

# UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

## PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BOTANIKY

studijní program: Biologie  
studijní obor: Botanika



Bc. Šárka Valinová

### **Diverzita a taxonomie rodu *Trichoderma* v České republice**

*Diversity and taxonomy of Trichoderma in the Czech Republic*

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Alena Kubátová, CSc.

Konzultanti: Mgr. Miroslav Kolařík, Ph.D., Mgr. Ondřej Koukol, Ph.D.

Praha 2013

**Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Šárka Valinová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala RNDr. Alena Kubátová, CSc. za vedení této diplomové práce, pomoc při zpracování a určování izolátů a především za velkou trpělivost.

Můj velký dík patří též Mgr. Miroslavu Kolaříkovi, PhD. za všestrannou pomoc, především v oblasti molekulární metodiky. Za podnětné připomínky a přátelské prostředí v mykologické laboratoři bych tímto ráda poděkovala také Mgr. Ondřejovi Koukolovi PhD..

Zvláštní poděkování patří mým blízkým, kteří mě při studiu vždy podporovali.

## ABSTRAKT

Rod *Trichoderma* - anamorfa rodu *Hypocrea* (Hypocreaceae, Hypocreales, Sordariomycetes, Ascomycota) patří mezi saprotrofní vláknité mikromycety. Zástupci tohoto rodu jsou významní především jako kosmopolitní obyvatelé půdních ekosystémů, včetně opadu a dřevního materiálu. Tato práce shrnuje výsledky studia izolátů patřících k rodu *Trichoderma* pocházejících z území České republiky, a to především z půdy a opadu. V rámci diplomové práce bylo zpracováno celkem 267 izolátů. U všech těchto izolátů byla zjištěna druhová příslušnost pomocí fenotypových znaků, UP-PRC fingerprintingu a genové sekvence oblasti *tef 1 $\alpha$* , ITS a u kmenu AK 115/00 též úseku *rpb2*. Výsledkem studie byla identifikace 21 druhů rodu *Trichoderma* patřících do 4 sekcí a nalezení jednoho izolátu druhu dosud pro vědu neznámého. Druhy *T. crassum*, *T. gamsii*, *T. ghanense*, *T. rossicum* a *T. longipile* byly v České republice nalezeny poprvé. Z literárních údajů a z vlastní studie vyplývá, že v současné době je v ČR známo 34 druhů rodu *Trichoderma*. V práci je diskutována nepříliš velká spolehlivost identifikace některých druhů založená jen na fenotypových znacích.

**Klíčová slova:** diversita, *Trichoderma*, *Hypocrea*, Česká republika, *Trichoderma* sp. nov.

## ABSTRACT

Genus *Trichoderma* - anamorph of the genus *Hypocrea* (Hypocreaceae, Hypocreales, Sordariomycetes, Ascomycota) belongs to saprotrophic filamentous micromycetes. The representatives of this genus are known primarily as cosmopolitan inhabitants of soil ecosystems, including leaf litter and woody debris. This work summarizes the results of the study of isolates belonging to the genus *Trichoderma* originating from the territory of the Czech Republic, mainly from soil and leaf litter. During the study, altogether 267 isolates were analysed. For all of the isolates the following methods were used: phenotypic characterisation, UP-PCR fingerprinting, gene sequencing in *tef 1 $\alpha$*  and ITS regions, and in the strain AK 115/00 also in *rpb2*

region. The main result of the study was the identification of 21 species of genus *Trichoderma* belonging into 4 groups and discovery of one isolate of species yet unknown to science. Species *T. crassum*, *T. gamsii*, *T. ghanense*, *T. rossicum* and *T. longipile* were found in the Czech Republic for the first time. According to the literature review and results of this study, 34 different *Trichoderma* species is currently known from the Czech Republic. In the work there is also discussed low reliability of identification of certain species based only on phenotypic characters.

**Key words:** diversity, *Trichoderma*, *Hypocrea*, Czech Republic, *Trichoderma* sp. nov.

## OBSAH

|                                                                                                      |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE.....</b>                                                                      | <b>8</b>  |
| <b>2 LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>                                                                     | <b>9</b>  |
| 2.1 <i>Trichoderma</i> (anamorfa rodu <i>Hypocrea</i> ) .....                                        | 9         |
| 2.1.1 Morfologie rodu.....                                                                           | 9         |
| 2.1.2 Fylogeneze a systematické členění rodu.....                                                    | 11        |
| 2.1.3 Charakteristika sekcí rodu <i>Trichoderma</i> .....                                            | 12        |
| 2.2 Ekologie, geografické rozdělení a diverzita .....                                                | 17        |
| 2.3 Význam pro člověka.....                                                                          | 21        |
| 2.4 <i>Hypocrea</i> (teleomorfa rodu <i>Trichoderma</i> ) .....                                      | 23        |
| 2.4.1 Morfologie, ekologie a rozšíření .....                                                         | 23        |
| 2.5 Vývoj poznání druhové diverzity rodu <i>Trichoderma</i> v závislosti<br>na metodách studia ..... | 25        |
| 2.6 Metody používané pro druhovou identifikaci .....                                                 | 27        |
| 2.6.1 Morfologická analýza .....                                                                     | 27        |
| 2.6.2 Molekulární analýza .....                                                                      | 27        |
| 2.7 Výskyt zástupců rodu <i>Trichoderma</i> na území České republiky.....                            | 29        |
| <b>2 MATERIÁL A METODY .....</b>                                                                     | <b>33</b> |
| 3.1 Studované izoláty hub rodu <i>Trichoderma</i> .....                                              | 33        |
| 3.2 Lokality.....                                                                                    | 33        |
| 3.3 Metodika.....                                                                                    | 35        |
| 3.3.1 Revitalizace sbírkových kmenů .....                                                            | 35        |
| 3.3.2 Odběry a zpracování vlastních vzorků.....                                                      | 36        |
| 3.4 Morfologické hodnocení izolátů.....                                                              | 37        |
| 3.5 Molekulárně taxonomická analýza .....                                                            | 37        |
| 3.5.1 Izolace DNA .....                                                                              | 38        |
| 3.5.2 UP-PCR fingerprinting .....                                                                    | 38        |
| 3.5.3 DNA amplifikace.....                                                                           | 39        |
| 3.5.4 Purifikace DNA .....                                                                           | 41        |
| 3.5.5 Sekvenace DNA.....                                                                             | 42        |
| 3.6 Konstrukce fylogenetických kladogramů.....                                                       | 42        |

|                                                                                                                                                                                                |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.7 Statistické zpracování dat .....                                                                                                                                                           | 43         |
| 3.8 Seznam vybraných zkratk použitých v diplomové práci .....                                                                                                                                  | 43         |
| <b>4 VÝSLEDKY .....</b>                                                                                                                                                                        | <b>44</b>  |
| 4.1 Druhov $\acute{e}$ zastoupen $\acute{e}$ rodu <i>Trichoderma</i> na jednotliv $\acute{y}$ ch substr $\acute{a}$ tech resp.<br>nadmořsk $\acute{y}$ ch v $\acute{y}$ šk $\acute{a}$ ch..... | 44         |
| 4.1.1 Druhov $\acute{e}$ zastoupen $\acute{e}$ na jednotliv $\acute{y}$ ch substr $\acute{a}$ tech.....                                                                                        | 45         |
| 4.1.2 Druhov $\acute{e}$ zastoupen $\acute{e}$ v jednotliv $\acute{y}$ ch nadmořsk $\acute{y}$ ch v $\acute{y}$ šk $\acute{a}$ ch.....                                                         | 54         |
| 4.2 V $\acute{y}$ sledky molekul $\acute{a}$ rn $\acute{ı}$ anal $\acute{y}$ zy .....                                                                                                          | 62         |
| 4.2.1 Charakteristika druh $\acute{u}$ rodu <i>Trichoderma</i> dosud nezn $\acute{a}$ m $\acute{y}$ ch<br>z $\acute{u}$ zem $\acute{ı}$ $\acute{C}$ esk $\acute{e}$ republiky .....            | 72         |
| 4.2.2 <i>Trichoderma</i> sp. AK 115/00 .....                                                                                                                                                   | 77         |
| 4.3 Diverzita rodu <i>Trichoderma</i> na $\acute{u}$ zem $\acute{ı}$ $\acute{C}$ esk $\acute{e}$ republiky .....                                                                               | 86         |
| <b>5 DISKUZE .....</b>                                                                                                                                                                         | <b>88</b>  |
| 5.1 Použit $\acute{a}$ metodika .....                                                                                                                                                          | 88         |
| 5.1.1 V $\acute{y}$ b $\acute{e}$ r morfotyp $\acute{u}$ .....                                                                                                                                 | 88         |
| 5.1.2 Spolehlivost druhov $\acute{e}$ ho ur $\acute{c}$ en $\acute{ı}$ dle morfologick $\acute{y}$ ch znak $\acute{u}$ .....                                                                   | 88         |
| 5.1.3 Revize sb $\acute{ı$ rkov $\acute{y}$ ch izol $\acute{a}$ t $\acute{u}$ rodu <i>Trichoderma</i> .....                                                                                    | 90         |
| 5.1.4 Metodika UP-PCR fingerprintingu .....                                                                                                                                                    | 92         |
| 5.1.5 Použit $\acute{ı}$ jednotliv $\acute{y}$ ch $\acute{u}$ sek $\acute{u}$ DNA k druhov $\acute{e}$ identifikaci .....                                                                      | 92         |
| 5.2 Zjišt $\acute{e}$ n $\acute{a}$ diverzita rodu <i>Trichoderma</i> z $\acute{u}$ zem $\acute{ı}$ $\acute{C}$ esk $\acute{e}$ republiky .....                                                | 93         |
| 5.2.1 Srovn $\acute{a$ n $\acute{ı}$ v $\acute{y}$ sledk $\acute{u}$ s dostupn $\acute{y}$ mi liter $\acute{a}$ rn $\acute{ı}$ mi $\acute{u}$ daji .....                                       | 94         |
| 5.2.2 Dominantn $\acute{ı}$ druhy ( <i>T. harzianum</i> a <i>T. viride</i> ) - substr $\acute{a}$ tov $\acute{a}$ a v $\acute{y}$ šk $\acute{o$ v $\acute{a}$<br>preference .....              | 96         |
| 5.3 Rozsah studovan $\acute{e}$ ho materi $\acute{a}$ lu ve vztahu ke zjišt $\acute{e}$ n $\acute{e}$ diverzit $\acute{e}$ .....                                                               | 97         |
| 5.4 Diverzita druh $\acute{u}$ rodu <i>Trichoderma</i> studovan $\acute{a}$ morfologick $\acute{y}$ mi a molekul $\acute{a}$ rn $\acute{ı$ mi<br>metodami .....                                | 97         |
| <b>6 Z<math>\acute{A}</math>V<math>\acute{E}</math>R .....</b>                                                                                                                                 | <b>99</b>  |
| <b>7 LITERATURA .....</b>                                                                                                                                                                      | <b>101</b> |
| <b>8 P<math>\acute{R}</math>ÍLOHY .....</b>                                                                                                                                                    | <b>111</b> |

## 1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Mikroskopické houby rodu *Trichoderma* patří mezi nejrozšířenější houby na Zemi. V přírodě mají velký význam především jako rozkladači rostlinných zbytků, ale patří i k houbám člověkem využívaných v různých odvětvích průmyslu. Proto je tomuto rodu v posledních desetiletích věnována značná pozornost.

Studium druhové diverzity rodu *Trichoderma* přispívá k rozšíření poznatků o ekologii jednotlivých druhů a k popisu druhů nových, které jsou potenciálními producenty řady biologicky aktivních látek. Studie taxonomie a biodiverzity rodu *Trichoderma* byly prováděny v různých částech světa; větší množství informací je známo především pro oblast Severní Ameriky a Evropy, jejichž druhové zastoupení je v současné době poměrně dobře prozkoumáno. Především některé oblasti Evropy byly studovány velmi detailně. Patrně nejobsáhlejším výzkumem určité biogeografické oblasti bylo studium diverzity rodu *Trichoderma* v mírných zeměpisných šířkách Evropy (Jaklitsch 2009, 2011). Tyto studie vedly k popisu mnoha nových druhů, které však lze mnohdy rozpoznat pouze metodami molekulárního studia. Druhové určení izolátů patřících k rodu *Trichoderma* z území České republiky však bylo až na několik výjimek dosud založeno pouze na fenotypových znacích. Navíc většina z těchto publikovaných nálezů pochází z doby, kdy bylo známo jen 9-30 druhů rodu *Trichoderma*.

Morfologické znaky druhů rodu *Trichoderma* v jejich dnešním úzkém pojetí se často překrývají, takže jejich identifikace jen na základě morfologických znaků je dosti nespolehlivá.

Cílem této studie bylo:

- přispět ke znalostem o druhové diverzitě rodu *Trichoderma* na našem území kombinací morfologických a molekulárních metod studia
- porovnat zjištěné výsledky s dosud známými údaji o diverzitě druhů rodu *Trichoderma* z našeho území
- zhodnotit efektivitu použitého metodického přístupu, stanovit, které druhy či skupiny druhů jsou nejčastěji zaměnitelné při použití pouze morfologických metod a vyvodit doporučení pro druhovou identifikaci

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 *TRICHODERMA* (ANAMORFA RODU *HYPOCREA*)

#### 2.1.1 Morfologie rodu

Rod *Trichoderma* je anamorfním (nepohlavním) stádiem rodu *Hypocrea* (Hypocreaceae, Hypocreales, Sordariomycetes, Ascomycota); u některých druhů rodu *Trichoderma* však není teleomorfa známa. *Trichoderma* patří mezi saprotrófní vláknité mikromycety; většinu jejích zástupců lze v laboratorních podmínkách snadno kultivovat. Při kultivaci na agarových médiích za standardních podmínek se pak morfologické znaky mnohem lépe pozorují a hodnotí než na přirozených substrátech v přírodě (Domsch a kol. 2007). U izolátů rodu *Trichoderma* se posuzuje zbarvení kolonií, rychlost růstu na specifických médiích a při dané teplotě, rychlost a typ sporulace. Mikroskopická charakteristika zahrnuje celkovou stavbu, délku a větvení konidioforů, postavení a tvar konidiogenních buněk (tj. fialid), tvar, velikost a zbarvení konidií, přítomnost chlamydospor a sterilních vláken (Bissett 1991a).

Většina zástupců tohoto rodu utváří kolonie zbarvené v době zralosti zeleně. Vyskytují se však i druhy s bělavě zbarvenými koloniemi. Zbarvení kolonií se s dozrávajícími sporami mění, zpravidla od bělavých k žluté až zelené. Sporulace může být buď efusní, tj. konidiofory se tvoří rovnoměrně po celém povrchu kolonie, nebo pustulátní, kdy houba tvoří chomáčkovitě shluky konidioforů. Růst kolonií je obvykle velmi rychlý. Nejprve se vytváří substrátové mycelium, jehož tvorba se u jednotlivých druhů liší dle použitého inkubačního média; vzdušné mycelium nemusí být výrazně vyvinuto. Velmi příznačný je pro některé trichodermy specifický čichový počitek - nejčastěji kokosové či kafrové vůně (Gams a Bissett 1998).

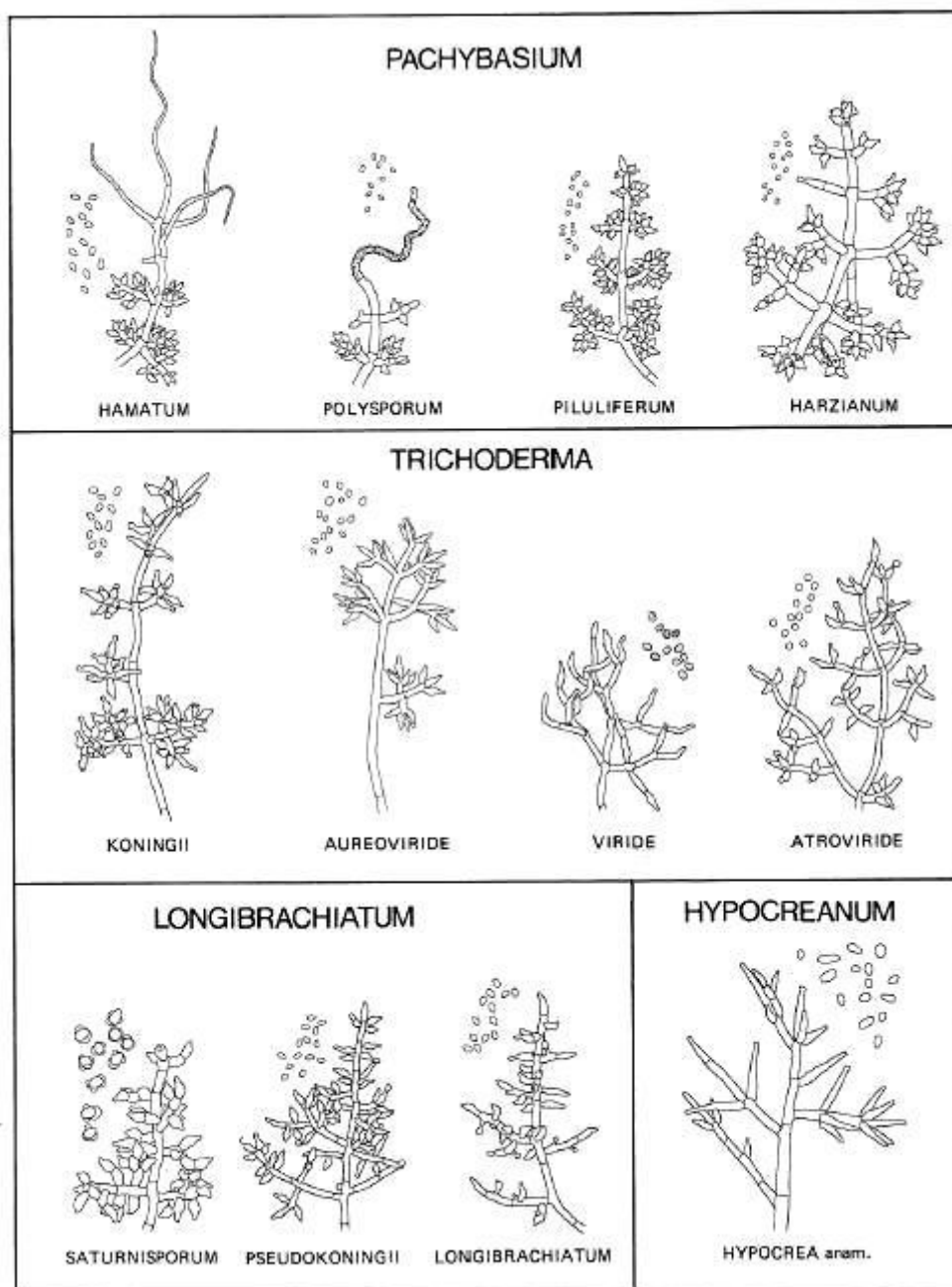
Konidiofory jsou u rodu *Trichoderma* typicky bohatě opakovaně větvené (Obr. 1). Nejčastějším způsobem větvení je přítomnost hlavního osního vlákna nesoucího pravidelně uspořádané boční větve, které se apikálním směrem zkracují. Vzniká tak typický pyramidální tvar konidioforu. Větve pak bývají více či méně divergentní, odstupují jednotlivě, ve dvojicích, popřípadě v přeslenu. Vyskytují se však i druhy (sekce *Pachybasium*), které mají hlavní vlákno a primární větve zakončeny sterilními

výběžky. Ty mohou být rovné, lehce zakřivené či na konci stočené, na povrchu hladké nebo bradavčité.

Fialidy (konidiogenní buňky) jsou takřka vždy umístěny terminálně na divergentních větvích konidioforů, často v párech či trojicích, popřípadě jednotlivě. Tvar fialid bývá dosti rozmanitý, nejčastěji jsou cylindrické, lahvičkovité, šídlovité, někdy až kulovité, na konci zúžené v krček (Gams a Bissett 1998).

Konidie jsou jednobuněčné spory utvářené na konci fialid, kde se shlukují do kulovitých útvarů. Zpravidla bývají zeleně zbarvené, méně často pak žlutohnědé (*Trichoderma koningiopsis*, *T. viridescens*), popřípadě bílé až světle šedé (*T. polysporum*). Velikost, tvar a povrchová struktura konidií jsou nejvýznamnějšími morfologickými identifikačními znaky. Tvar konidií je nejčastěji kulovitý, elipsovité, obovoidní, protáhlý až válcovitý. Na povrchu konidií některých druhů se vyskytují bradavčité či blanité výrůstky, častěji je však povrch konidií zcela hladký (Bissett 1991a).

U většiny druhů se lze setkat s vmezeřenými (interkalárními) či koncovými (terminálními) chlamydosporami, obvykle umístěnými na krátkých větvích. Ve většině případů bývají hladké, bezbarvé až žlutavé, kulovité až elipsovité (Bissett 1991a, b, c).



Obr. 1: Tvary konidioforů a konidií charakteristické pro jednotlivé sekce rodu *Trichoderma* (převzato z práce Bissetta 1991a, upraveno dle aktuální podoby systému rodu *Trichoderma*).

