_vysokou\\_mirou\\_rentabilit\\_y.pdf](http://konference.agrobiologie.cz/2007-12-12/31_svoboda_pouziti_pripavku__contans_wg_je_doprovazeno_vysokou_mirou_rentabilit_y.pdf).

TANADA, Y. a H. K. Kaya. Insect pathology, Academic Press, San Diego, 1993, 319 – 387.

TAYLOR, A.G. Seed coating system to upgrade brassicaceae seed quality by exploiting sinapine leakage. Seed science and technology [online]. 1991, 19(2), 423-433 [cit. 2016-03-09]. ISSN 02510952.

TeKRONY, D.M. Seeds: The Delivery System for Crop Science. Crop science [online]. 2006, 46, no. 5(5) [cit. 2016-03-09]. ISSN 0011183X.

TICHÁ, K. Biologická ochrana rostlin. Biologická ochrana rostlin. Grada Publishing 2001. ISBN 8024790432.

TOUSSAINT, V. Efficacy of CONTANS®WG for the control of sclerotinia rot in carrot: A case study for other susceptible muck soil crops. In: Agriculture and Agri-Food Canada [online]. 2015 [cit. 2016-03-15]. Dostupné z: <http://www.agr.gc.ca/eng/?id=1299165704640>.

TSYGANOV, A.R., Yu.A. Gordeev, O.E. Poddubnaya a I.V. Kovaleva. Peculiarities of mineral nutrition of grain crops during the presowing treatment of seeds by plasma irradiation. Belarus Agricultural Library [online]. 2009, (2), 59-62 [cit. 2016-04-13]. ISSN 0002-3558. Dostupné z: <http://belal.by/Index.html>.

VAN DEN BOSCH, R., P. Messenge a A. Gutierrez Biological control, Plenum Press, New York, 1989, 239.

- VAN DRIESCHE, R.G. a K.M. Heinz. Biological control as a component of IPM systems. In: Heinz, K.M., Driesche, R.G., Parrella, M.P. (Eds.): Biocontrol in protected culture. Ball Publishing, Singapore: 2004, 171-184.
- VAN LENTEREN, C. J. A greenhouse without pesticides: fact or fantasy? Crop Protection [online]. 2000, 19(6), 375-384 [cit. 2016-03-04]. DOI: 10.1016/S0261-2194(00)00038-7. ISSN 02612194.
- VÄNNINEN, I. Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type. Mycological Research, 1995, 100(1): 93-101.
- VÁNA, J. Systém a vývoj hub a houbových organismů. Univerzita Karlova Praha, Karolinum, 1996, 99-112.
- VEGA, F.E. a F.J. Posada. A new method to evaluate the biocontrol potential of single spore isolates of fungal entomopathogens. Journal of Insect Science, 2005, 5:37.
- VERMA, M. a S. Brar. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. Biochemical Engineering Journal [online]. 2007, 37 (1)(10), 1-20 [cit. 2016-03-25]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X07001994>.
- VESELÁ, D. Biologická ochrana proti chorobám kořenů vzcházejících rostlin. Sborník Ref. Z 1. Sem. „Biotechnologie v integrované ochraně rostlin – Mykopreparáty československé výroby a jejich využití v ochraně polních kultur., VÚRV Praha-Ruzyně, 1986.
- WANG, C., M. A., Typas a T.M. Butt, Detection and characterisation of pr1 virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. FEMS Microbiology Letters, 2002, 213: 251-255.
- WARREN, J.E. Bio-osmopriming tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds for improved stand establishment. Seed Science and Technology [online]. 1999, 27(2), 489 - 499 [cit. 2016-03-09]. ISSN 02510952.
- WARREN, J.E. a M.A. Bennett. Seed biology: advances and applications. Proceedings of the Sixth International Workshop on Seeds, Merida, Mexico,. 2000. ISBN 0851994040.
- WATANABE, N. Biological control effect of *Gliocladium* spp. against soil born plant pathogens [online]. Meiji Univ., Kawasaki, Kanagawa (Japan). Faculty of Agriculture, 1994, , 59-66 [cit. 2016-04-12]. ISSN 0465-6083. Dostupné z: [http://aims.fao.org/serials/c\\_8ddd1ee5](http://aims.fao.org/serials/c_8ddd1ee5)
- WATSON, D.W., C. J. Geden, S.J. Long a D.A. Rutz. Efficacy of *Beauveria bassiana* for Controlling the House Fly and Stable Fly (Diptera: Muscidae). Biological Control, 1995, 5: 405-411.