### 2.1.2 Fylogeneze a systematické členění rodu

První systematické členění rodu *Trichoderma* lze nalézt v práci „A revision of the genus *Trichoderma*“ (Rifai 1969), kde jsou jednotlivé druhy tohoto rodu rozděleny do devíti skupin (agregátů) na základě morfologie konidioforů. Současné systematické členění vychází z Bissetovy práce (Bisset 1991a), který navázal na Rifaie a rovněž

rozdělil druhy dle morfologických znaků. Charakterizoval 5 sekcí rodu *Trichoderma*: *Pachybasium*, *Trichoderma*, *Saturnisporum*, *Longibrachiatum* a *Hypocreanum*. V roce 1987 však došlo ke včlenění sekce *Saturnisporum* do sekce *Longibrachiatum* (Doi a kol. 1987). Současný systém rodu *Trichoderma* tak sestává ze čtyř sekcí, jehož základem je Rifaiovo členění dle charakteru konidioforů, jednotlivé sekce však mají společné i další morfologické znaky a vztahy k jednotlivým skupinám rodu *Hypocrea*. Toto moderní schéma je též podpořeno na molekulární úrovni; jednotlivé sekce jsou dále členěny na úroveň větví („clades“) (Druzhinina a Kopchinskiy 2004-2008). V současné době je známo 181 platně popsanych druhů rodu *Trichoderma* (viz Tab. 14 v kapitole Přílohy). Nicméně pouze část těchto popsanych druhů je zmapována též molekulárně. Druzhinina a Kopchinskiy (2004-2008) uvádějí na internetových stránkách International Subcomission of *Trichoderma/Hypocrea* aktuální počet molekulárně rozpoznávaných druhů rodu *Trichoderma* a *Hypocrea*, a to 114 druhů (69 zástupců rodu *Trichoderma*). Tyto druhy jsou na základě fylogenetické příbuznosti členěny do 4 sekcí. Druhy nepříbuzné uvedeným druhům jsou řazeny do sekce „Lone Lineages“ ([www.isth.info](http://www.isth.info)). V Tab. 1 je uveden přehled v současnosti rozpoznávaných druhů rozřazených do jednotlivých sekcí. Druhy označené kódem nebyly zatím formálně popsány.

Vedle zástupců se známým genetickým kódem existuje i mnoho druhů tohoto rodu uváděných mezi platně popsány, kteří nejsou v současnosti vůbec rozpoznávány (např. *T. granulosum* Fuckel 1870 či *T. vulpinum* Fuckel 1874, jejichž izoláty ve světových sbírkách chybí).

Seznam platně popsanych druhů rodu *Trichoderma* a jejich spojení s teleomorfo (převzato z [www.mycobank.org/](http://www.mycobank.org/)) je uveden v Tab. 14 v kapitole Přílohy.

## **2.1.3 Charakteristika sekcí rodu *Trichoderma/Hypocrea***

### **2.1.3.1 Sekce *TRICHODERMA***

Kolonie bývají zpravidla rychle rostoucí (v závislosti na druhu), vzdušné mycelium nebývá příliš vyvinuté, vločkovité až pavučinovité se spodní stranou nezbarvenou až nažloutlou. U některých zástupců této sekce lze zaznamenat charakteristickou kokosovou vůni. Sporulace bývá jak efuzní (rozptýlená), tak soustředěná v kompaktních pustulech (shlucích konidioforů). Ty jsou nejdříve bílé,

poté zpravidla nabývají zeleného zbarvení. Chlamydospory se obvykle čteně vyskytují u většiny druhů. Konidiofory jsou relativně úzké a zprohýbané. Primární větve vyrůstají vždy z osního vlákna s pravidelnými rozestupy, většinou v párech či přeslenech po třech; obvykle krátké a nepřilíš větvené. Fialidy zpravidla lahvičkovitého až šídlovitého tvaru, bývají na konidioforu přeslenitě uspořádané ve dvojicích či trojicích, mohou se však vyskytovat i pětičetné přesleny. Konidie jsou zelené (výjimečně hnědé), na povrchu hladké až výrazně bradavčité; obvykle obovoidní až elipsoidní (Gams a Bissett 1998).

V současné době je do sekce řazeno 26 druhů rodu *Trichoderma* a *Hypocrea* rozdělených do 2 větví: *Viride* a *Hamatum* (viz Tab. 1).

#### **2.1.3.2 Sekce *PACHYBASIUM***

Růst kolonií je z velké míry závislý na daném druhu, sekce zahrnuje pomalu i rychle rostoucí zástupce. Spodní strana kolonie bývá bezbarvá, žlutavá, někdy načervenalá. Lze se setkat se sporulací efuzní nebo v chomáčcích, nejčastěji však v kompaktních pustulech. Obvyklé zbarvení je bílé až šedavé, zelené či hnědé. Konidiofory se často shlukují do svazků či pustul, opakovaně a pravidelně se větví; větve pak bývají nejdelší obvykle u báze konidioforu a dále se několikrát opakovaně větví. Poměrně často nesou konidiofory charakteristická sterilní zakončení, většinou jednoduchá, mohou se však i dále větvit či vytvářet anastomózy s vrcholky sousedních konidioforů. Fialidy jsou většinou umístěny v přeslenech po dvou až sedmi, často nahloučené, znatelně kratší a širší než u jiných sekcí. Na laterálních větvích bývají fialidy lahvičkovitého tvaru, terminální větve nesou obvykle šídlovité až vřetenovité fialidy. Konidie jsou zpravidla bezbarvé, zelené až hnědé, tvar elipsoidní až obovoidní nebo subglobózní, s hladkým povrchem (Gams a Bissett 1998).

V současné době sekce zahrnuje 34 druhů rozdělených do 6 větví: *Harzianum*, *Virens*, *Semiorbis*, *Strictipilis*, *Stromaticum* a *Pachybasioides* (viz Tab. 1).

#### **2.1.3.3 Sekce *LONGIBRACHIATUM***

Kolonie druhů řazených do této sekce jsou charakteristické rychlým nárůstem a výrazným žlutozeleným zbarvením spodní strany u čerstvých izolátů. Sporulace bývá efuzní, nebo ve volných chomáčcích, takřka vždy zelená. Konidiofory jsou značně

řidké s dlouhými primárními a krátkými málo rozvětvenými sekundárními větvemi. Fialidy jsou na konidioforu rozmístěny náhodně, většinou vyrůstají jednotlivě, příležitostně v přeslenech po 2-3. Fialidy mají lahvičkovitý až šídlovitý či cylindrický tvar. Konidie jsou zelené, elipsovitě až obovoidní, obvykle hladké (Gams a Bissett 1998).

V současné době sekce zahrnuje 16 druhů zařazených do 1 větve: *Longibrachiatum* (viz Tab. 1).

#### 2.1.3.4 Sekce *HYPOCREANUM*

Většina druhů této sekce neroste příliš rychle ve srovnání s druhy jiných sekcí, růstová rychlost se však liší u jednotlivých zástupců. Sporulace bývá efuzní, barevná či bělavá. Obvykle široké konidiofory vyrůstají zpravidla jednotlivě, nepravidelně a nepříliš často se větví; netvoří anastomózy. Cylindrické až lahvičkovité fialidy obvykle vyrůstají v koncových přeslenech, lze však nalézt i jednotlivé fialidy. Konidie nebývají zbarvené, obvykle mají hladký povrch, zřídka nevýrazné bradavky. Tvar a velikost konidií je velmi variabilní, často se vyskytují konidie obvejčitého tvaru (Gams a Bissett 1998).

V současné době sekce zahrnuje 17 druhů rozdělených do 5 větví: *Ceramica*, *Chlorospora*, *Psychrophyla*, *Megalocitrina* a *Citrina* (viz Tab. 1).

Tab. 1: Systematické členění rodu *Trichoderma/Hypocrea* (převzato z [www.isth.info](http://www.isth.info))

| Sekce <b>PACHYBASIUM</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Větev Harzianum</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Hypocrea atrogelatinosa</i></li> <li>• <i>Hypocrea catoptron/Trichoderma catoptron</i></li> <li>• <i>Hypocrea cinnamomea/Trichoderma cinnamomeum</i></li> <li>• <i>Hypocrea lixii/Trichoderma harzianum</i></li> <li>• <i>Hypocrea</i> sp. WJ 2608</li> <li>• <i>Hypocrea</i> sp. WJ 2701</li> <li>• <i>Hypocrea straminea/Trichoderma stramineum</i></li> <li>• <i>Hypocrea tawa</i></li> <li>• <i>Hypocrea thailandica/Trichoderma thailandicum</i></li> <li>• <i>Trichoderma aggressivum</i></li> <li>• <i>Trichoderma cerinum</i></li> <li>• <i>Trichoderma pleuroticola</i></li> <li>• <i>Trichoderma pleurotum</i></li> <li>• <i>Trichoderma tomentosum</i></li> <li>• <i>Trichoderma velutinum</i></li> </ul> |
| <b>Větev Virens</b>      | • <i>Hypocrea crassa/ Trichoderma crassum</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

|                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Hypocrea virens</i>/ <i>Trichoderma virens</i></li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>Větev Semiorbis</b>       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Hypocrea hunua</i></li> <li>• <i>Hypocrea semiorbis</i></li> <li>• <i>Trichoderma fertile</i></li> <li>• <i>Trichoderma oblongisporum</i></li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>Větev Strictipilis</b>    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Hypocrea aureoviridis</i> var. <i>macrospora</i></li> <li>• <i>Hypocrea cuneispora</i></li> <li>• <i>Hypocrea strictipilosa</i>/ <i>Trichoderma strictipilis</i></li> <li>• <i>Trichoderma longipile</i></li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>Větev Stromaticum</b>     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Trichoderma rossicum</i></li> <li>• <i>Trichoderma</i> sp. PPRI 3559</li> <li>• <i>Trichoderma stromaticum</i></li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>Větev Pachybasioides</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Hypocrea lacuwombatensis</i></li> <li>• <i>Hypocrea minutispora</i>/ <i>Trichoderma minutisporum</i></li> <li>• <i>Hypocrea pachybasioides</i>/ <i>Trichoderma polysporum</i></li> <li>• <i>Hypocrea parapilulifera</i></li> <li>• <i>Hypocrea pilulifera</i>/ <i>Trichoderma piluliferum</i></li> <li>• <i>Hypocrea stellata</i></li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>Sekce LONGIBRACHIATUM</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>Větev Longibrachiatum</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Hypocrea andinensis</i></li> <li>• <i>Hypocrea cerebriiformis</i></li> <li>• <i>Hypocrea jecorina</i>/ <i>Trichoderma reesei</i></li> <li>• <i>Hypocrea novaezelandiae</i></li> <li>• <i>Hypocrea orientalis</i></li> <li>• <i>Hypocrea patella</i></li> <li>• <i>Hypocrea poronoidea</i></li> <li>• <i>Hypocrea pseudokoningii</i>/ <i>Trichoderma pseudokoningii</i></li> <li>• <i>Hypocrea schweinitzii</i>/ <i>Trichoderma citrinoviride</i></li> <li>• <i>Trichoderma effusum</i></li> <li>• <i>Trichoderma ghanense</i></li> <li>• <i>Trichoderma konilangbra</i></li> <li>• <i>Trichoderma longibrachiatum</i></li> <li>• <i>Trichoderma saturnisporum</i></li> <li>• <i>Trichoderma sinensis</i></li> <li>• <i>Trichoderma</i> sp. MA 3642</li> </ul> |
| <b>Sekce TRICHODERMA</b>     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>Větev Viride</b>          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Hypocrea atroviridis</i>/ <i>Trichoderma atroviride</i></li> <li>• <i>Hypocrea koningii</i>/ <i>Trichoderma koningii</i></li> <li>• <i>Hypocrea muroiana</i></li> <li>• <i>Hypocrea rufa</i>/ <i>Trichoderma viride</i></li> <li>• <i>Hypocrea stilbohypoxyli</i></li> <li>• <i>Hypocrea viridescens</i>/ <i>Trichoderma viridescens</i></li> <li>• <i>Trichoderma austrokoningii</i></li> <li>• <i>Trichoderma caribbaeum</i> var. <i>aequatoriale</i></li> <li>• <i>Trichoderma caribbaeum</i> var. <i>caribbaeum</i></li> </ul>                                                                                                                                                                                                                            |

|                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Trichoderma dingleyae</i></li> <li>• <i>Trichoderma dorotheae</i></li> <li>• <i>Trichoderma erinaceum</i></li> <li>• <i>Trichoderma intricatum</i></li> <li>• <i>Trichoderma koningiopsis</i></li> <li>• <i>Trichoderma ovalisporum</i></li> <li>• <i>Trichoderma petersenii</i></li> <li>• <i>Trichoderma rogersonii</i></li> <li>• <i>Trichoderma strigosum</i></li> <li>• <i>Trichoderma taiwanense</i></li> </ul>                                                                                                             |
| <b>Větev Hamatum</b>         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Hypocrea flaviconidia</i></li> <li>• <i>Hypocrea neorufa</i></li> <li>• <i>Hypocrea pezizoides</i></li> <li>• <i>Trichoderma asperellum</i></li> <li>• <i>Trichoderma hamatum</i></li> <li>• <i>Trichoderma pubescens</i></li> <li>• <i>Trichoderma theobromicola</i></li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>Sekce HYPOCREANUM</b>     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Větev Ceramica</b>        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Hypocrea ceramica/ Trichoderma ceramicum</i></li> <li>• <i>Hypocrea estonica/ Trichoderma estonicum</i></li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Větev Chlorospora</b>     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Hypocrea aureoviridis/ Trichoderma aureoviride</i></li> <li>• <i>Hypocrea candida/ Trichoderma candidum</i></li> <li>• <i>Hypocrea chlorospora/ Trichoderma chlorosporum</i></li> <li>• <i>Hypocrea costaricensis</i></li> <li>• <i>Hypocrea cremea/ Trichoderma cremeum</i></li> <li>• <i>Hypocrea sinuosa/ Trichoderma sinuosum</i></li> <li>• <i>Hypocrea surrotunda/ Trichoderma surrotundum</i></li> <li>• <i>Hypocrea thelephoricola/ Trichoderma thelephoricolum</i></li> <li>• <i>Hypocrea virescentiflava</i></li> </ul> |
| <b>Větev Psychrophyla</b>    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Hypocrea megalosulphurea</i></li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>Větev Megalocitrina</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Hypocrea crystalligena</i></li> <li>• <i>Hypocrea psychrophila</i></li> <li>• <i>Hypocrea pulvinata</i></li> <li>• <i>Hypocrea sulfurea</i></li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <b>Větev Citrina</b>         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Hypocrea citrina</i></li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>Sekce "LONE LINEAGES"</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Větev Lutea</b>           | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Hypocrea lutea</i></li> <li>• <i>Hypocrea melanomagnum</i></li> <li>• <i>Trichoderma brevicompactum</i></li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

|                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Větev</b><br><b>"Lone lineages"</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Hypocrea chromosperma</i>/ <i>Trichoderma chromospermum</i></li> <li>• <i>Hypocrea gelatinosa</i>/ <i>Trichoderma gelatinosus</i></li> <li>• <i>Hypocrea nigrovirens</i></li> <li>• <i>Hypocrea phyllostachydis</i>/ <i>Trichoderma phyllostachydis</i></li> <li>• <i>Hypocrea sulawesensis</i></li> <li>• <i>Hypocrea voglmayrii</i></li> <li>• <i>Trichoderma helicum</i></li> <li>• <i>Trichoderma spirale</i></li> </ul> |
|----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

## 2.2 EKOLOGIE, GEOGRAFICKÉ ROZŠÍŘENÍ A DIVERZITA

Rod *Trichoderma* patří mezi půdní a dřevní houby s kosmopolitním rozšířením. Zástupce tohoto rodu lze nejčastěji nalézt v půdních ekosystémech, včetně opadu a dřevního materiálu. Způsobem výživy se řadí mezi saprotrofy a příležitostné parazity jiných hub. V potravním řetězci proto obvykle zaujímají roli sekundárních konzumentů, především dekompozitorů. Patří k velmi silným soupeřům v kompetičních vztazích, neboť jsou schopni se přizpůsobit rozmanitým podmínkám (substrátovým i teplotním), navíc jsou též schopni parazitovat a produkovat sekundární metabolity (extrolity) antifungální povahy (Klein a Eveleigh 1998).

Právě díky těmto vlastnostem a rychlému růstu patří v půdě k dominantním mikromycetům. Běžně se proto se zástupci rodu *Trichoderma* setkáváme v zemědělských půdách, lučních, stepních, i pouštních půdách; nejhojněji se však vyskytují v půdách lesních. Díky produkci celuláz optimálně využívají tlející organický materiál, především pak listový opad, bylinné zbytky, kůru, zbytky dřeva a jehličí (Domsch a kol. 2007).

Druhové zastoupení či biologická aktivita půdních společenstev závisí především na hodnotách fyzikálních a chemických faktorů prostředí. Parametry prostředí, jako je teplota, vlhkost půdy, atmosférický tlak, hodnota pH, obsah živin (popř. organické hmoty) a výskyt rostlinných druhů na daném substrátu patří ke klíčovým faktorům ovlivňujícím výskyt trichoderem (Klein a Eveleigh 1998). Výskyt jednotlivých druhů závisí na teplotě půdy především ve spojitosti s geografickým rozšířením. Pro teplé klimatické oblasti je charakteristický například výskyt druhu *T. ghanense*, jejíž nálezy pocházejí především z oblasti západního pobřeží Afriky. Chladnější klima naopak preferují druhy *T. polysporum* a *T. viride*. Vzhledem k tomu, že teplotní optimum druhu *Trichoderma viride* je okolo 16°C, setkáme se s ní spíše ve

vyšších nadmořských polohách (Samuels 2006). Vyskytuje se hojně i na území České republiky. Obecně lze říci, že zástupci rodu *Trichoderma* mají velmi široké teplotní spektrum. Dle Domsche a kol. (2007) nepřestává růst mycelia druhu *T. polysporum* ani při 0°C, příkladem z opačného konce teplotní škály je *T. koningii*, jejíž mycelium nepřestává růst ani při teplotě 40°C. Dochází zde pouze ke snížení metabolické aktivity resp. produkce sekundárních metabolitů a enzymů.

Vedle typického výskytu v opadu a půdě jsou v posledních letech zástupci rodu *Trichoderma* často spojováni s endofytickým způsobem života. *Trichoderma* bývá dokonce označována za jeden z nejhojnějších avirulentních endofytických rodů ve stonku dřevin, především *Herrannia sp.*, *Hevea spp.* či *Theobroma spp.* (Gazis a Chaverri 2010). K endofyticky žijícím druhům patří např. *T. stromaticum*, jež se jako endofytický druh kakaovníku (*Theobroma cacao*) vyskytuje v tropických pralesech Jižní Ameriky nebo *T. Amazoniím* izolovaná ze dřeva divokých i pěstovaných gumovníků (*Hevea brasiliensis* a *H. guianensis*) v peruánské části Amazonského pralesa (Chaverri a Gazis 2011).

Dalším významným faktorem ovlivňujícím výskyt zástupců rodu *Trichoderma* je vlhkost půdy resp. vodní potenciál (Dix a Webster 1995). Růst mycelia, tvorba spor i jejich klíčení bývají negativně ovlivňovány rostoucí negativní hodnotou potenciálu vody (Clarkson a kol. 2004). Většina trichoderem proto upřednostňuje nízký vodní potenciál půdy, optimálním místem růstu tak bývá vlhká půda či opad. I přesto se však najdou výjimky, je známo, že mycelium *T. viride* nezastavilo svůj růst ani při hodnotě vodního potenciálu -240 MPa (Domsch a kol. 2007).

Zástupci rodu *Trichoderma* inklinují spíše k výskytu na kyselém substrátu, tedy substrátu s nižší hodnotou pH. Optimální rozmezí pH je pro většinu druhů 3,5 - 5,6 (Papavizaz 1985). S hodnotou pH úzce souvisí hodnota koncentrace oxidu uhličitého. Oxid uhličitý ve spojitosti s vodou vytváří slabou kyselinu uhličitou, která velmi snadno disociuje na ionty  $H^+$  a  $HCO_3^-$ . Koncentrace takto vznikajících vodíkových iontů ovlivňuje rozpouštění solí v půdním roztoku a zvyšuje dostupnost těchto iontů trichodermám (Dix a Webster 1995).

Saprotrofní houby, mezi které *Trichoderma* patří, jsou schopny získávat uhlík ze širokého spektra zdrojů. Většina druhů vykazuje dobré růstové vlastnosti na médiích s jednoduchými sacharidy, jako jsou sacharóza, D-manóza, D-xylóza, D-galaktóza a D-fruktóza. Většina uhlíkatých sloučenin se však v půdě vyskytuje ve

formě polysacharidů, tedy složitých molekul s vysokou molekulární hmotností. S výjimkou ligninu jsou trichodermy schopny rozkládat většinu těchto polysacharidů. Díky sekreci specifických enzymů jsou proto schopny rozložit např. celulózu, škrob, chitin či pektin (Klein a Eveleigh 1998). Samuels (1996) dokonce uvádí, že jsou někteří zástupci tohoto rodu schopni rozkládat uhlovodíkové sloučeniny, jako jsou pesticidy obsahující chlor či alkoholy (např. metanol). Schopnost trichoderem degradovat různorodé zdroje uhlíku se odráží v jejich schopnosti kolonizovat široké spektrum stanovišť. Studie (Widden a Hsu 1987) též ukázala, že kvalita substrátu též ovlivňuje schopnost konkurence a druhové zastoupení na jednotlivých substrátech. Příkladem je např. zjištění, že druhy *T. polysporum* a *T. viride* jsou úspěšnějšími kolonizátory jehličnatého opadu, kdežto na listnatém opadu je převažujícím druhem *T. hamatum*.

Zástupci tohoto rodu nevykazují zvláštní potřeby na zdroje dusíku, obvyklým zdrojem bývá alanin, kyselina asparagová a kyselina glutamová. Při absenci těchto obvyklých zdrojů jsou však schopny rozložit i dusičnany či amoniak (Kubicek - Pranz 1998).

K otázce geografického rozšíření lze říci, že zástupci tohoto rodu se vyskytují takřka celosvětově. Bývají převažujícími druhy v půdních ekosystémech většiny geografických oblastí ve všech klimatických pásmech (Bissett 2011). Nicméně zatímco některé druhy jsou opravdu rozšířeny kosmopolitně (např. *Trichoderma harzianum*), existují též druhy, které jsou velmi úzce vázány na konkrétní geografické oblasti, a to především díky svým teplotním nárokům. Příkladem takového výskytu jsou např. *T. ghanense*, *T. stromaticum* pro teplé oblasti a *T. polysporum* s *T. viride*, které preferují chladnější lokality (viz výše).

Studie o taxonomii a biodiverzitě rodu *Trichoderma* byly dosud prováděny pro specifické větší či menší územní celky. Větší množství informací je známo především pro oblast Severní Ameriky a Evropy, jejichž druhové zastoupení je v současné době poměrně dobře prozkoumáno. Především některé oblasti Evropy byly studovány velmi detailně. Například Migheli a kol. (2003) studovali biologickou rozmanitost trichoderem na Sardinii. Součástí této práce bylo studium diverzity a analýza vlivu abiotických faktorů na rozšíření druhů. Meinke a kol. (2010) publikovali studii zabývající se výskytem trichoderem v rhizosféře čtyř odrůd a transgenních linií bramboru v Německu. Výsledkem práce bylo zjištění, že druhová distribuce závisí především na vlastnostech půdy, klimatu a postupech péče o brambory, nespočívá však

s pěstovanou odrůdou brambor. Právě studium diverzity a ekologie zástupců rodu *Trichoderma* v jednotlivých regionech či lokalitách často vede k objevu nových taxonů popř. dosud neznámých projevů chování některého ze známých druhů (Hoyos-Carvajal a Bissett 2011).

Kullnig a kol. (2000) při studiu 76 kmenů izolovaných z Ruska, Nepálu a severní Indie našli sedm již známých druhů (*T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. ghanense*, *T. hamatum*, *T. virens*, *T. oblongisporum* a *T. harzianum*). Právě *T. harzianum*, která představovala většinu získaných kmenů, zde klasifikují jako geneticky různorodý (blíže nespecifikovaný) druhový komplex (*T. harzianum* s. l.) vykazující metabolickou i morfologickou variabilitu. Vedle těchto druhů bylo nalezeno pět druhů pro vědu zcela neznámých. Sadfi-Zouaoui a kol. (2009) studovali v Tunisku čtyři různé bioklimatické zóny. Pozorovali zde genetickou rozmanitost druhů trichoderem a jejich vazbu na dané bioklimatické zóny. Dominantním druhem zde opět byla *T. harzianum* vykazující znaky dalšího rozdělení do šesti druhů *sensu stricto*. V lesní půdě severního Tuniska se hojněji vyskytovaly druhy *T. harzianum* a *T. longibrachiatum*, v lesních půdách středního Tuniska dominovaly *T. harzianum*, *T. saturnisporum* a *T. sp. indet.* V obhospodařovaných oblastech byly izolovány především *T. atroviride* a *T. hamatum*, v půdě oázy na jihu Tuniska byly přítomny druhy *T. harzianum* a *T. hamatum*. Biologickou rozmanitost a biogeografii hub na území Číny studovali Zhang a kol. (2005). Ze vzorků izolovaných ze čtyř různorodých regionů na území Číny byly získány následující druhy: *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. cerinum*, *T. citrinoviride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum*, *T. sinensis*, *T. velutinum*, *T. virens*, *T. viride* a dva zcela nové druhy. Výsledkem této studie bylo potvrzení severo-j jižního gradientu rozšíření druhu *Trichoderma harzianum* ve východní Asii, tzn. že mezi izoláty z odběrových míst na severu byl tento druh zcela dominantní, kdežto v jižní části studované oblasti se prakticky nevyskytoval.

Patrně neobsáhlejší výzkumem určité biogeografické oblasti bylo studium diverzity rodu *Trichoderma* v mírných zeměpisných šířkách Evropy (Jaklitsch 2009, 2011). Jaklitsch studoval 620 izolátů rodu *Hypocrea/Trichoderma* ze 14 evropských zemí pomocí tří genetických markerů. Identifikací bylo zjištěno 75 druhů, z toho 29 druhů zcela nových pro vědu. Právě díky této studii výrazně vzrostl počet druhů známých pro oblast střední a západní Evropy. Jaklitsch v této studii přichází s názorem, že většina druhů rodu *Hypocrea/Trichoderma* může být nekrotrofních na houbách kolonizujících dřevo a kůru. Z jeho pozorování též vyplývá, že většina

zástupců rodu *Trichoderma* (anamorfa) je schopna pohlavního procesu spojeného s tvorbou teleomorfního stádia a naopak malé množství druhů se rozmnožuje pouze nepohlavně (tzn. vytvářením klonů).

## 2.3 VÝZNAM PRO ČLOVĚKA

Rod *Trichoderma* patří k organismům produkujícím široké spektrum metabolitů využitelných člověkem v rozmanitých sférách života. Mezi tyto metabolity patří především látky s antimykotickými účinky (fenolické sloučeniny, viridofunginy, harzianopiridon), antibiotika (některé antrachinony, gliotoxin), regulátory rostlinného růstu (cyclonerodiol), antimikrobiální peptidy, více než 200 peptaibolů (Sivasithanparam a Ghisalberti 1998). Jednou z produkovaných látek je též viridiol (inhibitor fosfatidylinositol-3-kinázy a polo-like kinázy) s potenciálem možného použití ve farmaceutickém průmyslu jako látky s protinádorovými a imunomodulačními účinky (Supothina a kol. 2007).

Díky produkci některých metabolitů se zástupci rodu *Trichoderma* svým působením řadí mezi nekrotrofní parazity hub (produkcí svých toxinů a enzymů způsobí usmrcení hostitelské houbové buňky). Parazitické schopnosti jednotlivých druhů však nejsou shodné a projevují se nejčastěji dvěma způsoby. Většina zástupců při interakci pouze ovíjí hyfy hostitelské houby, aniž by pronikaly do buněk hostitele. Některé druhy (např. *T. viride* a *T. harzianum*) však produkují enzymy narušující buněčné stěny a umožňující proniknutí parazita do hyf hostitele. Produkované metabolity pak naruší buněčné stěny, čímž dojde k popraskání hyfových vláken, vzniku vakuol, koagulaci protoplazmy a posléze k celkové inhibici růstu (Dix a Webster 1995). Takto produkovanými enzymy bývají nejčastěji celulázy, endochitinázy, lipázy, amylázy,  $\beta$ -1,3-glukosidázy, DNázy a RNázy (Kubicek 2004). Např. *Trichoderma harzianum* produkuje  $\beta$ -1,3-glukanázu a chitinázu, které si shromažďuje ve vakuolách na koncích penetračních vláken. Uvolněním těchto enzymů dojde k narušení buněčné stěny hostitele, což umožní trichodermě vniknout přímo dovnitř hostitelské buňky (Dix a Webster 1995).

Právě díky této schopnosti dnes patří přípravky obsahující houbu *T. harzianum* k účinným prostředkům v boji s houbovými onemocněními rostlin. Používány jsou například v boji proti plísni šedé (*Botrytis cinerea*) na révě vinné a zelenině (Chet a Inbar 1997), dále k léčbě hniloby kořenů tabáku, která je způsobena společným

výskytem *Rhizoctonia solani* a *Fusarium solani* či k redukci výskytu černé hniloby (*Phytophthora parasitica*) na rajčatech, bramborech a tabáku. V komerčních přípravcích dostupných na trhu jsou vedle *T. harzianum* obsaženy též *T. koningii*, *T. hamatum*, *T. virens*, *T. polysporum* a *T. viride* (Nevalainen a Neethling 1998).

Hlavní komerční využití trichoderem souvisí též s produkcí výše zmíněných enzymů. *T. reesei*, jejíž klon (*T. reesei* QM6a) byl před více než třiceti lety speciálně vyšlechtěn pro biotechnologické využití (Niamke a Wang 2004), patří k nejvíce využívaným celulólytickým organismům na světě. Tento klon produkuje komplex enzymů s celulázovou aktivitou, které společným působením přeměňují celulózu na glukózové podjednotky. Celosvětově dosáhl prodej enzymů vyprodukovaných mikroorganismy do roku 2000 hodnoty 1,6 miliard amerických dolarů s ročním nárůstem 6,5 - 10% (Karmakar a Ray 2011). Právě celulózy (produkované především zástupci rodu *Trichoderma*, zejména sekce *Longibrachiatum*) tvoří přibližně 20% celosvětového obchodu s enzymy (Tramoy 2008). Celulózy mikrobiálního původu se používají především pro zpracování potravin, krmiv a biopaliv, také pro výrobu přípravků zlepšujících trávení u člověka. Využívají se i při výrobě pečiva, textilu, čisticích prostředků a papíroviny (Karmakar a Ray 2011). Vedle toho mají enzymy produkované některými druhy rodu *Trichoderma* degradační účinky. Využívají se proto k bioremediaci (proces, v němž jsou působením živých organismů či enzymů přeměňovány toxické či rizikové látky na netoxické a nerizikové látky). Tyto enzymy jsou schopné odstraňovat toxické látky s vysokou perzistencí v životním prostředí, např. těžké kovy (Akhatar a kol. 2009), pesticidy (Tang a kol. 2009) a kyanid (Ezzi a Lynch 2005).

Vybraní zástupci tohoto rodu bývají též v literatuře uváděni jako původci infekčních onemocnění člověka. Jedná se především o *T. longibrachiatum*, poměrně hojně rozšířený půdní druh (Druzhinina a kol. 2005). Kromě půdy byl zaznamenán zvýšený výskyt tohoto druhu ve vnitřním prostředí budov, jako jsou stavby poškozené zásahem vody (Thrane a kol. 2001). Právě díky této skutečnosti se spory druhu *T. longibrachiatum* běžně vyskytují ve sputu a vedlejší dutině nosní (*sinus ethmoidalis*) u zdravých osob bez zaznamenaných vlivů na zdraví pozorované osoby (Kredics a kol. 2003). Zástupci rodu *Trichoderma* způsobují nejčastěji horečky či bolesti břicha, ve vážnějších případech může následkem infekce dojít ke zneprůchodnění střeva. Tyto klinické projevy byly zaznamenány u pacientů léčených peritoneální dialýzou, imunosuprimovaných pacientů po transplantacích, pacientů trpících leukémií,

mozkovými abscesy a pacientů HIV pozitivních (Druzhinina a kol. 2008). Ojediněle byla *T. longibrachiatum* zaznamenána jako původce zánětu rohovky (keratitis) v subtropických zemích (Indie a Mali), zánětu vnějšího zvukovodu (*otitis externa*), pooperačního zánětu vnitřní výstelky srdeční (endokarditis) a onemocnění zvaného „pulmonary fungus ball“, které se projevuje vznikem rychle rostoucího útvaru v plicích připomínajícího aspergilom (Chouaki a kol. 2002).

## **2.4 HYPOCREA (TELEOMORFA RODU TRICHODERMA)**

### **2.4.1 Morfologie, ekologie a rozšíření**

Rod *Hypocrea* (Hypocreaceae, Hypocreales, Sordariomycetes, Ascomycota) je nejdůležitějším rodem představujícím pohlavní stadium rodu *Trichoderma*. Podstatně méně časté jsou teleomorfy z rodu *Sarawakus* či *Podostroma* (Kubicek 2004). Tento saprotrófní rod patřící mezi stromatické pyrenomycety (skupina hub charakteristická tvorbou stromatu) je významným dekompozitorem organického (přírodního i syntetického) materiálu (Klein a Eveleigh 1998). Zástupci tohoto rodu se obvykle vyskytují na rozkládajícím se dřevě, které jsou schopni rozložit díky produkci komplexu velice účinných lytických enzymů, jako jsou celulázy, hemicelulázy a chitinázy. Často lze také zástupce rodu *Hypocrea* nalézt i na jiných houbách, zvláště na starých plodnicích chorošů; dále využívají jako substrát i půdu či lesní opad. Nejčastěji se lze se zástupci rodu *Hypocrea* setkat ve vlhkých tropických a subtropických lesích. Není však nikterak obtížné nalézt některé druhy i v suchých lesích mírného pásu. Jejich geografické rozšíření bývá často kosmopolitní, je proto možné je zaznamenat od nejsevernějších po nejjižnější oblasti světa. Výjimkou k této skutečnosti je např. *H. semiorbis*, známá pouze z Nového Zélandu a Austrálie, nebo *H. placentula*, kterou lze nalézt pouze v severní Evropě a ve Velké Británii (Chaverri a Samuels 2003).

Pod lupou lze na povrchu substrátu pozorovat bílé až zeleně zbarvená stromata obsahující plodnice typu perithecia. Perithecia bývají obvykle zanořena do masitého stromatu tvořeného pseudoparenchymatickou tkání popř. velmi hustým systémem hyf. Uvnitř perithecií se vyvíjejí vřečka. Ta bývají cylindrická či kyjovitá, obvykle zúžená na bázi, nesená na krátké stopce. Uvnitř vřecek jsou dvoubuněčné askospory, které se rozpadají přímo ve vřecku na dvě buňky, takže zralé vřecko vypadá, jako by

obsahovalo 16 spor. Askospory bývají většinou hyalinní, žluté či zelené (Jaklitsch 2009).

Zástupci tohoto rodu mají velice úzké teplotní a vlhkostní optimum pro růst a vytváření plodnic. Teplota a vlhkost jsou proto nejvýznamnějším regulačním klimatickým faktorem pro vytváření stromatu s plodnicemi. Nálezy rodu *Hypocrea* obvykle pozitivně korelují s teplotou, avšak teplotní optimum obvykle nepřesahuje 30°C. Pro evropské území je typický výskyt druhu *Hypocrea minutispora* rostoucího především na dřevě. Ačkoli se s většinou zástupců rodu *Hypocrea* lze setkat v lese obvykle od měsíce července, pro tento druh je typický výskyt zpravidla již od dubna (Jaklitsch 2009).

Někteří zástupci rodu *Hypocrea* jsou významnými producenty sekundárních metabolitů a enzymů používaných v komerčních přípravcích proti bakteriím, houbám a některým toxinům. Produkované enzymy (např. celulózy, glukonázy či pektinázy) jsou významnými činiteli při výrobě bioethanolu a některých detergentů (Sivasithamparan a Ghisalberti 1998). Schopnost některých druhů růst při teplotách vyšších než 30°C (např. *H. orientalis*) umožňuje jejich působení ve funkci příležitostných patogenů u imunitně oslabených savců včetně člověka (Druzhinina a kol. 2006).

První moderní charakteristiku rodu *Hypocrea* vytvořila novozélandská mykoložka Dingleyová (Dingley 1952, 1957), jejímž největším přínosem bylo vyzvednutí důležitosti propojení zástupců rodu *Hypocrea* s jejich anamorfami. Navzdory skutečnosti, že většina dnes známých druhů (v současné chvíli čítá rod *Hypocrea* více než 200 druhů) byla popsána již v 19. a na počátku 20. století, podařilo se Dingleyové nalézt na Novém Zélandu několik druhů do té doby zcela neznámých.

Dosud poslední publikovaná studie mapující výskyt rodu *Hypocrea* na evropském území uvádí výskyt 75 druhů tohoto rodu, z toho 29 druhů zcela nových pro vědu. Je založena na 620 nálezech z území 14 evropských států v období roku 2003-2008 (Jaklitsch 2009, 2011).

V souvislosti s nejnovějším Mezinárodním kódem nomenklatury pro řasy, houby a rostliny z roku 2012 (<http://www.iapt-taxon.org/nomen/main.php>) se u hub s pleomorfním životním cyklem (zahrnujícím teleomorf i anamorf) začíná používat jen jedno rodové jméno. U hub rodu *Trichoderma/Hypocrea* se tato problematika právě řeší.

## 2.5 VÝVOJ POZNÁNÍ DRUHOVÉ DIVERZITY RODU *TRICHODERMA* V ZÁVISLOTI NA METODÁCH STUDIA

Rod *Trichoderma* byl popsán německým badatelem C. H. Persoonem v roce 1794; ten tento rod zařadil do skupiny hub břichatkovitých (Gasteromycetes). Persoon k tomuto rodu zařadil jen malý počet druhů, ze kterých dodnes zůstal do rodu *Trichoderma* zařazen pouze jediný, *Trichoderma viride* (Chaverri a Samuels 2003). První rozsáhlejší popis rodu *Trichoderma* vydal německý mykolog Harz (1871), v jehož práci je zdůrazněn význam mikroskopické charakteristiky, především tvaru fialid.

Vytvořením způsobu přesné druhové identifikace hub rodu *Trichoderma* se zabývali francouzští vědci Tulasne a Tulasne (Tulasne a Tulasne 1865), kteří jako první odhalili genetický vztah mezi *Hypocrea rufa* a *Trichoderma viride* a zjistili tak, že jde o jediný druh. Německý botanik a mykolog Brefeld (1891) posléze jejich teorii rozvinul a druh *Trichoderma viride* označil za nepohlavní stádium náležící právě k *Hypocrea rufa*. Bisby (1939) po prozkoumání velkého množství izolátů rodu *Trichoderma* dospěl k závěru, že se jedná o monotypický rod a redukoval druhy rodu *Trichoderma* na jediný druh - *T. viride*. Toto pojetí však vedlo k zavádějící druhové identifikaci, která je patrná ještě dnes (Hoyos-Carvajal a Bissett 2011). Dle současných diverzitních studií je naopak tento druh (*T. viride*) relativně vzácný. Jeho výskyt je v podstatě omezen na chladnější regiony Evropy a Severní Ameriky (Jaklitsch a kol. 2006).

Mezi první moderní charakteristiky rodu *Hypocrea* patří práce novozélandské mykoložky Dingleyové (Dingley 1952, 1957). Ta svůj popis zaměřila především na charakteristiku stromatu a zároveň provedla řadu pozorování se záměrem propojit druhy rodu *Hypocrea* s jejich anamorfami.

Významnou práci přinášející nový pohled na studium tohoto rodu publikoval roku 1969 indonéský vědec Rifai (Rifai 1969). Jeho „A revision of the genus *Trichoderma*“ je uceleným vymezením rodu *Trichoderma*. Rifai popsal devět druhových agregátů (*T. aureoviride*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum*, *T. piluliferum*, *T. polysporum*, *T. pseudokoningii* a *T. viride*) založených na studiu mikroskopických znaků, především větvení konidioforů a morfologii konidií. Spolu s výrazem druhový agregát přichází Rifai s teorií, že se pravděpodobně jedná o souhrnné druhy, které mohou zahrnovat několik druhů

nerozlišitelných dle morfologických znaků. Tato práce se stala významným podkladem pro následná studia tohoto rodu a bývá uváděna jako první monografická studie rodu *Trichoderma*.

K nejvýznamnějším studiím rodu *Trichoderma* patří též série prací kanadského mykologa Bissetta (Bissett 1984, 1991a, 1991b, 1991c, Gams a Bissett 1998) z konce 20. století. Bissett významně zvýšil počet druhů rozlišitelných dle morfologických znaků a odhalil spojení mezi anamorfou a teleomorfou pro velké množství druhů. Bissett též rozřadil jednotlivé druhy na základě větvení konidioforů a morfologie fialid a spor do pěti sekcí: *Hypocreanum*, *Longibrachiatum*, *Pachybasium*, *Saturnisporum* a *Trichoderma*.

Širší studium rodu *Hypocrea/Trichoderma* (např. Chaverri a Samuels 2003, Jaklitsch 2009) však ukázalo, že morfologické znaky nejsou spolehlivým ukazatelem míry genetické druhové divergence a proto nemohou být považovány za dostačující studovaný parametr pro přesnou druhovou identifikaci (Hoyos-Carvalaj a Bissett 2011).

V souvislosti s rozvojem znalostí na úrovni molekulární biologie zaznamenalo studium rodu *Trichoderma* od konce minulého století velký rozvoj, v současnosti patří rod *Trichoderma* k molekulárně nejprostudovanějším houbám. První molekulární charakteristiky byly založeny na studiu genových sekvencí pro ITS oblasti (Lieckfeldt a kol. 1998). S rozvojem nových metodických postupů došlo k rozšíření studia na genové sekvence 18S a 28S RNA, translační elongační faktor 1-alfa, endochitinázy (Lieckfeldt a kol. 2000), RNA polymerázy II podjednotky B2 (rbp2) (Chaverri a kol. 2003) či calmodulin (Samuels a kol. 2006). Na základě těchto studií došli Samuels a kol. (2006) k závěru, že jednotlivé sekce uváděné Bissettem (1991a), zejména sekce *Pachybasium*, jsou fylogeneticky heterogenní. Druzhinina a kol. (2006) se ve své práci zabývají především moderním pojetím rozpoznávání a klasifikace zástupců rodu *Trichoderma* a upozorňují na významnost tohoto rodu v biotechnologickém využití. Zavedení druhového určení pomocí molekulárních markerů mělo za následek výrazný nárůst počtu druhů patřících k rodu *Trichoderma*. V roce 2006 přesáhl počet druhů tohoto rodu charakterizovaných molekulárně hodnotu 100. V současné době je na internetových stránkách mezinárodní subkomise ISTH (International Subcomission on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy) uvedeno celkem 104 druhů (Druzhinina a Kopchinskiy 2013). Aktuální počet druhově specifikovaných sekvencí náležících k rodu *Trichoderma* uložených v GenBank je 116, dalších 879 sekvencí bez

druhového určení se v této databázi nachází pod označením *Trichoderma* sp. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=29859>).

## 2.6 METODY POUŽÍVANÉ PRO DRUHOVOU IDENTIFIKACI

### 2.6.1 Morfologická analýza

Izoláty rodu *Trichoderma* lze v laboratorních podmínkách poměrně snadno kultivovat (Domsch a kol. 2007). Volba vhodného kultivačního média pro morfologické pozorování proto často závisí na dostupném či obvykle používaném médiu na daném pracovišti. Doporučovaná média jsou např. agar se sladovým extraktem (MEA), bramboro-dextrózový agar (PDA) či syntetický živný agar (SNA) (Samson a kol. 2010).