- WEISER, J. Houbová onemocnění hmyzu.: Nemoci hmyzu. Academia, Praha, 1996.
- WELLER, D.M. a R.J. Cook. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with *Pseudomonads fluorescent*. Phytopathology. 1983, 73(3), 463-469. ISSN 0031-949X.
- WHARTON, P. S. Evaluation of biological seed treatments in combination with management practices for the control of *Fusarium* dry rot of potato. Biological Control [online]. 2014, 73, 23-30 [cit. 2016-03-13]. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2014.03.003. ISSN 10499644. Dostupné z: <http://eds.b.ebscohost.com>.
- WHIPPS, J. M. a M. Gerlagh. Biology of *Coniothyrium minitans* and its potential for use in disease biocontrol. Mycological Research, 1992, 96, 897–907.
- WHIPPS, J.M. a R.D. Lumsden. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. In: Butt T, Jackson C, Magan N, eds. Fungal biocontrol agents—progress, problems and potential. Wallingford: CAB International, 2001.
- WILHITE, S.E., R. D. Lumsden a D. C. Straney. Mutational analysis of gliotoxin production by the biocontrol fungus *Gliocladium virens* in relation to suppression of pythium damping-off. Phytopathology, 1994, 84:816–821.
- WOODS, A. Pest control: A survey. Pest control: A survey / Arthur Woods. 1974, 219-407, ISBN 0470960019.
- YANG, R., Y. C. Han, G.Q. Li, D. H. Jiang a H.C. Huang. Suppression of *Sclerotinia sclerotiorum* by antifungal substances produced by the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. Eur J Plant Pathol., 2007, 119:411–420.
- ZHU, Y., J. Pan, J. Qiu a X. Guan. Optimization of nutritional requirements for mycelial growth and sporulation of entomogenous fungus *Aschersonia aleyrodis* Webber. Brazilian Journal of Mikrobiology, 2008, 39.
- ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol Science and Technology [online]. 2007, 17(9), 879-920 [cit. 2016-04-20]. ISSN 0958-3157. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1080/09583150701593963>
- ZÍDEK, Tomáš. et al. Nechemická ochrana rostlin, Zemědělské nakladatelství Brázda, 1992, 106.
- ZVÁRA, J. a V. Táborský. Cvičení z ochrany rostlin I. Provozně ekonomická fakulta v Českých Budějovicích, 1985, 66-67.

Internetové zdroje:

Anonym 1 [cit.2016-03-4] Dostupné z:

<http://www.paleo-doupe.eu/sortiment/xantanova-guma-100-g>

Anonym2 [cit. 2016- 03- 4] Dostupné z:

<http://www.wolfberry.eu/produkt/xantanova-guma-100-g/318/>

Anonym 3 [cit. 2016- 03- 4] Dostupné z <http://www.zdravapotravina.cz/seznam-ecek/E412>

Anonym4[cit.2016-03-4]Dostupné z:

[http://ecka.pedie.cz/wiki/E412\\_\(Guarov%C3%A1\\_guma\)](http://ecka.pedie.cz/wiki/E412_(Guarov%C3%A1_guma))

Anonym 5 [cit. 2016- 03- 4] Dostupné z <http://www.zdravapotravina.cz/seznam-ecek?prisada=E414>

Anonym 6 [cit. 2016- 03- 4] Dostupné z:

<http://www.agromanual.cz/cz/pripravky/fungicidy/fungicid/raxil-star>

Anonym7[cit.2016-03-4] Dostupné z:

[http://www.p-lab.cz/katalog/karboxymethylceluloza-sodna-sul\\_2577p](http://www.p-lab.cz/katalog/karboxymethylceluloza-sodna-sul_2577p)

Anonym8 [cit. 2016- 03- 4] Dostupné z:

[http://ecka.pedie.cz/wiki/E412\\_\(Guarov%C3%A1\\_guma\)](http://ecka.pedie.cz/wiki/E412_(Guarov%C3%A1_guma))