Obecně však platí, že chudší média, jako je například agar se sladovým extraktem (MEA), bývají vhodnou volbou při potřebě pozorování složitého větvení konidioforů a konidií. Média bohatší na živiny se obvykle volí při monitorování množství produkovaných pigmentů a též v případě potřeby nárůstu většího množství mycelia pro izolaci DNA (Bissett 1984, 1991 a, b, c). Odběr materiálu pro pozorování konidioforů se provádí z okraje pustulu při prvním náznaku sporulace, což obvykle odpovídá 4 - 7 dnům inkubace. Sledování morfologických znaků konidií a měření jejich velikosti bývá optimální po přibližně 14 dnech inkubace (Gams a Bissett 1998). Identifikaci druhů dle morfologických znaků lze získat pouze přibližné určení (viz výše). Jednotlivé sekce rodu *Trichoderma* však vykazují odlišné morfologické vlastnosti a proto lze kmeny pomocí morfologického určení rozřadit do skupin usnadňujících následné druhové určení. Nejobsáhlejším internetovým klíčem založeným na fenotypových znacích je určovací klíč *Trichoderma* Online sestavený mezinárodním týmem pod vedením amerického mykologa G. J. Samuelse. Určovacími znaky v tomto klíči jsou charakter konidioforů, fialid, konidií, přítomnost chlamydospor a charakteristický nárůst kolonií na různých kultivačních médiích a při různých teplotách (Samuels a kol. 2013). Klíč obsahuje 33 druhů.

### 2.6.2 Molekulární analýza

Molekulární charakteristiky založené na studiu genových sekvencí pro ITS oblasti (Lieckfeldt a kol. 1998) se v současné době ukazují jako nedostačující pro identifikaci všech známých druhů rodu *Trichoderma*. Kopchinskiy a kol. (2005) zjistili, že druhová identifikace na základě pořadí bazí oblasti ITS pomocí aplikace BLAST může poskytovat zavádějící informace. Uvádějí, že sama o sobě není ITS oblast dostatečně informativní pro rozlišení blízce příbuzných druhů, především druhů kryptických.

Bylo zkoumáno velké množství genů se záměrem najít nejspolehlivější způsob druhové identifikace. V současné době patří k nejpoužívanějším genům translační elongační faktor 1- $\alpha$  (*tef1 $\alpha$* ), RNA polymeráza II podjednotky B2 (*rpb2*), chitináza 18-5 (*ECH42*), calmodulin 1 (*CALM1*), actin,  $\beta$ -tubulin (*TUBB2*), LAS1 jaderný protein a ATP citrátlyáza podjednotky A (*ACLA*) používaná především pro multi-genové studie. Přehled zásadních publikací studujících širší výběr druhů rodu *Trichoderma* pomocí genové sekvence (ITS, *tef1*, *rpb2*, *calm1*, *ech42*) je uveden v Tab. 2.

Významným zjednodušením a zpřístupněním druhové identifikace byl zejména vznik určovacího klíče TrichOKEY (Druzhinina a kol. 2005). Tento klíč založený na tzv. „bar-code“ systému využívá sekvence ITS1 a 2. Tyto oligonukleotidové oblasti fungují jako genetické otisky prstů specifické pro jednotlivé druhy. Klíč je přístupný na internetových stránkách [www.isth.info](http://www.isth.info). Na stejném serveru je přístupná i aplikace TrichoBLAST založená na hledání podobnosti v genech *tef1* a *rbp2* (Kopchinskiy a kol. 2005). Spojením těchto určovacích postupů se podařilo vyvinout program TrichoMARK sloužící k detekci jednoho či více fragmentů těchto genů jako fylogenetických markerů. Díky tomu je tento program schopen rozlišit 5 skupin druhových komplexů s identickými ITS 1 a 2 sekvencemi. Jsou to následující druhy: *T. tomentosum* / *T. cerinum*, *T. longipile* / *T. crassum*, *T. koningii* / *T. ovalisporum* / *T. muroiana*, *H. lutea* / *T. harzianum*.

Mezinárodní subkomise ISTH (International Subcomission on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy) věnuje pozornost studium taxonomie rodu *Trichoderma*/*Hypocrea* s cílem zdokonalit druhovou identifikaci a zřídit celosvětovou databázi izolátů, která by přispěla k poznání diverzity tohoto rodu. ISTH vydává publikace, pořádá konference a kurzy zaměřené na studium rodu *Trichoderma*/*Hypocrea*. Subkomise sdružuje nejvýznamnější vědce zabývající se studiem rodu

*Trichoderma/Hypocrea*. Na internetových stránkách [www.isth.info](http://www.isth.info) jsou také přehledy používaných sekvencí a protokoly potřebné pro sekvenování genů používaných k druhové identifikaci.

Mezi členy ISTH patří mimo jiné G. Samuels pracující na United States Department of Agriculture v Baltimore (USA), P. Chaverri z Department of Plant Sciences and Landscape Architecture na univerzitě v Maryland (USA), I. Druzhinina a Ch. Kubicek působící na vídeňské Univerzitě technologií a chemického inženýrství, W. Gams z Fungal Biodiversity Centre Utrecht v Nizozemí či kanadský mykolog J. Bissett působící na Eastern Cereal and Oilseed Research Centre Agriculture Canada v Ottawě.

Tab. 2: Přehled zásadních publikací studujících širší výběr druhů rodu *Trichoderma* pomocí genové sekvence (ITS, tef1, rpb2, calm1, ech 42)

| <b>CITACE PUBLIKACE</b>     | <b>POUŽITÁ GENOVÁ SEKVENCE</b> |
|-----------------------------|--------------------------------|
| Bulat a kol. (1998)         | ITS                            |
| Lübeck a kol. (2000)        | ITS                            |
| Lieckfeldt a Seifert (2000) | ITS                            |
| Thrane a kol. (2001)        | ITS                            |
| Samuels a kol. (2002)       | ITS, tef1                      |
| Chaverri a kol. (2003)      | tef1, rpb2                     |
| Chaverri a Samuels (2003)   | tef1, rpb2                     |
| Druzhinina a kol. (2005)    | ITS, tef1                      |
| Zhang a kol. (2005)         | ITS, tef1                      |
| Druzhinina a kol. (2006)    | ITS, tef1, rpb2                |
| Samuels (2006)              | ITS, tef1                      |
| Tondje a kol. (2007)        | tef1                           |
| Jaklitsch a kol. (2008)     | ITS, tef1, rpb2, ech 42, calm1 |
| Kubicek a kol. (2008)       | ITS, tef1                      |
| Jaklitsch (2009)            | ITS, tef1, rpb2                |
| Meincke a kol. (2010)       | ITS                            |
| Respinis a kol. (2010)      | ITS, tef1                      |
| Friedl a Druzhinina (2011)  | ITS                            |
| Jaklitsch (2011)            | ITS, tef1, rpb2                |
| Xia a kol. (2011)           | ITS, tef1                      |
| Consolo a kol. (2012)       | ITS                            |
| Druzhinina a kol. (2012)    | tef1, calm1, ech 42            |
| Samuels a kol. (2012)       | rpb2, calm1, ech 42            |
| Kim a kol. (2013)           | ITS, tef1, rpb2, ech 42, calm1 |

## 2.7 VÝSKYT ZÁSTUPCŮ RODU *TRICHODERMA* NA ÚZEMÍ ČESKÉ REPUBLIKY

Ucelený přehled výskytu nálezů jednotlivých druhů rodu *Trichoderma* z území České republiky nebyl dosud publikován. Zástupci tohoto rodu byli jen součástí přehledu nálezů půdních mikromycetů z území České republiky (včetně bývalého Československa), zahrnujícího práce publikované mezi lety 1933 a 2011 (Nováková a kol. 2012). V tomto přehledu je uváděno 20 druhů, a to *T. atroviride*, *T. aureoviride*, *T. citrinoviride*, *T. fertile*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. koningiopsis*, *T. longibrachiatum*, *T. minutisporum*, *T. oblongisporum*, *T. piluliferum*, *T. polysporum*, *T. pseudokoningii*, *T. saturnisporum*, *T. tomentosum*, *T. virens*, *T. viride*, *T. viridescens* a *Trichoderma* sp. (anamorfa od *Hypocrea stellata*). Je však nutné uvést, že druhy *T. citrinoviride*, *T. minutisporum*, *T. oblongisporum*, *T. piluliferum* a *T. tomentosum* byly identifikovány pouze dle fenotypových znaků (bez použití sekvence DNA), takže správnost druhového označení není jistá.

V bakalářské práci s názvem Mikroskopické houby rodu *Trichoderma* (Ptáčníková 2010) uvádí autorka výskyt 19 druhů tohoto rodu z území České republiky. Tato práce vznikla excerpací 72 prací publikovaných v letech 1823 - 2010. Zpracovávanými publikacemi byly však pouze publikované zdroje. Nejsou zde tedy zahrnuty druhy uváděné v rukopisných pracích, tj. bakalářských, magisterských či postgraduálních pracích a různých závěrečných zprávách.

Ptáčníková (2010) uvádí výskyt druhů rodu *Trichoderma* ze všech geografických oblastí naší republiky, a to z různých substrátů, především však z půdy a opadu. Nejvíce údajů o výskytu je uvedeno u druhu *Trichoderma viride*, jenž byl zaznamenán na 61 lokalitách, nejčastěji v půdě. Dalšími často zjištěnými druhy jsou *Trichoderma koningii*, *Trichoderma harzianum* a *Trichoderma hamatum*. Méně údajů je například o výskytu druhů *T.*, *T.*, *T. oblongisporum*, *T. piluliferum*, *T. tomentosum*, *T. saturnisporum* či *T. aggressivum* f. *europaeum*. Z publikovaných údajů nicméně nelze činit jednoznačné závěry o příslušnosti jednotlivých nálezů/izolátů k danému druhu, neboť většina izolátů byla identifikována pouze dle fenotypových znaků, a to většinou v době, kdy bylo známo jen 9-30 druhů rodu *Trichoderma*. Jedinými molekulárně potvrzenými druhy z tohoto souboru jsou *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* pocházející z pěstíren žampionů v Kovářově-Předbořicích (Kubátová a kol. 2009), *T. atroviride*, *T. fertile*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. koningiopsis* a *T.*

*virens* získané ze zasolených stanovišť NPR SOOS (Hujšlová 2006, Hujšlová a kol. 2010). Molekulárně genetickými metodami potvrzené v publikacích českých autorů jsou dále druhy *T. harzianum* a *T. viridescens* uváděné Bukovskou a kol. (2010) ze substrátu výsypky uhelného dolu z oblasti severních Čech. Tato práce byla publikována později než práce Ptáčnicková 2010 a zjištěné druhy proto nejsou zahrnuty mezi publikovanými nálezy rodu *Trichoderma* z území České republiky.

Dalším úskalím je skutečné rozšíření zástupců rodu *Trichoderma* u nás, publikované nálezy totiž vypovídají spíše o intenzitě studia určitých substrátů či lokalit. Protože se největší část excerpovaných prací zabývala studiem půdních mikromycetů, je logické, že nejvíce nálezů pochází z půdy.

Jedinými dosud publikovanými zahraničními pracemi zaměřenými na rod *Trichoderma/Hypocrea* a částečně pokrývajícími po též území České republiky je Jaklitsch (2009 a 2011). Tyto studie mapují výskyt rodu *Trichoderma* a *Hypocrea* na evropském území a uvádějí výskyt 75 druhů tohoto rodu, z toho 29 druhů zcela nových pro vědu. Jsou založeny na 620 nálezech z území 14 evropských států (včetně území České republiky) v období roku 2003-2008. Publikace studující izoláty převážně z dřevního substrátu obsahuje 15 druhů. Přehled nalezených druhů, lokality odběru a substrát, ze kterého byly tyto druhy izolovány, jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3: Jaklitsch (2009, 2011): nálezy zástupců rodu *Trichoderma* z území České republiky

| DRUH                       | LOKALITA                                                                                                   | SUBSTRÁT                                                |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| <i>T. citrinoviride</i>    | <b>J Morava</b> (Valtice)                                                                                  | kůra větve <i>Quercus petraea</i>                       |
| <i>T. dacrymycelum</i>     | <b>Stř. Čechy</b> (Mnichovice u Prahy)                                                                     | pařez <i>Picea abies</i>                                |
| <i>T. lacteum</i>          | <b>Českosaské Švýcarsko</b> (Mezní Louka)                                                                  | kůra větve <i>Picea abies</i>                           |
| <i>T. minutisporum</i>     | <b>Českosaské Švýcarsko</b> (Mezní Louka),<br><b>J Čechy</b> (Záhvozdí, Boubínský prales, Žofínský prales) | větve <i>Fagus sylvatica</i>                            |
| <i>T. moravicum</i>        | <b>S Morava</b> (Hranice na Moravě)                                                                        | rozkládající se dřevo <i>Fagus sylvatica</i>            |
| <i>T. pachypallidum</i>    | <b>J Čechy</b> (Boubínský prales)                                                                          | vlhká kůra <i>Fagus sylvatica</i>                       |
| <i>T. polysporum</i>       | <b>J Čechy</b> (Boubínský prales)                                                                          | poleno (bez kůry) <i>Alnus glutinosa</i> ležící ve vodě |
| <i>T. silvae-virgineae</i> | <b>J Čechy</b> (Záhvozdí, Černý les)                                                                       | větev <i>Fagus sylvatica</i>                            |

|                                   |                                                                             |                                                                                                         |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>T. sinuosum</i>                | <b>V Čechy</b> (Čížov)                                                      | kmen <i>Carpinus betulus</i>                                                                            |
| <i>T. sp. (H. parapilulifera)</i> | <b>J Čechy</b> (Boubínský prales)                                           | větve <i>Fagus sylvatica</i> bez kůry                                                                   |
| <i>T. sp. (H. protopulvinata)</i> | <b>J Čechy</b> (Žofínský prales)                                            | na <i>Fomitopsis pinicola</i>                                                                           |
| <i>T. sp. (H. pulvinata)</i>      | <b>J Čechy</b> (Stráž nad Nežárkou)                                         | na <i>Fomitopsis pinicola</i> rostoucí na <i>Picea abies</i>                                            |
| <i>T. strictipile</i>             | <b>Českosaské Švýcarsko</b> (Mezní Louka),<br><b>J Čechy</b> (Pohorská Ves) | větve <i>Fagus sylvatica</i> bez kůry, vlhké dřevo <i>Betula pendula</i> , větve <i>Alnus glutinosa</i> |
| <i>T. viride</i>                  | <b>J Čechy</b> (Frymburk)                                                   | klády <i>Pinus sylvestris</i> částečně bez kůry                                                         |
| <i>T. viridescens</i>             | <b>ČR</b> (nespecifikováno)                                                 | neuvedeno                                                                                               |

Dle údajů zjištěných ke dni 2. 5. 2013 je v našich největších sbírkách kultur hub (tj. CCF v Praze, CMF ISB v Českých Budějovicích, CCM v Brně a CPPF v Praze) uchováváno 86 izolátů náležících k 14 druhům rodu *Trichoderma*, z toho 12 pocházejících z území České republiky.

### 3 MATERIÁL A METODIKA

#### 3.1 STUDOVANÉ IZOLÁTY HUB RODU *TRICHODERMA*

Izoláty hub rodu *Trichoderma* využitě pro diplomovou práci pocházejí ze Sbírky kultur hub katedry botaniky (CCF), ze studijní sbírky mikromycetů Dr. Aleny Kubátové a z vlastních izolací. Kmeny A. Kubátové byly izolovány v období říjen 1989 až září 2011. Vlastní izoláty jsem odebírala v období září 2009 až březen 2012. Celkem jsem zpracovala 196 izolátů patřících k rodu *Trichoderma*. Z toho 30 izolátů pocházelo ze sbírky CCF, 196 izolátů ze studijní sbírky A. Kubátové a 43 izolátů jsem získala vlastním zpracováním odběrových vzorků.

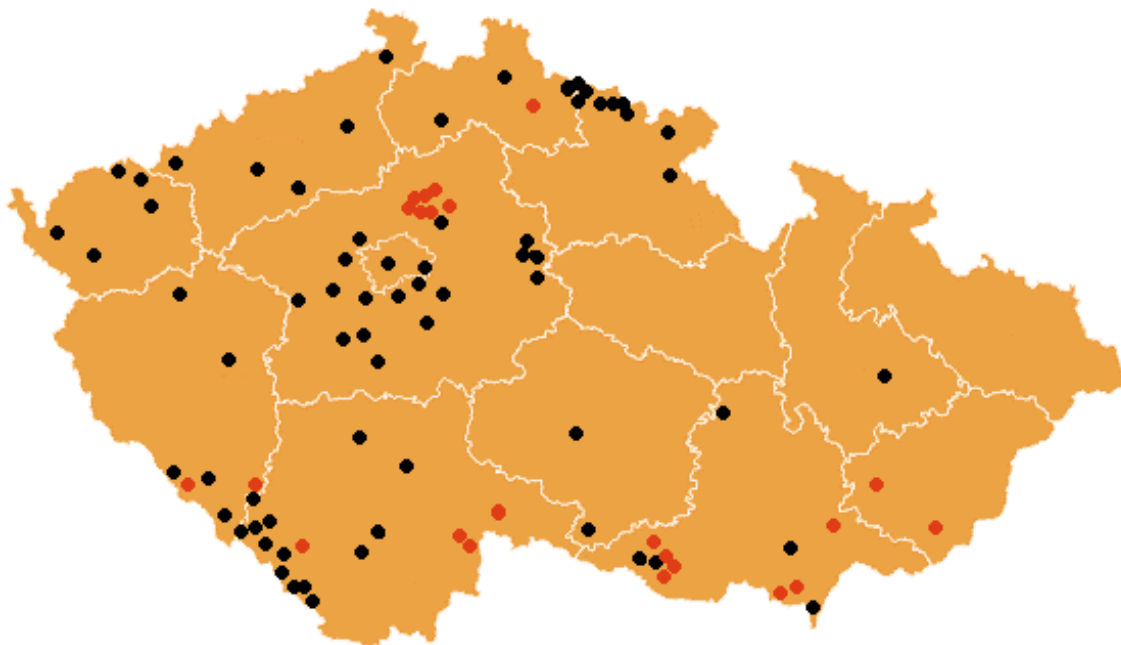
Vzhledem k tomu, že rod *Trichoderma* patří k významným zástupcům půdních hub a dekompozitorům listového opadu, nejhojněji zastoupeným substrátem je právě půda a listový opad. Dalšími zastoupenými substráty jsou například rozkládající se dřevo, půdní krusty či ovzduší jako prostředí, kterým se spory těchto hub mohou šířit. Spíše raritními jsou pak zástupci izolovaní endofyti dřevin či z komerčně prodávaných výrobků, jako jsou krémy a nápoje. Přehled lokalit a substrátů, z nichž studované izoláty hub rodu *Trichoderma* pocházejí, je uveden v Tab. 15 v kapitole Přílohy.

#### 3.2 LOKALITY

Studované izoláty pocházejí z celého území České republiky. Nadmořská výška lokalit se pohybuje v rozmezí 40 až 1550 m n. m. Protože byla většina izolátů sebraných A. Kubátovou získána při studiu celkové diverzity mikromycetů konkrétních oblastí a nikoli za účelem studia diverzity na území ČR, nebyla některá větší území (a zároveň i substráty) mezi sbírkovými izoláty zastoupena. Pro postižení širší diverzity rodu *Trichoderma* na území České republiky jsem se proto rozhodla rozšířit množství studovaných lokalit a spektrum substrátů o ty, které měly v dostupném materiálu velmi malé nebo žádné zastoupení. Vytypované lokality jsem posléze navštívila a odebrala zde vzorky. GPS lokace, typ biotopu a substrátu, doba odběru a nadmořská výška jednotlivých odběrových míst je uvedena v Tabulce 4. Lokality všech odběrových míst jednotlivých izolátů jsou uvedeny na Obr. 2.

Tab. 4: Lokality odběru vzorků opadu a půdy

| Lokalita       | Doba odběru | GPS souřadnice           | Nadmoř. výška (m n. m.) | Typ biotopu      | Typ substrátu | Izolované kmeny |
|----------------|-------------|--------------------------|-------------------------|------------------|---------------|-----------------|
| Úpor           | III 2012    | 50°18'53"N<br>14°28'13"E | 152                     | lužní les        | opad          | T36             |
| Dušníky        | III 2012    | 50°18'38"N<br>14°27'56"E | 155                     | pole (řepkové)   | půda          | T22             |
| Ždanický les 1 | III 2012    | 49°7'36"N<br>17°4'31"E   | 355                     | dubohabřina      | opad          | T15, T27, T41   |
| Ždanický les 2 | III 2012    | 49°6'3"N<br>17°3'58"E    | 410                     | dubohabřina      | opad          | T26, T33, T34   |
| Ždanický les 3 | III 2012    | 49°5'58"N<br>17°3'9"E    | 400                     | dubohabřina      | opad          | T23, T24        |
| Kurdějov       | III 2012    | 48°57'20"N<br>16°46'48"E | 315                     | doubrava         | opad          | T42             |
| Boleradice     | III 2012    | 48°57'48"N<br>16°48'16"E | 250                     | pole (obilí)     | půda          | T16             |
| Pálava 1       | III 2012    | 48°50'30"N<br>16°40'26"E | 250                     | dubohabřina      | opad          | T25             |
| Pálava 2       | III 2012    | 48°49'44"N<br>16°39'59"E | 305                     | dubohabřina      | opad          | T18, T20        |
| Konice         | III 2012    | 48°50'15"N<br>16°1'29"E  | 300                     | doubrava         | opad          | T17, T28        |
| Kraví hora 1   | III 2012    | 48°50'36"N<br>16°2'7"E   | 320                     | vřesoviště       | půda          | T31, T43        |
| Kraví hora 2   | III 2012    | 48°50'49"N<br>16°2'30"E  | 290                     | vřesoviště       | půda          | T19, T35        |
| Zálesí 1       | III 2012    | 48°58'3"N<br>15°47'19"E  | 430                     | olšina           | opad          | T21, T30        |
| Zálesí 2       | III 2012    | 48°58'13"N<br>15°47'5"E  | 435                     | olšina           | opad          | T29, T32        |
| Mirochov       | III 2012    | 49°0'8"N<br>14°57'1"E    | 420                     | olšina           | opad          | T46             |
| Annín          | III 2012    | 49°10'25"N<br>13°31'8"E  | 510                     | bučina           | opad          | T38, T39        |
| Mlčechvosty    | III 2012    | 50°19'17"N<br>14°20'31"E | 185                     | pole (kukuřičné) | půda          | T44             |
| Staňkov        | III 2012    | 48°59'24"N<br>14°58'13"E | 490                     | olšina           | opad          | T37             |
| Nuzerov        | III 2012    | 49°11'24"N<br>13°29'8"E  | 500                     | bučina           | opad          | T45             |
| Milešice       | III 2012    | 48°58'46"N<br>13°53'24"E | 750                     | bučina           | opad          | T40             |

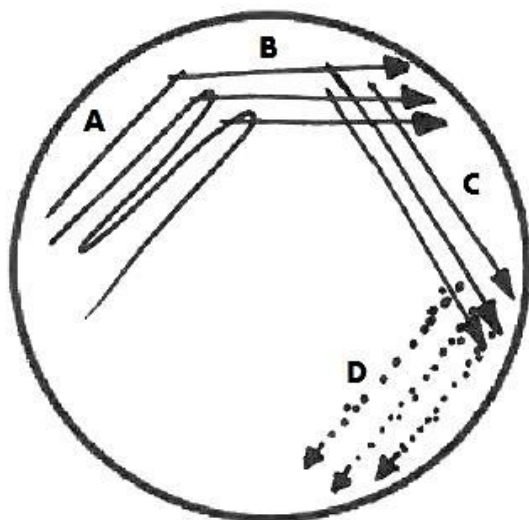


Obr. 2: Lokality odběrových míst jednotlivých izolátů (Odběrové lokality izolátů A. Kubátové jsou označeny černě, vlastní odběry červeně).

### 3.3 METODIKA

#### 3.3.1 Revitalizace sbírkových kmenů

Starší izoláty ze studijní sbírky A. Kubátové uchovávané v zkumavkách na PCA médiu při cca 5-7 °C byly přečištěny pomocí monosporické izolace roztíráním kličkou. Postupovala jsem dle obr. 2. Sterilní kličkou jsem nabrala kulturu a několika tahy ji rozetřela po agaru při okraji misky (oblast A). Znovu opálenou jsem rozetřela okraj prvního roztěru na prázdnou plochu agarové půdy (oblast B). Tento postup jsem poté zopakovala ještě dvakrát (oblast C, D). V posledním úseku roztěru došlo již k nárůstu jednotlivých kolonií, které jsem odizolovala na Petriho misku s PDA.



Obr. 3: Postup pohybu kličky při monosporické izolaci.

### 3.3.2 Odběry a zpracování vlastních vzorků

Na každé lokalitě (viz výše) jsem provedla 3 odběry. Odebírala jsem cca 200-300 g substrátu a pomocí kovové lopatky (sterilizované lihem mezi jednotlivými odběry) jsem jej ukládala do čistých polyethylenových sáčků. Sáčky jsem okamžitě po odběru označila štítkem s číslem odběru. Vzorky jsem skladovala při cca 5°C a do 72 hodin zpracovala. Pro izolaci druhů rodu *Trichoderma* v jednotlivých odběrech jsem zvolila zředovací metodu. Sterilně jsem odebrala 1g materiálu, vložila jej do baňky se 100 ml sterilní destilované vody a desetkrát ředila. 0,5ml této suspenze jsem poté napipetovala na každou ze tří Petriho misek s médiem SL2 (připravováno podle Fassatiové 1979). Petriho misky byly inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 5-7 dní. Kolonie náležející k rodu *Trichoderma* jsem následně sterilní jehlou pod binokulární lupou (Leica EZ4) inokulovala na Petriho misku obsahující SL2. Po nárůstu této kolonie jsem provedla monosporickou izolaci (viz výše), přiřadila jsem kmenu číselnou zkratku a přeočkovala do zkumavek se šikmým agarem (PCA) (připravováno podle Fassatiové 1979) pro dlouhodobější uchování v lednici.

Celkem bylo odebráno a zpracováno 60 vzorků z 20 lokalit a získáno 32 izolátů rodu *Trichoderma* (viz Tab. 4)

### 3.4 MORFOLOGICKÉ HODNOCENÍ IZOLÁTŮ

Pro identifikaci izolovaných kmenů rodu *Trichoderma* či zařazení k určitému morfotypu jsem použila následující mikroskopické morfologické znaky: vzhled a větvení konidioforů, výskyt fertálních a sterilních vláken na koncích konidioforů, velikost, tvar, ornamentaci a pigmentaci konidií a přítomnost chlamydospor. Pro doplnění údajů potřebných ke správnému určení jsem dále měřila nárůst kolonie na PDA a SNA při 35°C za 72 hodin a zaznamenávala přítomnost/absenci silného (kokosového) oděru.

Mikroskopické preparáty jsem připravila pomocí Melzerova činidla a kyseliny mléčné obarvené bavlnovou modří. Mikroskopické pozorování preparátů jsem prováděla na světelném mikroskopu Olympus BX51 vybaveném digitálním fotoaparátem Olympus E-510, či později digitální kamerou Olympus DP72. K pořízení fotodokumentace a měření velikosti spor jsem použila počítačový program QuickPHOTO MICRO Pro 2.3.

Jako hlavní identifikační nástroj jsem použila internetový klíč *Trichoderma* Online (Samuels a kol. 2013). Správnost tohoto určení jsem konfrontovala s charakteristikou jednotlivých druhů v publikacích Gams a Bissett (1998), Bissett (1984, 1991a, 1991b, 1991c) a Jaklitsch (2009, 2011).

### 3.5 MOLEKULÁRNĚ TAXONOMICKÁ ANALÝZA

Vzhledem k velkému počtu morfologicky velmi podobných kmenů jsem zvolila metodu UP-PCR fingerprinting pro rozlišení geneticky homogenních skupin zahrnujících kmeny se stejným či velmi podobným UP-PCR fingerprintem.

Vybrané zástupce z každé skupiny jsem osekvenovala. Jako studovanou oblast jsem zvolila úsek rDNA kódující gen pro translační elongační faktor 1 $\alpha$  (tef1). Tato oblast patří (vedle ITS-rDNA) u rodu *Trichoderma* k hlavním sekvenovaným úsekům a existuje pro ni poměrně obsáhlá databáze referenčních sekvencí. Zařazení sekvencí jsem prováděla pomocí programu BLAST a databáze sekvencí GenBank. Za totožný jsem považovala takový referenční druh, který měl 98-100% podobnosti v tef1 - oblasti. Všechny výsledky získané pomocí databáze GenBank jsem posléze

konfrontovala s databází TrichoBLAST (Kopchinskiy a kol. 2005) přístupné na internetovém serveru [www.isth.info](http://www.isth.info).

V případech, kdy se nepodařilo taxonomické zařazení do druhu dle *tefl*, jsem zvolila analýzu oblasti ITS-rDNA. Takto získané sekvence byly opět zařazeny pomocí programu BLAST a databáze Genbank. Správnost zařazení jsem vždy zkontrolovala porovnáním s internetovým klíčem TrichOKEY (Druzhinina a kol. 2005) založeným na ITS sekvencích. Tento klíč je dostupný na serveru [www.isth.info](http://www.isth.info).

Shodné, popř. nejpodobnější sekvence jsem vždy editovala spolu se sekvencí určovaného izolátu v programu BioEdit (Hall 1999).

### **3.5.1 Izolace DNA**

DNA jsem izolovala z 5-7 dní starých kultur pomocí komerční izolační sady ArchivePure DNA Purification System (5 PRIME GmbH) postupem shodným s návodem dodaným od výrobce. Kontrolu čistoty a koncentrace získané DNA jsem prováděla na spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

### **3.5.2 UP-PCR fingerprinting**

Z primerů uváděných na [www.isth.info](http://www.isth.info) jako vhodných pro tuto metodu jsem zvolila šest primerů, se kterými jsem zkušebně zamplifikovala 3 kmeny náležící k různým morfortypům. Jednalo se o primery L15 (5'GAGGGTGGCGGTTCT3'), L21 (5'GGATCCGAGGGTGCGGTTCT3'), L45 (5'GTAAAACGACGGCCAGT3'), AS4 (5'TGTGGGCGCTCGACAC3'), AS15 (5'GGCTAAGCGGTCGTTAC3') a AA2M2 (5'CTGCGACCCAGAGCGG3'). Z těchto primerů jsem posléze vybrala dva, které poskytovaly nejvyšší rozlišovací schopnost - L45 a AS15. S těmito primery jsem provedla amplifikaci všech izolovaných kmenů. Pro naprostou jistotu správného začlenění do jednotlivých skupin jsem jako stejný fingerprint brala pouze takový, kde došlo k naprosté shodě vyskytujících se fragmentů. Složení reakční směsi je uvedeno v Tab. 5.

Tab. 5: Složení reakční směsi (celkem 20,15 µl)

|                                                        |         |
|--------------------------------------------------------|---------|
| deionizovaná H <sub>2</sub> O                          | 10 µl   |
| dNTP's (2 mM)                                          | 2 µl    |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM) (Promega Corp., Madison, WI) | 2 µl    |
| primer (10 pmol/µl)                                    | 2 µl    |
| Perfect Taq pufr (Eppendorf)                           | 2 µl    |
| Perfect Taq DNA polymeráza (5U/µl) (Eppendorf)         | 0,15 µl |
| DNA templát (30ng/µl)                                  | 2 µl    |

Amplifikaci vzorků jsem provedla v termocykleru Mastercycler Gradient (Eppendorf) a to dle předpisu uvedeném v Lübeck a kol. (2000). Amplifikační cyklus měl následující parametry: 94°C/3 min (1x); 92°C/50 s, 56°C/70 s, 72°C/60 s (30x) a 72°C/3 min (1x).

Produkty jsem poté nanasla na 1,5% agarózový gel (elektroforetický pufr TBE) a zviditelnila při gelové elektroforéze. Nanášela jsem vždy 2µl produktu. Délka elektroforézy byla přibližně 1,5 hodiny při 130V.

Veškeré práce související s metodou UP-PCR fingerprintingu jsem prováděla v laboratoři RNDr. S. Pažoutové, CSc. v Mikrobiologickém ústavu AV ČR v Praze.

### 3.5.3 DNA amplifikace

K zařazení kmenů ke konkrétnímu druhu jsem zvolila oblast rDNA kódující gen pro translační elongační faktor 1α (tef1). Na serveru International Subcommission on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy (ISTH) uvádí J. Bissett pro tento účel možnost použití dvou dvojic vhodných primerů. A to tef71f (5'CAA AATGGGTAAGGAGGASAAGAC3') a tef997r (5'CAGTACCGGCRGCRATRATSAG3'), tef85f (5'AGGACAAGACTCACATCAACG3') a tef954r (5'AGTA CCAGTGATCATGTTCTTG3'). S oběma těmito dvojicemi jsem provedla zkušební amplifikaci a po zviditelnění produktů gelovou elektroforézou jsem pro finální amplifikaci zvolila dvojici tef85f a tef954r, která poskytovala čistší PCR produkt.

Protože jsem neměla k dispozici polymerázu uváděnou v daném PCR předpisu, provedla jsem zkoušku dostupných polymeráz. Amplifikovala jsem vždy 3 vzorky náležící k rozdílným druhům a přítomnost PCR produktů zviditelňovala pomocí gelové elektroforézy. Tímto způsobem jsem pro možné použití vyřadila polymerázy Red Taq Polymerase (Sigma-Aldrich), AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Invitrogen) a Immolase (Bioline). Jediná polymeráza poskytující úsek amplifikované DNA v požadované délce byla My Taq HS DNA Polymerase (Bioline), kterou jsem následně použila pro amplifikaci oblasti tef1 u všech svých vzorků. Složení reakční směsi je uvedeno v Tab. 6.

Tab. 6: Složení reakční směsi (celkem 20  $\mu$ l)

|                                                  |              |
|--------------------------------------------------|--------------|
| deionizovaná H <sub>2</sub> O                    | 12,3 $\mu$ l |
| tef85f primer (10 pmol/ $\mu$ l)                 | 2 $\mu$ l    |
| tef954r primer (10 pmol/ $\mu$ l)                | 2 $\mu$ l    |
| My Taq HS pufr (Bioline)                         | 2 $\mu$ l    |
| My Taq HS DNA polymeráza (5U/ $\mu$ l) (Bioline) | 0,2 $\mu$ l  |
| DNA templát (30 ng/ $\mu$ l)                     | 1,5 $\mu$ l  |

Pro amplifikaci vzorků jsem zvolila tzv. touchdown-cyklus, při kterém teplota annealingu klesá vždy o 1°C na jedno opakování. Amplifikační cyklus uváděný J. Bissettem jsem upravila pro parametry zvolené My Taq HS DNA polymerázy. Cyklus provedený v termocykleru Mastercycler epgradient S (Eppendorf) měl následující parametry: 94°C/2 min (1×); 94°C/30 s, 66-60°C/45 s, 72°C/45 s (5×); 94°C/30 s, 60°C/45 s, 72°C/45 s (30×) a 72°C/10 min (1×).

Produkty jsem poté nanasla na 1% agarózový gel (elektroforetický pufr TAE) a zviditelnila při gelové elektroforéze. Nanášela jsem vždy 2,5  $\mu$ l produktu. Délka elektroforézy byla přibližně 0,5 hodiny při 120 V.

Pro izoláty, u kterých sekvence tef1 neposkytla dostatečné informace pro zařazení k příslušnému druhu, bylo zapotřebí amplifikovat další úsek rDNA. Zvolila jsem amplifikaci ITS oblasti, která je již osekvenována u velkého množství zástupců

rodu *Trichoderma* (stejně jako u ostatních houbových rodů) a existuje pro ni vlastní internetová databáze TrichOKEY.

K amplifikaci byl použit komerčně dostupný mastermix 5Prime MasterMix 2,5x (5Prime) a primery ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') a NL4 (5'GGTCCGTGTTTCAAGA CGG3'). Složení reakční směsi je uvedeno v Tab. 7.

Tab. 7: Složení reakční směsi (celkem 20 µl)

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| deionizovaná H <sub>2</sub> O  | 10 µl  |
| 5Prime MasterMix 2,5x (5Prime) | 8 µl   |
| ITS1 primer (25 pmol/µl)       | 0,5 µl |
| NL4 primer (25 pmol/µl)        | 0,5 µl |
| DNA templát (30 ng/µl)         | 1 µl   |

Amplifikaci vzorků jsem provedla v termocykleru Mastercycler epgradient S (Eppendorf) a to dle předpisu uvedeném v Gardes a Bruns (1993) a O'Donnell (1993). Amplifikační cyklus měl následující parametry: 95°C/10 min (1×); 94°C/10 s, 53°C/60 s, 72°C/60 s (38×) a 72°C/10 min (1×).

Produkty jsem poté nanasla na 1% agarózový gel (elektroforetický pufr TAE) a zviditelnila při gelové elektroforéze. Nanášela jsem vždy 2 µl produktu. Délka elektroforézy byla přibližně 0,5 hodiny při 120V.

#### 3.5.4 Purifikace DNA

Pro zjištění nejlepšího způsobu purifikace jsem na souboru 20 vzorků srovnala čistotu přečištěného produktu s použitím octanové metody a s pomocí kitu Gen Elute PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich). Purifikace vzorků pomocí kitu je způsob výrazně dražší a v případě mých izolátů neposkytla vyšší čistotu získaných produktů než metoda octanová. Většinu svých vzorků jsem proto purifikovala reakcí s octanem sodným.

Purifikaci octanem sodným jsem prováděla v jamkové destičce. K PCR produktu (16 - 20 µl) jsem v prvním kroku napipetovala 2 µl octanu sodného a

dispenzorem přidala 50  $\mu$ l 96%-ního etanolu. Poté jsem destičku uzavřela, zvortexovala a lehce stočila na centrifuze po dobu 1 minuty na 400 rpm. Nechala jsem směs 15 minut stát. Následně jsem destičku stočila při maximálních otáčkách (3700 rpm) po dobu 30 minut. Supernatant jsem opatrně slila a otočenou destičku jsem krátce stočila při 400 rpm. V dalším kroku jsem do jamek dispenzorem přidala 100  $\mu$ l 70% -ního etanolu. Uzavřenou destičku jsem centrifugoval při 3700 rpm po dobu 10 minut. Supernatant jsem opět slila a destičku dnem vzhůru krátce stočila při 400 rpm. Poté jsem nechala stát otevřenou destičku po dobu 10 minut ve flowboxu. Jamkovou destičku jsem následně sušila 5 minut při 65°C na termobloku a vzniklou peletku purifikované DNA jsem poté rozpustila ve 20  $\mu$ l neionizované H<sub>2</sub>O.

Amplifikaci a purifikaci *tef1* a ITS rDNA jsem prováděla v DNA laboratoři katedry botaniky PřF UK v Praze, Benátská 2.

### **3.5.5 Sekvenace DNA**

Sekvenace vzorků byla provedena servisně v Laboratoři sekvenace DNA PřF UK v Praze, Viničná 7. K sekvenaci byly použity primery *tef71f*, *tef85f* a ITS1. Identitu izolátů jsem určila na základě shody získané sekvence a sekvence typového kmenu daného druhu uložené v databázích GenBank, TrichOKEY a TrichoBLAST.

## **3.6 KONSTRUKCE FYLOGENETICKÝCH KLA DOGRAMŮ**

Pro sestrojení fylogenetických kladogramů jsem provedla alignment všech získaných sekvencí, spolu s reprezentanty známých druhů (uvest citace od kud byly ty datasety, nebo to více rozepsat kde si je sehnala) pomocí programu MAFFTvers.6 dostupném na internetu (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). Fylogenetické stromy pro úseky *tef1 $\alpha$*  - intron 4, *tef1 $\alpha$*  - intron 5, ITS a *rpb2* jsem sestrojila pomocí metod Minimum evolution a Maximum likelihood za použití programu MEGA5 (Tamura a kol., 2011). V tomto programu byl zjištěn nejlepší substituční model pro metodu Maximum likelihood. Zařazení jednotlivých kmenů do stávajícího systému rodu *Trichoderma* je popsáno v kapitole Výsledky, 3.2.2.2. Taxonomické zařazení.

### **3.7 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT**

Primární data pro statistické analýzy jsem zpracovala v programu Microsoft Excel. U získaných kmenů jsem zjišťovala jejich frekvenci výskytu (vyjádřenou procentuálním zastoupením) na jednotlivých substrátech resp. pro jednotlivé nadmořské výšky. Frekvenci výskytu (v %) jsem stanovovala z počtu jedinců daného druhu k celkovému počtu jedinců vyskytujících se na sledovaném substrátu. Hodnoty, z nichž byly frekvence stanovovány jsou uvedeny v Tab. 15 v kapitole Přílohy.

### **3.8 SEZNAM VYBRANÝCH ZKRATEK POUŽITÝCH V DIPLOMOVÉ PRÁCI**

Calm1 - Calmodulin 1

CCF - Culture Collection of Fungi

CCM - Czech Collection of Microorganisms

CMF ISB - Collection of Microscopic Fungi of ISB

CPPF - Collection of Phytopathogenic Fungi

ech 42 - Chitináza 18-5

ITS, ITS-rDNA - internal transcribed spacer (ITS1-5,8S-ITS2 rDNA).

PCA - bramboro-mrkvový agar (potato-carrot agar)

PDA - bramboro-dextrózový agar (potato-dextrose agar)

SL2 - 2° sladidlový agar

SNA - Synthetic nutrient-poor agar

TAE - Tris-Acetate-EDTA pufr

TBE - Tris-Borate-EDTA pufr

tef1 - translační elongační faktor 1 $\alpha$

TUB2 -  $\beta$ -tubulin2

UP-PCR - Universally Primed PCR

## 4 VÝSLEDKY

Cílem předkládané diplomové práce bylo studium diverzity rodu *Trichoderma* na území České republiky kombinací morfologických a molekulárních metod a porovnání zjištěných výsledků s dosud známými údaji o diverzitě tohoto druhu na našem území.

### 4.1 DRUHOVÉ ZASTOUPENÍ RODU *TRICHODERMA* NA JEDNOTLIVÝCH SUBSTRÁTECH RESP. NADMOŘSKÝCH VÝŠKÁCH

V rámci diplomové práce jsem v letech 2010 až 2013 provedla revizi 30 izolátů pocházejících ze sbírky CCF, zpracovala 196 izolátů ze studijní sbírky A. Kubátové a 43 izolátů vzešlo z vlastního zpracování odběrových vzorků. U všech těchto izolátů jsem zjistila druhovou příslušnost, s výsledkem 21 známých druhů rodu *Trichoderma* patřících do 4 sekcí a jednoho izolátu druhu dosud pro vědu patrně neznámého. Přehled identifikovaných druhů včetně jejich teleomorf a zařazení do příslušné sekce je uveden v Tab. 8. Grafické znázornění výskytu jednotlivých druhů v závislosti na substrátu a nadmořské výšce je znázorněno v Grafu 1.

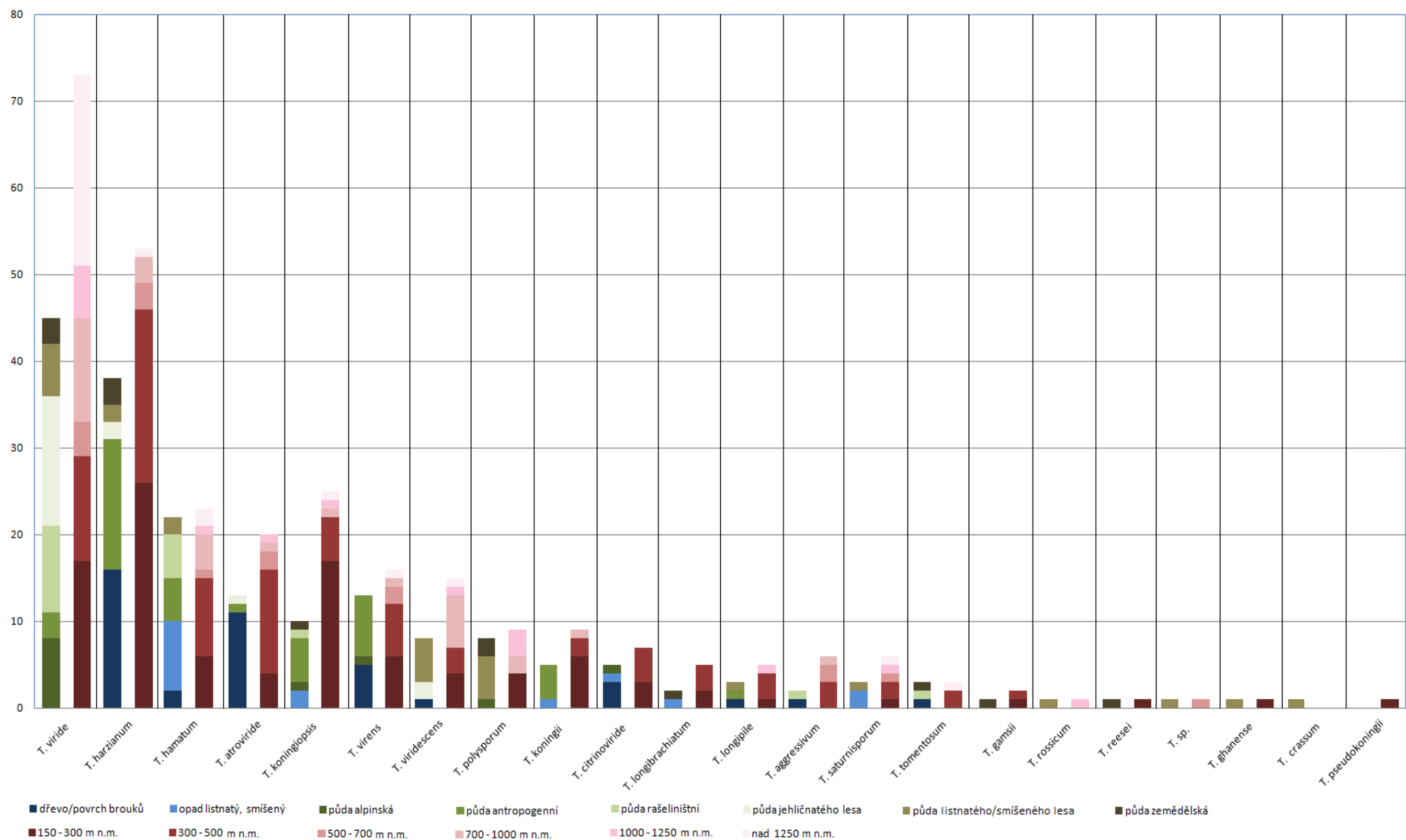
Tab. 8: Přehled druhů rodu *Trichoderma* identifikovaných morfologickými a molekulárními metodami v rámci diplomové práce.

| DRUH                                                    | TELEOMORFA                                    | SEKCE           |
|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------|
| <i>T. aggressivum</i> Samuels & W. Gams                 | -                                             | Pachybasium     |
| <i>T. atroviride</i> P. Karst.                          | <i>H. atroviridis</i> Dodd, Lieckf. & Samuels | Trichoderma     |
| <i>T. citrinoviride</i> Bissett                         | <i>H. schweinitzii</i> (Fr.) Sacc.            | Longibrachiatum |
| <i>T. crassum</i> Bissett                               | <i>H. crassa</i> P. Chaverri & Samuels        | Pachybasium     |
| <i>T. gamsii</i> Samuels & Druzhin.                     | -                                             |                 |
| <i>T. ghanense</i> Yoshim. Doi, Y. Abe & Sugiy.         | -                                             | Longibrachiatum |
| <i>T. hamatum</i> (Bonord.) Bainier                     | -                                             | Trichoderma     |
| <i>T. harzianum</i> Rifai                               | <i>H. lixii</i> Pat.                          | Harzianum       |
| <i>T. koningii</i> Oudem.                               | <i>H. koningii</i> Lieckf., Samuels & W. Gams | Trichoderma     |
| <i>T. koningiopsis</i> Samuels, C. Suárez & H. C. Evans | <i>H. koningiopsis</i> Samuels                | Trichoderma     |
| <i>T. longibrachiatum</i> Rifai                         | -                                             | Longibrachiatum |
| <i>T. longipile</i> Bissett                             | <i>H. longipilosa</i> Jaklitsch               | Pachybasium     |

|                                                                       |                                                       |                 |
|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------|
| <i>T. polysporum</i> (Link) Rifai                                     | <i>H. pachybasii</i> Yoshim. Doi                      | Pachybasium     |
| <i>T. pseudokoningii</i> Rifai                                        | -                                                     | Longibrachiatum |
| <i>T. reesei</i> E. G. Simmons                                        | -                                                     | Longibrachiatum |
| <i>T. rossicum</i> Bissett, C. P. Kubicek & Szakacs                   | -                                                     | Pachybasium     |
| <i>T. saturnisporum</i> Hammill                                       | -                                                     | Longibrachiatum |
| <i>T. tomentosum</i> Bissett                                          | -                                                     | Pachybasium     |
| <i>T. virens</i> (J. H. Mill., Giddens & A. A. Foster) Arx            | <i>H. virens</i> P. Chaverri, Samuels & E. L. Stewart | Pachybasium     |
| <i>T. viride</i> Pers.                                                | <i>H. rufa</i> (Pers.) Fr.                            | Trichoderma     |
| <i>T. viridescens</i> (A. S. Horne & H. S. Will.) Jaklitsch & Samuels | <i>H. viridescens</i> Jaklitsch & Samuels             | Trichoderma     |
| <i>Trichoderma</i> sp. (AK 115/00)                                    | -                                                     | Pachybasium     |

#### 4.1.1 Druhové zastoupení na jednotlivých substrátech

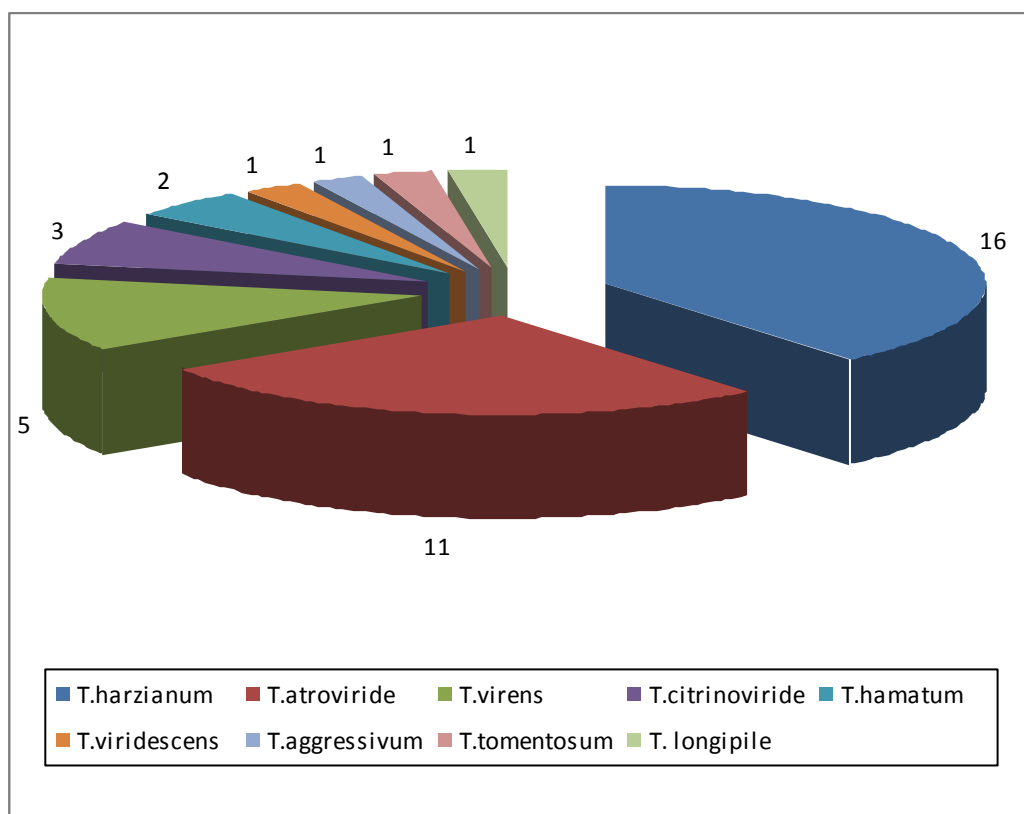
Přehled a zastoupení druhů na jednotlivých substrátech je uveden v Tab. 15 v kapitole Přílohy. Izoláty byly dle substrátu rozděleny do následujících kategorií: dřevo/ povrch brouků, opad (dále dělen na opad jehličnatý a opad listnatý/ smíšený), ovzduší, potraviny/ krmiva, půda blíže nespecifikovaná, půda alpská, půda antropogenní, půda jehličnatého lesa, půda rašeliništní, půda zemědělská a ostatní. Kategorie ovzduší, potraviny/ krmiva, půda nespecifikovaná a ostatní neobsahovaly dostatečné množství kmenů resp. nepřinášely výpovědní hodnotu o daném substrátu a nebyly proto do následné bližší charakteristiky obsaženy. Druhové zastoupení na ostatních vybraných substrátech je uvedeno níže, Graf 2 - 15.



Graf 1: Druhové zastoupení rodu *Trichoderma* v závislosti na typu substrátu a nadmořské výšce

#### 4.1.1.1 Zastoupení jednotlivých druhů na dřevě/ povrchu brouků

Kategorie dřevo/ povrch brouků obsahovala celkem 41 izolátů patřících do 9 druhů. Kultury byly izolovány z 21 lokalit. Druhovému zastoupení je znázorněno v Grafu 2. Výraznou převahu na tomto substrátu zaznamenaly kosmopolitně se vyskytující druhy *Trichoderma harzianum* (39%) a *Trichoderma atroviride* (26,8%), která je specifická právě svou vazbou na rozkládající se dřevo. Vyšší zastoupení na tomto substrátu měl i druh *Trichoderma virens* (12,2%). Druhy *Trichoderma citrinoviride* (7,3%) a *Trichoderma hamatum* (4,9%) se již vyskytovaly s menší frekvencí výskytu. Ostatní druhy se vyskytly pouze v podobě jednoho izolátu (*T. viridescens*, *T. aggressivum*, *T. tomentosum*, *T. longipile*).

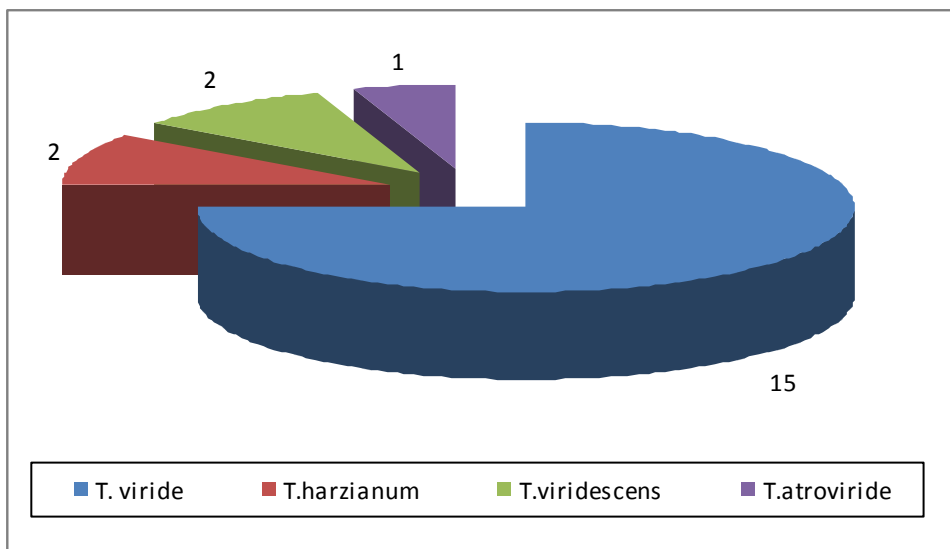


Graf 2: Zastoupení druhů rodu *Trichoderma* izolovaných ze dřeva/ povrchu brouků

#### 4.1.1.2 Zastoupení jednotlivých druhů v půdě jehličnatého lesa

Z půdy jehličnatého lesa pocházelo celkem 20 izolátů patřících do 4 druhů. Kultury byly izolovány z 9 lokalit. Druhovému zastoupení je znázorněno v Grafu 3. Zcela dominantním zástupcem této kategorie byl druh charakteristický právě pro jehličnaté

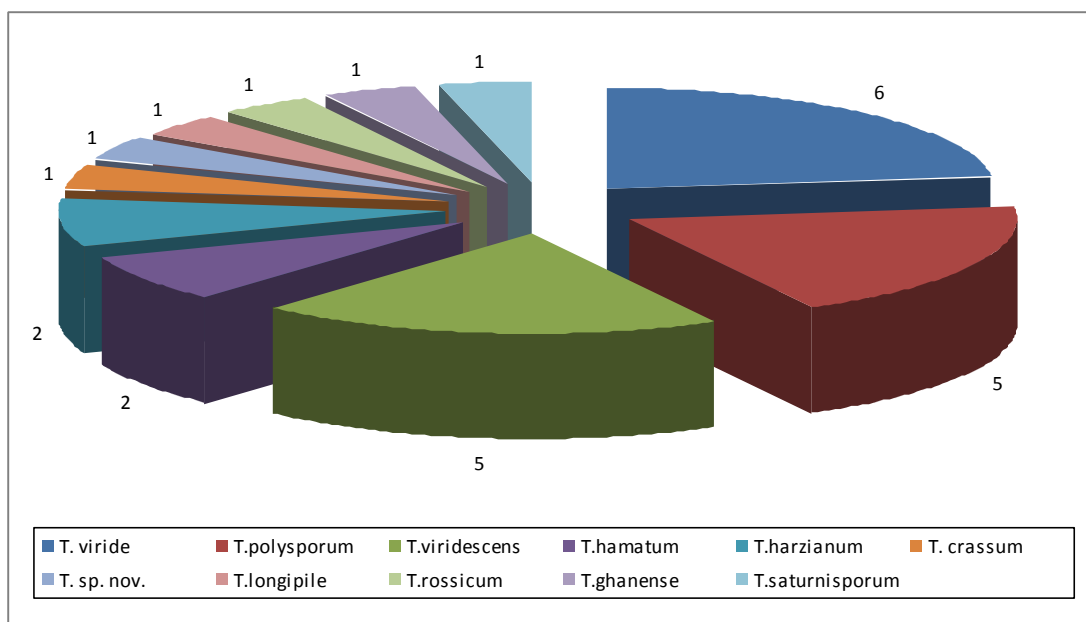
porosty vyšších nadmořských výšek - *Trichoderma viride* s frekvencí výskytu 75%. V menší míře (2 izoláty) se zde vyskytovaly druhy *Trichoderma harzianum* a *Trichoderma viridescens*. Pouze jedenkrát se vyskytoval druh *Trichoderma atroviride*.



Graf 3: Zastoupení druhů rodu *Trichoderma* izolovaných z půdy jehličnatého lesa

#### 4.1.1.3 Zastoupení jednotlivých druhů v půdě listnatého/ smíšeného lesa

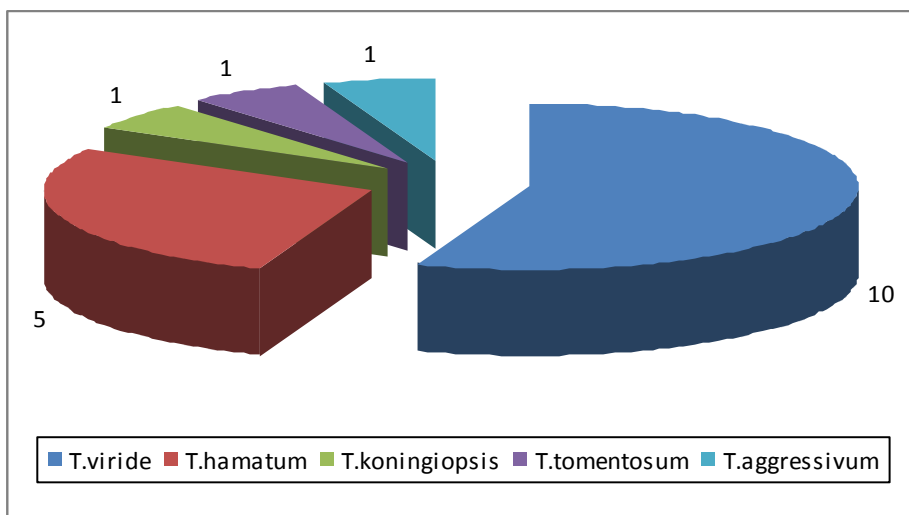
Z půdy smíšeného a listnatého lesa se podařilo izolovat celkem 26 kmenů náležících k 11 druhům. Kultury byly izolovány z 13 lokalit. Druhovému zastoupení je znázorněno v Grafu 4. Tato velmi různorodá skupina neobsahovala žádný výrazně dominující druh. Vyšší zastoupení vykazovaly druhy *Trichoderma viride* (23,1%), *Trichoderma polysporum* (19,2%) a *Trichoderma viridescens* (19,2%). Méně zastoupeny (2 izoláty) byly druhy *Trichoderma harzianum* a *Trichoderma hamatum*. Ostatní druhy se vyskytly pouze v podobě jednoho izolátu (*T. longipile*, *T. rossicum*, *T. ghanense* a *T. saturnisporum*). U druhů *Trichoderma longipile*, *Trichoderma rossicum*, *Trichoderma ghanense* se však jedná o první nález z území České republiky, u druhu *Trichoderma ghanense* nebyl dosud publikován ani výskyt z území Evropy. Z půdy smíšeného lesa také pochází izolát, který se dle současné literatury nepodařilo zařadit do žádného z dosud známých druhů, a který bude popsán jako nový druh.



Graf 4: Zastoupení druhů rodu *Trichoderma* izolovaných z půdy listnatého/ smíšeného lesa

#### 4.1.1.4 Zastoupení jednotlivých druhů v rašeliništní půdě

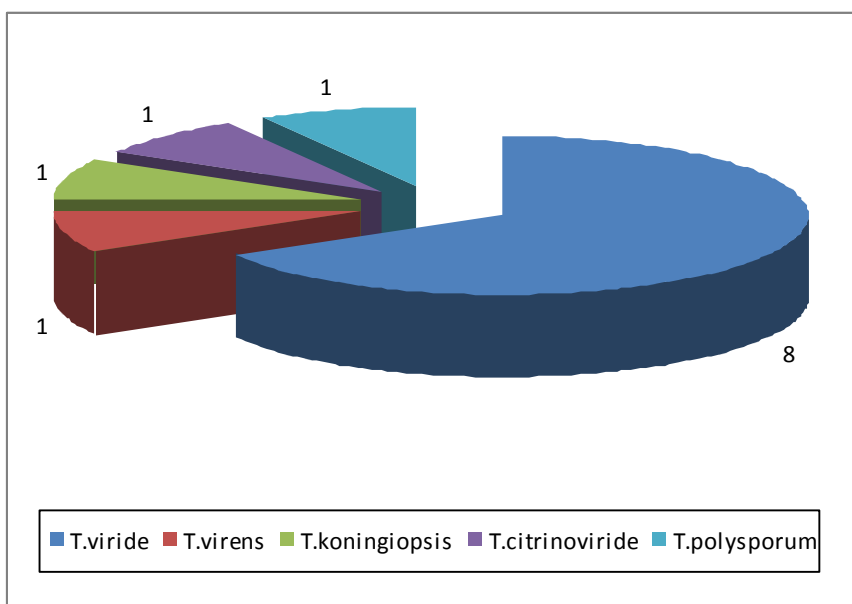
V kategorii půda rašeliništní bylo zpracováno celkem 18 izolátů patřících do 5 druhů. Kultury byly izolovány z 9 lokalit. Druhové zastoupení je znázorněno v Grafu 5. Více než polovina izolátů byla identifikována jako *Trichoderma viride* (55,5%). Vyšší zastoupení v rašeliništní půdě zaznamenal též druh *Trichoderma hamatum* (27,8%), který se nejčastěji vyskytuje právě na rozkládajícím se bylinném substrátu popř. listovém opadu. Jedním izolátem byly zastoupeny druhy *T. koningiopsis*, *T. tomentosum* a *T. aggressivum*.



Graf 5: Zastoupení druhů rodu *Trichoderma* izolovaných z rašeliništní půdy

#### 4.1.1.5 Zastoupení jednotlivých druhů v alpínské půdě

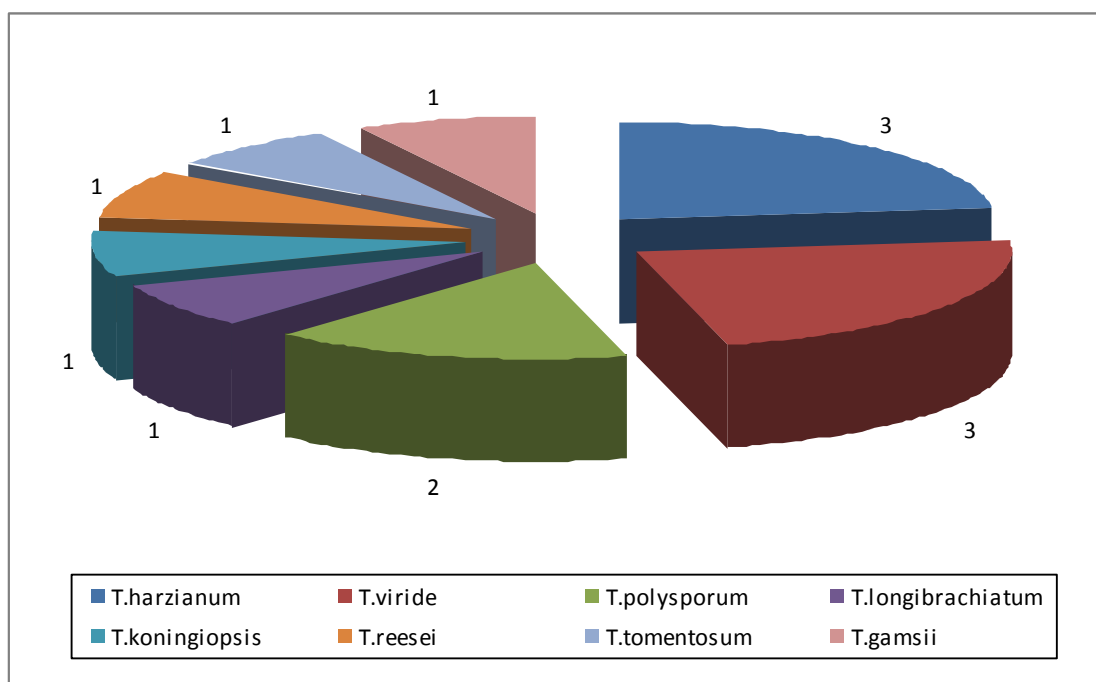
Z alpínské půdy bylo získáno celkem 12 izolátů patřících k 5 druhům. Kultury byly izolovány z 8 lokalit. Druhové zastoupení je znázorněno v Grafu 6. Výrazně převažujícím druhem této kategorie byla *Trichoderma viride* s frekvencí výskytu 66,7%, druh příznačný právě pro jehličnaté porosty vyšších nadmořských výšek. Ostatní druhy (*T. virens*, *T. koningiopsis*, *T. citrinoviride* a *T. polysporum*) se vyskytovaly pouze v nálezů jediného izolátu.



Graf 6: Zastoupení druhů rodu *Trichoderma* izolovaných z alpínské půdy

#### 4.1.1.6 Zastoupení jednotlivých druhů v zemědělské půdě

Do kategorie zemědělská půda patří celkem 13 izolátů náležících do 8 druhů. Kultury byly izolovány z 8 lokalit. Druhové zastoupení je znázorněno v Grafu 7. V této kategorii se nevyskytuje žádný výrazně převažující druh. Všechny druhy zde byly zaznamenány pouze v počtu 1 až 3 izolátů. Nejvíce je zde zastoupena *Trichoderma harzianum* a *Trichoderma viride* a to 23,1% výskytu. Druh *Trichoderma polysporum* byl na zemědělské půdě zaznamenán dvakrát, ostatní druhy (*T. longibrachiatum*, *T. koningiopsis*, *T. reesei*, *T. tomentosum* a *T. gamsii*) byly nalezeny pouze jedenkrát. Nález posledně jmenovaného druhu (*Trichoderma gamsii*) je prvním nálezem pro území České republiky.

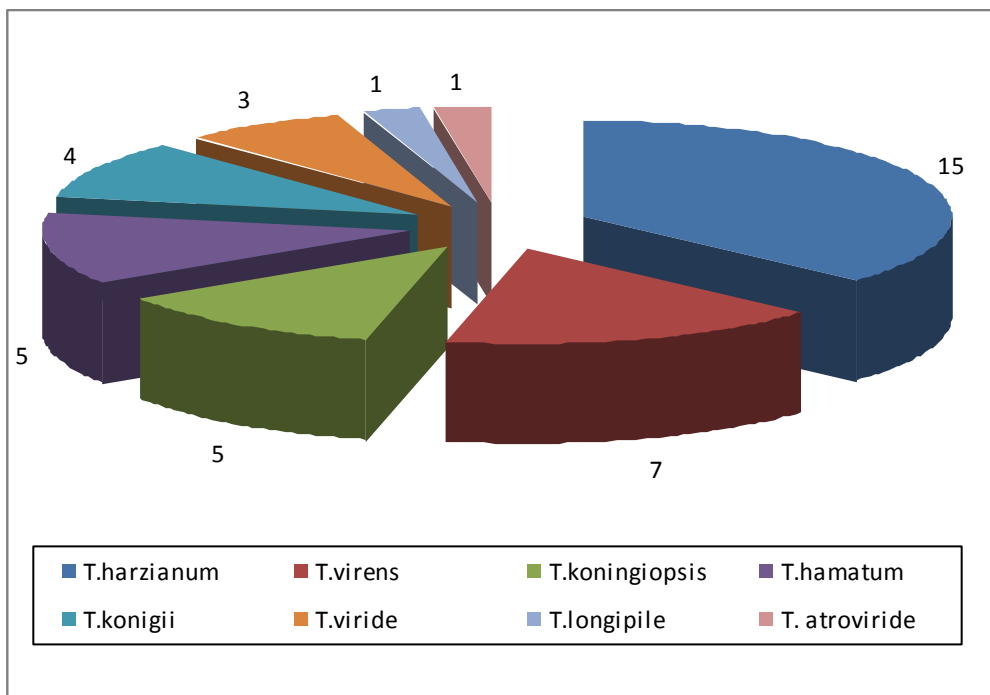


Graf 7: Zastoupení druhů rodu *Trichoderma* izolovaných ze zemědělské půdy

#### 4.1.1.7 Zastoupení jednotlivých druhů v antropogenní půdě

Ve skupině izolátů získaných z antropogenní půdy se nachází celkem 41 izolátů patřících do 8 druhů. Kultury byly izolovány ze 7 lokalit. Druhové zastoupení je znázorněno v Grafu 8. Nejčastěji se vyskytující druhem je kosmopolitně rozšířený druh s výraznou adaptabilitou - *Trichoderma harzianum* s frekvencí výskytu 36,6%. Vyšší zastoupení v antropogenní půdě zaznamenaly též druhy *Trichoderma virens*

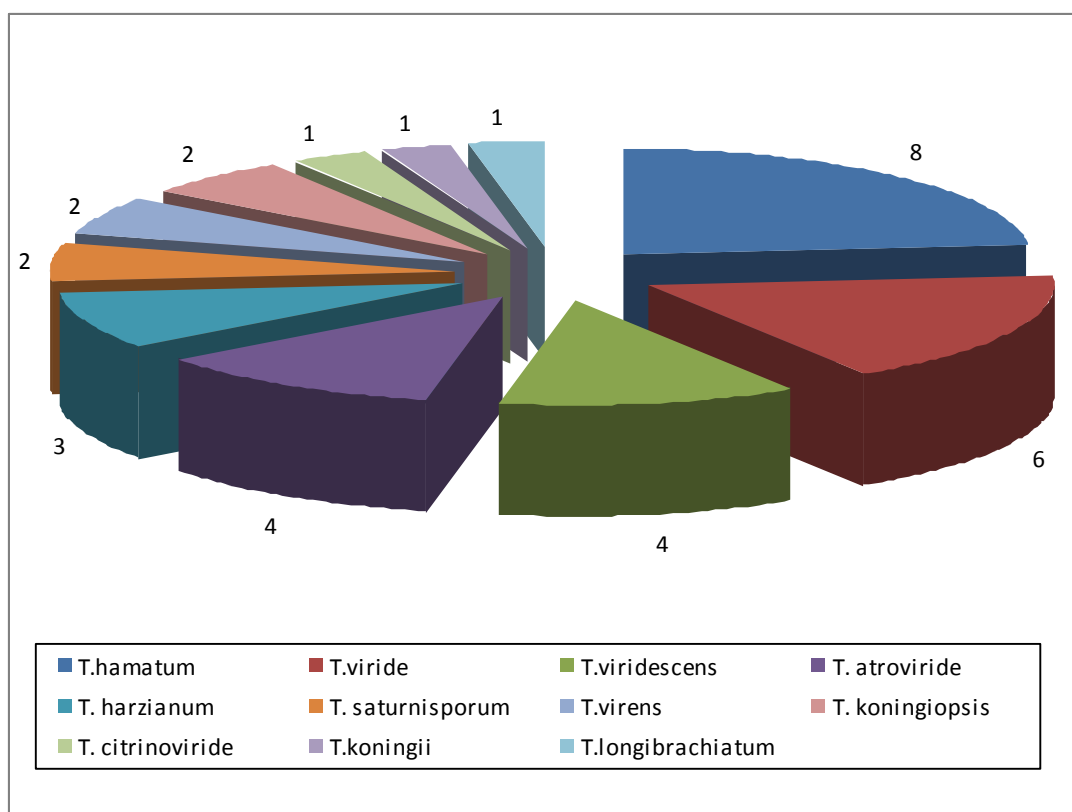
(17,1%), *Trichoderma koningiopsis* (12,2%), *Trichoderma hamatum* (12,2%) a *Trichoderma koningii* (9,7%). *Trichoderma viride* se na tomto substrátu vyskytovala pouze ve 3 izolátech, *T. longipile* a *T. atroviride* byly přítomny pouze jedenkrát.



Graf 8: Zastoupení druhů rodu *Trichoderma* izolovaných z antropogenní půdy

#### 4.1.1.8 Zastoupení jednotlivých druhů na listnatém/ smíšeném opadu

Z odběrů pocházejících z listového a smíšeného opadu jsem získala celkem 34 izolátů. Kultury byly izolovány z 18 lokalit. Druhové zastoupení je znázorněno v Grafu 9. Stejně jako izoláty z půdy listnatého a smíšeného lesa vykazuje tato skupina velkou druhovou rozmanitost, celkem se podařilo určit 11 druhů. Ani v tomto případě však nelze nalézt druh dominující svou četností nad ostatními. Vyšší zastoupení lze pozorovat pouze u druhů *Trichoderma hamatum* (23,5%) a *Trichoderma viride* (17,6%). Méně zastoupeny byly druhy *Trichoderma viridescens* (11,8%), *Trichoderma atroviride* (11,8%) a *Trichoderma harzianum* (8,8%). Ostatní druhy se vyskytly pouze v podobě dvou (*T. saturnisporum*, *T. virens* a *T. koningiopsis*) resp. jednoho izolátu (*T. citrinoviride*, *T. koningii* a *T. longibrachiatum*).



Graf 9: Zastoupení druhů rodu *Trichoderma* izolovaných z listnatého/ smíšeného opadu

#### 4.1.1.9 Srovnání jednotlivých substrátů

Z grafů 2 - 9 je patrné výrazně vyšší zastoupení druhu *Trichoderma harzianum* na dřevě/ povrchu brouků (39%) a antropogenní půdě (36,6%). Dalším druhem s viditelnou vazbou na substrát je *Trichoderma viride*. Nejvýraznější převahu nad ostatními druhy má *Trichoderma viride* v půdě jehličnatého lesa (75%) a v alpinské půdě (67%).

Srovnání počtu druhů rodu *Trichoderma* na různých substrátech ve vztahu k počtu získaných izolátů a počtu studovaných lokalit je uvedeno v Tab. 9.

Tab. 9: Srovnání počtu druhů rodu *Trichoderma* na různých substrátech ve vztahu k počtu získaných izolátů a počtu studovaných lokalit

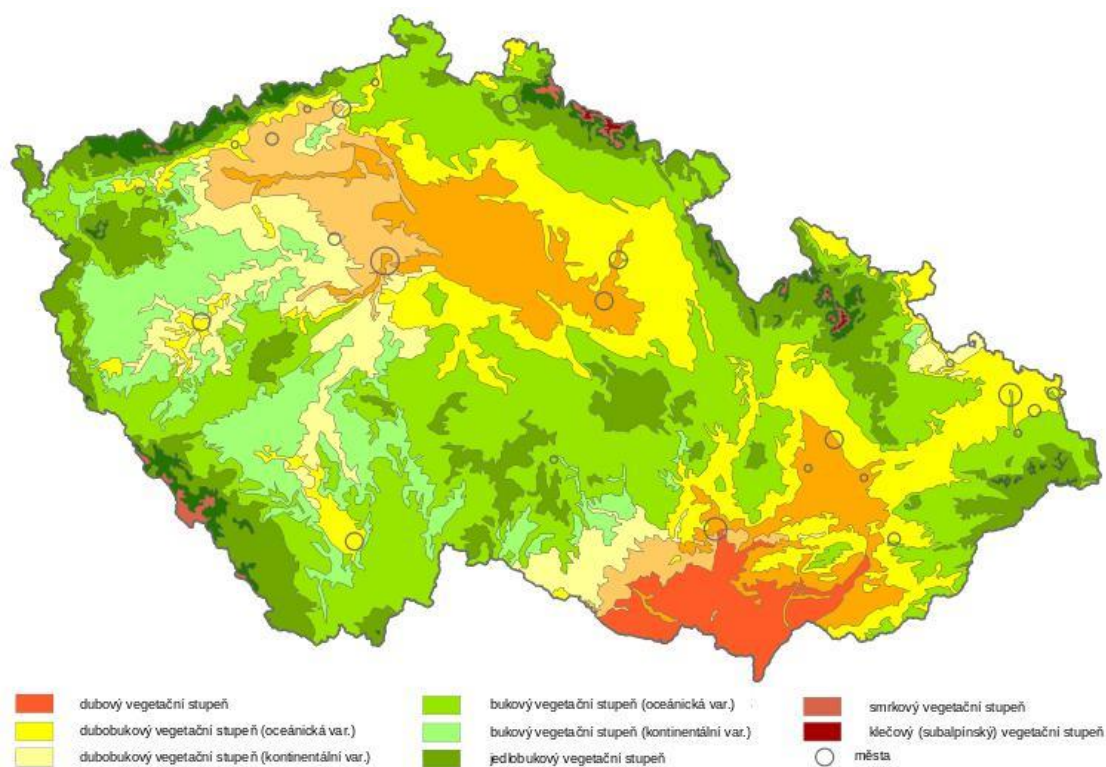
| kategorie substrátu                | počet izolátů | počet lokalit | počet druhů |
|------------------------------------|---------------|---------------|-------------|
| dřevo/ povrch brouků               | 41            | 21            | 9           |
| půda jehličnatého lesa             | 20            | 9             | 4           |
| půda listnatého/<br>smíšeného lesa | 26            | 13            | 11          |
| půda rašeliništní                  | 18            | 9             | 5           |
| půda alpinská                      | 12            | 8             | 5           |
| půda zemědělská                    | 13            | 8             | 8           |
| půda antropogenní                  | 41            | 7             | 8           |
| opad listnatý/ smíšený             | 34            | 18            | 11          |

#### 4.1.2 Druhové zastoupení v jednotlivých nadmořských výškách

Přehled a zastoupení druhů v jednotlivých nadmořských výškách je uveden v Tab. 15 v kapitole Přílohy. Kategorie členění nadmořských výšek odpovídají výskytu jednotlivých vegetačních stupňů a byly vytvořeny dle publikace Biogeografické členění České republiky II. díl (Culek a kol. 2005). Tabulka (Tab. 10) a mapa (Obr. 4) biogeografického členění České republiky jsou zobrazeny níže. Izoláty byly dle nadmořské výšky rozděleny do následujících kategorií: 150 - 300 m n. m. (odpovídá dubovému vegetačnímu stupni), 301 - 500 m n. m. (odpovídá dubobukovému vegetačnímu stupni), 501 - 700 m n. m. (odpovídá bukovému vegetačnímu stupni), 701 - 1000 m n. m. (odpovídá jedlobukovému vegetačnímu stupni), 1000 - 1250 m n. m. (odpovídá smrkovému vegetačnímu stupni) a kategorie nad 1251 m n. m. (odpovídá klečovému, subalpínskému vegetačnímu stupni).

Tab. 10: Biogeografické členění České republiky (upraveno dle Culek a kol. 2005)

| Vegetační stupeň            | Průměrná roční teplota | Malé vegetační období<br>(průměrná denní teplota nad 10°C) | Plocha v ČR | Průměrná nadmořská výška v ČR |
|-----------------------------|------------------------|------------------------------------------------------------|-------------|-------------------------------|
| 1. dubový                   | přes 9°C               | přes 170 dní                                               | 3,4 %       | 150 - 300 m n. m.             |
| 2. dubobukový               | 8°C                    | cca 155 dní                                                | 24,5 %      | 301 - 500 m n. m.             |
| 3. bukový                   | 6,5°C                  | cca 145 dní                                                | 42,6 %      | 501 - 700 m n. m.             |
| 4. jedlobukový              | 5,5°C                  | cca 130 dní                                                | 12,9 %      | 701 - 1000 m n. m.            |
| 5. smrkový                  | 2°C                    | cca 80 dní                                                 | 0,4 %       | 1000 - 1250 m n. m.           |
| 6. klečový<br>(subalpínský) | 1°C                    | cca 50 dní                                                 | 0,05 %      | nad 1251 m n. m.              |

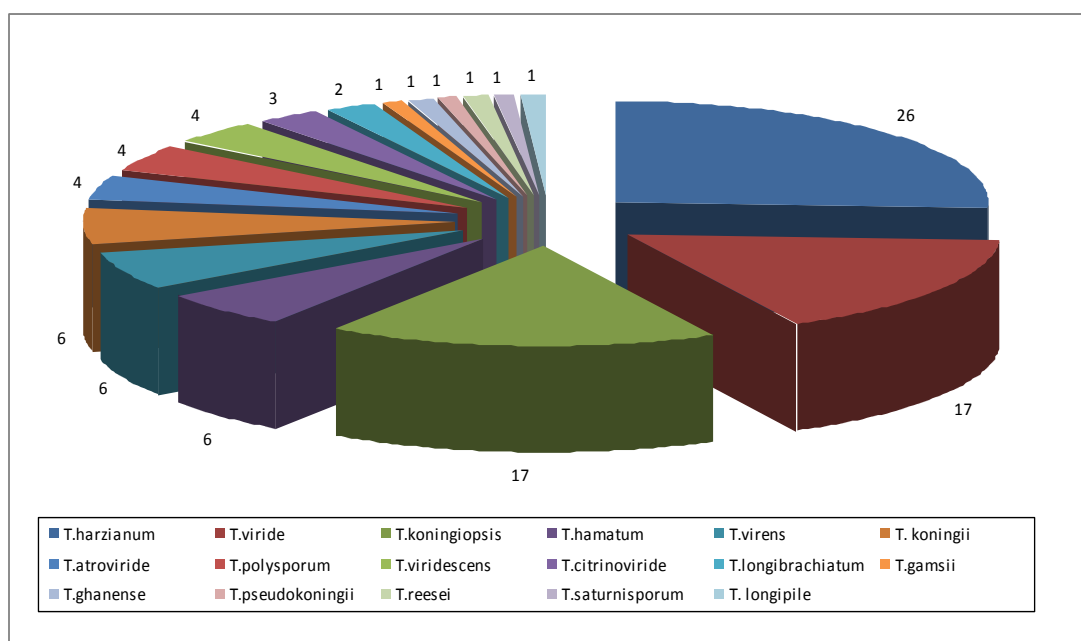


Obr. 4: Mapa biogeografického členění České republiky (Culek a kol. 2005)

#### 4.1.2.1 Zastoupení jednotlivých druhů v nadmořské výšce 150 - 300 m n. m.

Ve skupině izolátů získaných z nadmořské výšky 150 - 300 m n. m. se nachází celkem 101 kmenů patřících do 17 druhů. Kultury byly izolovány z 27 lokalit. Druhové zastoupení je znázorněno v Grafu 10. Nejčastěji se vyskytující druhem je

*Trichoderma harzianum* s frekvencí výskytu 25,7%. Vyšší zastoupení v této nadmořské výšce zaznamenaly též druhy *Trichoderma viride* (16,8%) a *Trichoderma koningiopsis* (16,8%). Kmeny patřící ke druhům *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma virens* a *Trichoderma koningii* se ve 150 - 300 m n. m. vyskytovaly s frekvencí 5,9%. U druhů *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma polysporum* a *Trichoderma viridescens* jsem zaznamenala po 4 nálezích, což odpovídá 4% výskytu. *Trichoderma citrinoviride* se mezi získanými kmeny vyskytovala celkem třikrát a *Trichoderma longibrachiatum* dvakrát. Ostatní druhy (*Trichoderma gamsii*, *Trichoderma ghanense*, *Trichoderma pseudokoningii*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma saturnisporum* a *Trichoderma longipile* se v této kategorii vyskytovaly pouze jedenkrát. Nálezy druhů *Trichoderma gamsii*, *Trichoderma ghanense* jsou prvním zaznamenaným výskytem těchto druhů na území České republiky.

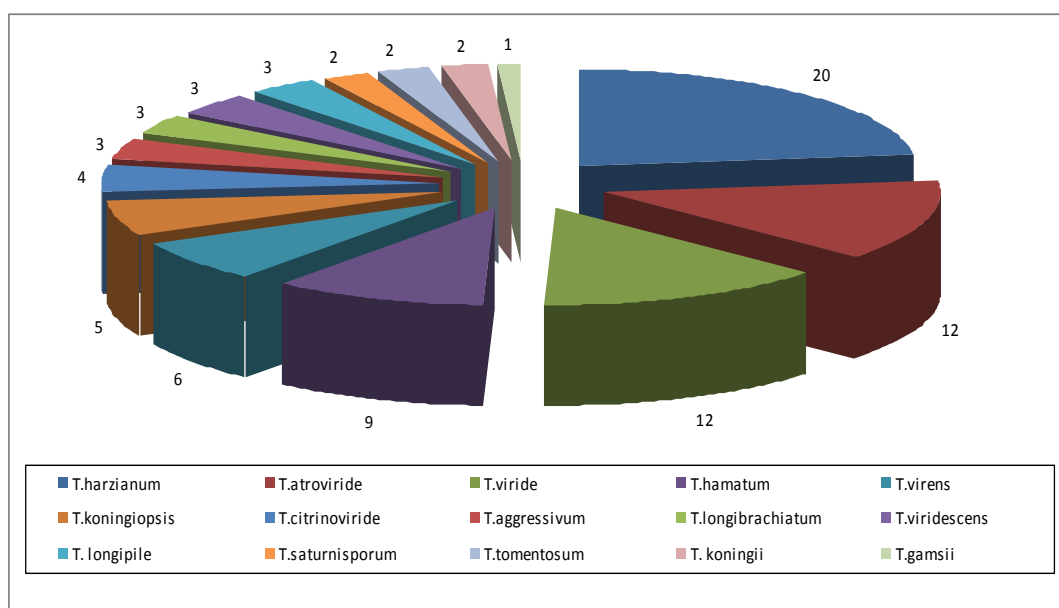


Graf 10: Zastoupení druhů rodu *Trichoderma* izolovaných ze substrátů z nadmořské výšky 150 - 300 m n. m.

#### 4.1.2.2 Zastoupení jednotlivých druhů v nadmořské výšce 301 - 500 m n. m.

V kategorii 301 - 500 m n. m. se vyskytuje celkem 89 kmenů patřících do 15 druhů. Kultury byly izolovány z 37 lokalit. Druhovité zastoupení je znázorněno v Grafu 11. Dominantním druhem v této nadmořské výšce je opět *Trichoderma harzianum*

s frekvencí výskytu 22,5%. Hojněji se v této skupině vyskytují druhy *Trichoderma atroviride* (18%), *Trichoderma viride* (18%) a *Trichoderma hamatum* (10,1%). Dalšími nalezenými druhy byly *Trichoderma koningiopsis* (5,6%) a *Trichoderma citrinoviride* (4,5%). U druhů *Trichoderma aggressivum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma viridescens* a *Trichoderma longipile* jsem zaznamenala vždy 3 nálezy, což odpovídá 3,4% výskytu. Ostatní druhy se v této nadmořské výšce vyskytovaly pouze dvakrát (*T. saturnisporum*, *T. tomentosum*, *T. konigii*) resp. jednou (*T. gamsii*).

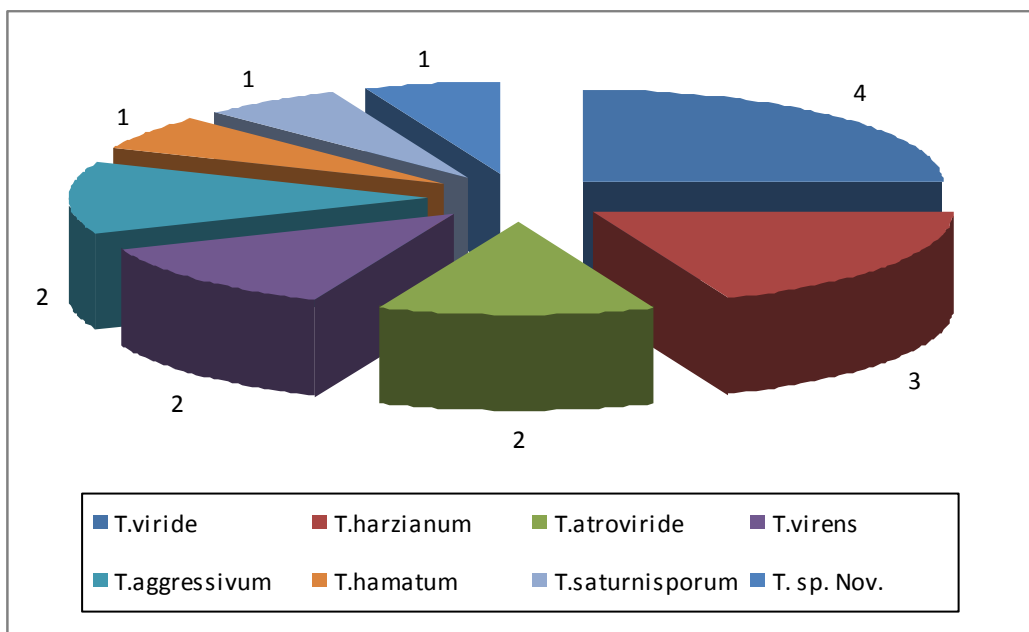


Graf 11: Zastoupení druhů rodu *Trichoderma* izolovaných ze substrátu z nadmořské výšky 301 - 500 m n. m.

#### 4.1.2.3 Zastoupení jednotlivých druhů v nadmořské výšce 501 - 700 m n. m.

Z odběrů pocházejících z nadmořské výšky 501 - 700 m n. m. jsem získala celkem 16 izolátů patřících k 10 druhům. Kultury byly izolovány ze 4 lokalit. Druhové zastoupení je znázorněno v Grafu 12. Protože není tato skupina vzorků nikterak početná, nebyl žádný druh zastoupen výrazně častěji než ostatní, jak je tomu v jiných nadmořských výškách. U všech nalezených druhů jsem zaznamenala takřka srovnatelný výskyt, tj. 1 - 4 nálezy. Nejčastěji zastoupenými druhy v této kategorii byly *Trichoderma viride* (25%) a *Trichoderma hamatum* (18,8%). Dvakrát se vyskytovaly druhy *T. atroviride*, *T. virens* a *T. aggressivum*. Jediný nález jsem pak

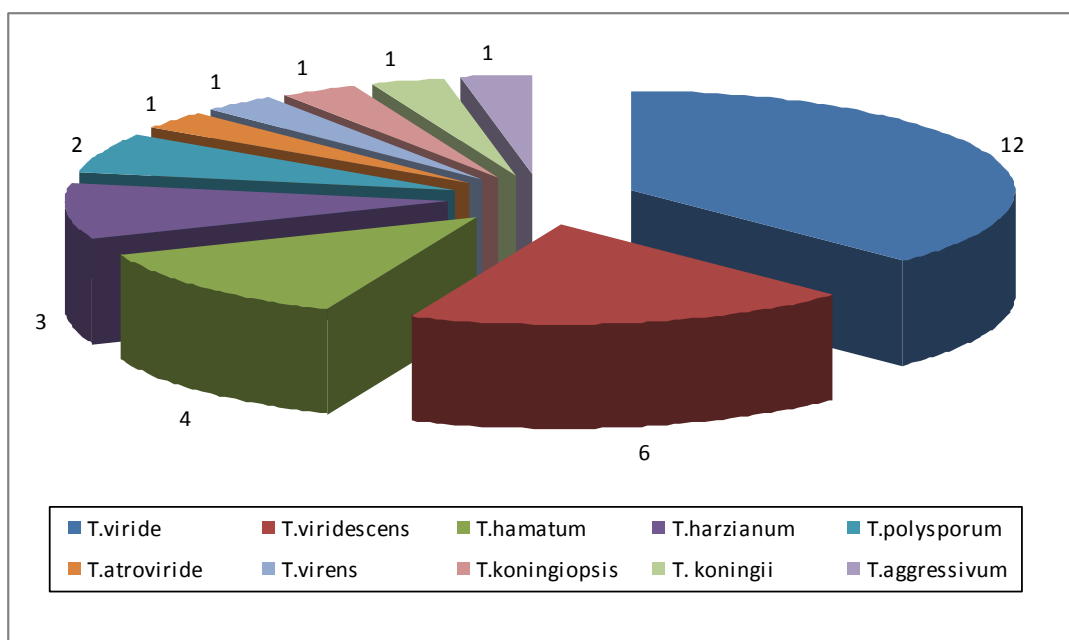
zaznamenala u druhů *T. hamatum* a *T. saturnisporum*. V této kategorii jsem též našla druh nový pro vědu, *Trichoderma* sp. (AK 115/00). Detailní morfologický popis a zařazení tohoto druhu do stávajícího systému rodu *Trichoderma* jsou uvedeny v kapitole 3.2.2. *Trichoderma* sp. AK 115/00.



Graf 12: Zastoupení druhů rodu *Trichoderma* izolovaných ze substrátů z nadmořské výšky 501 - 700 m n. m.

#### 4.1.2.4 Zastoupení jednotlivých druhů v nadmořské výšce 701 - 1000 m n. m.

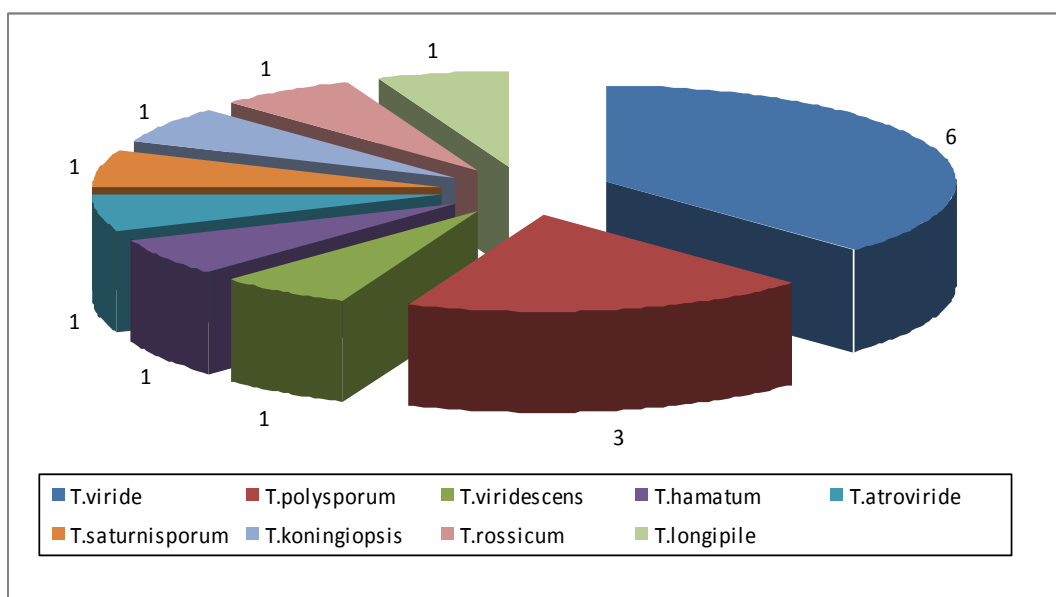
Z nadmořské výšky 701 - 1000 m n. m. bylo získáno celkem 32 izolátů náležících k 10 druhům. Kultury byly izolovány z 10 lokalit. Druhovému zastoupení je znázorněno v Grafu 13. Nejčastěji se vyskytujícím druhem je v této kategorii (stejně jako v dalších s vyšší nadmořskou výškou) *Trichoderma viride* (37,5%), druh typický svou vazbou na chladnější klima. Mezi více zastoupené druhy v této nadmořské výšce patřily též *Trichoderma viridescens* (18,8%), *Trichoderma hamatum* (12,5%) a *Trichoderma harzianum* s frekvencí výskytu 9,4%. Jako druh *Trichoderma polysporum* jsem identifikovala 2 izoláty, ostatní druhy (*T. atroviride*, *T. virens*, *T. koningiopsis*, *T. koningii* a *T. aggressivum*) se v této skupině vyskytovaly pouze jedenkrát.



Graf 13: Zastoupení druhů rodu *Trichoderma* izolovaných ze substrátů z nadmořské výšky 701 - 1000 m n. m.

#### 4.1.2.5 Zastoupení jednotlivých druhů v nadmořské výšce 1001 - 1250 m n. m.

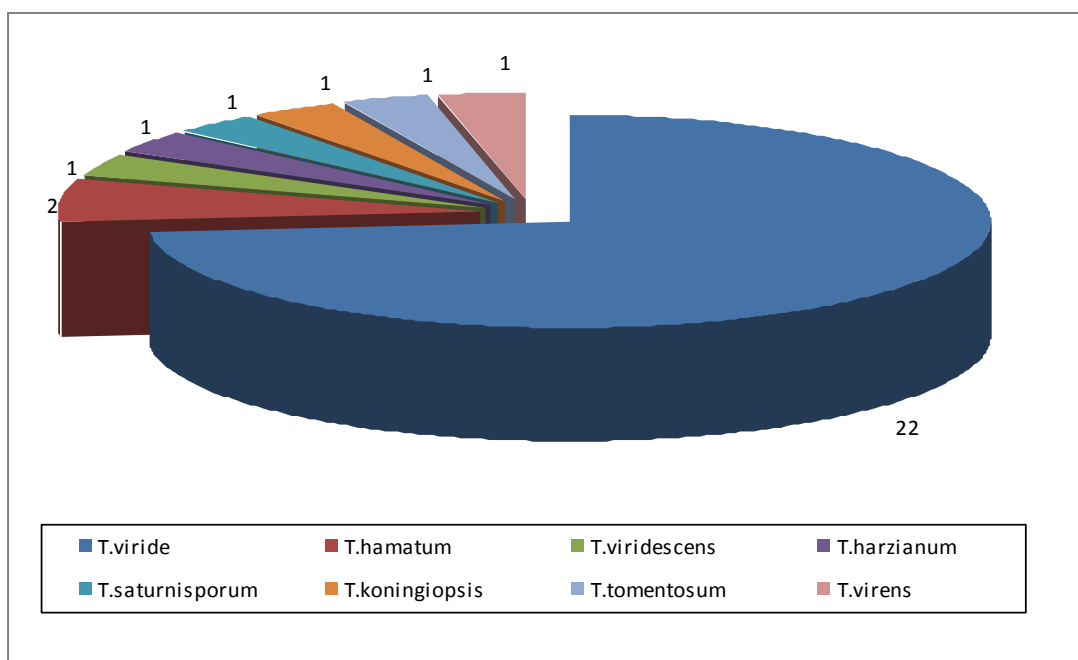
V kategorii 1001 - 1250 m n. m. se vyskytuje celkem 16 kmenů patřících do 9 druhů. Kultury byly izolovány z 11 lokalit. Druhovému zastoupení je znázorněno v Grafu 14. Dominantním druhem v této nadmořské výšce je opět *Trichoderma viride* s frekvencí výskytu 37,5%. Hojněji se v této skupině vyskytoval ještě druh *Trichoderma polysporum* (18,8%), druh morfologicky dobře rozpoznatelný od většiny kmenů v této skupině díky odlišnému větvení konidioforů, tzv. typ *Pachybasium*. Zbylé druhy se v této kategorii vyskytovaly pouze jedenkrát. Jednalo se o druhy *T. viridescens*, *T. hamatum*, *T. atroviride*, *T. saturnisporum*, *T. koningiopsis*, *T. rossicum* a *T. longipile*.



Graf 14: Zastoupení druhů rodu *Trichoderma* izolovaných ze substrátů z nadmořské výšky 1001 - 1250 m n. m.

#### 4.1.2.6 Zastoupení jednotlivých druhů v nadmořské výšce nad 1251 m n. m.

Z nadmořské výšky nad 1251 m n. m. jsem získala celkem 30 kmenů náležících k 8 druhům. Kultury byly izolovány z 15 lokalit. Druhovému zastoupení je znázorněno v Grafu 15. Naprostou převahu nad ostatními druhy má v této kategorii *Trichoderma viride*. Jako *T. viride* bylo určeno 22 izolátů z celkového počtu 30, což odpovídá 73,3% výskytu. Ostatní druhy byly v nadmořské výšce nad 1251 m n. m. nalezeny dvakrát (*Trichoderma hamatum*), popř. pouze jedenkrát (*T. viridescens*, *T. harzianum*, *T. saturnisporum*, *T. koningiopsis*, *T. tomentosum*, *T. virens*).



Graf 15: Zastoupení druhů rodu *Trichoderma* izolovaných ze substrátů z nadmořské výšky nad 1251 m n. m.

#### 4.1.2.7 Srovnání jednotlivých nadmořských výšek

Grafy 10 - 15 ukazují druhové zastoupení na jednotlivých nadmořských výškách resp. vegetačních stupních. Lze říct, že na území České republiky můžeme nalézt dva výrazně dominantní druhy pro určité nadmořské výšky. V dubovém a dubobukovém vegetačním stupni (nadmořská výška 150 - 500 m n. m.) je nejhojněji zastoupeným druhem *Trichoderma harzianum*. Druhým je pak *Trichoderma viride*, která značně dominuje v jedlobukovém, smrkovém a klečovém vegetačním stupni (tj. v nadmořské výšce 701 - nad 1250 m n. m.). Tento výsledek odpovídá zastoupení, které jsem zjistila na jednotlivých substrátech. Tedy, že *T. harzianum* převažuje v půdě listnatého/ smíšeného lesa a v opadu a druh *T. viride* vykazuje silnější vazbu na půdu jehličnatého lesa.

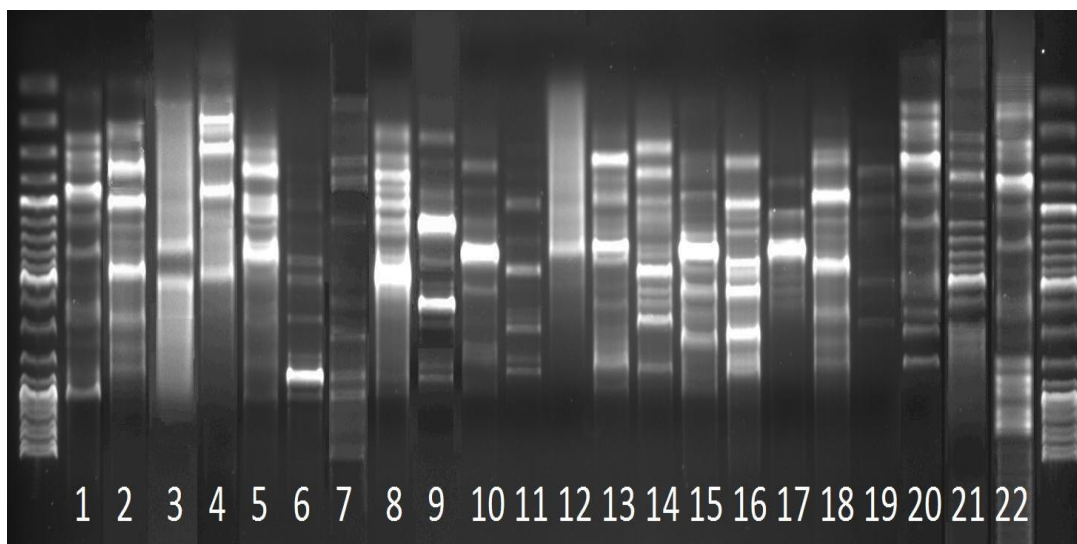
Vegetační stupeň bukový (nadmořská výška 501 - 700 m n. m.) je pásmem přechodu mezi těmito dvěma druhy a proto je v této kategorii nacházíme oba, s přibližně stejnou frekvencí výskytu. Srovnání počtu druhů rodu *Trichoderma* různých nadmořských výškách ve vztahu k počtu získaných izolátů a počtu studovaných lokalit je uvedeno v Tab. 11.

Tab. 11: Srovnání počtu druhů rodu *Trichoderma* různých nadmořských výškách ve vztahu k počtu získaných izolátů a počtu studovaných lokalit

| kategorie nadm. výšky | počet izolátů | počet lokalit | počet druhů |
|-----------------------|---------------|---------------|-------------|
| 150 - 300 m n. m.     | 101           | 27            | 17          |
| 301 - 500 m n. m.     | 89            | 37            | 15          |
| 501 - 700 m n. m.     | 16            | 4             | 10          |
| 701 - 1000 m n. m.    | 32            | 10            | 10          |
| 1000 - 1250 m n. m.   | 16            | 11            | 9           |
| nad 1251 m n. m.      | 30            | 15            | 8           |

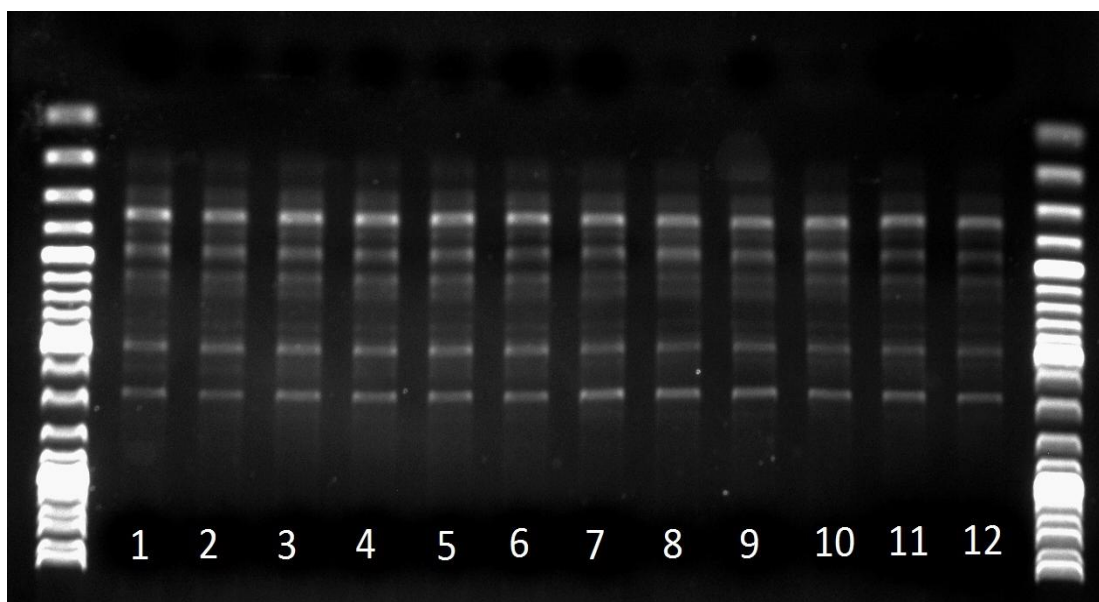
## 4.2 VÝSLEDKY MOLEKULÁRNÍ ANALÝZY

Celkem 266 izolátů hub bylo typováno pomocí metody UP-PCR fingerprinting. Ze všech 6 zkoušených primerů se dvojice AS15 a L45 ukázala jako vhodný způsob zařazení do druhu u kmenů náležících ke stejným morfotypům. Příklady výsledných UP-PCR fingerprintů jsou znázorněny na Obr.5 a 6. Vybraných 65 izolátů bylo dále charakterizováno pomocí oblast *tef1α* rDNA. U dalších zástupců byla též sekvenována oblast ITS1 a 4 rDNA. Druh patrně nový pro vědu (AK 115/00) byl pro spolehlivější zařazení do stávajícího systému rodu *Trichoderma* dále charakterizován ještě sekvencí *rpb2*. Přehled všech izolátů použitých v molekulární analýze a jejich výsledné určení uvádí Tab. 12.



Obr. 5: UP-PCR fingerprint získaný po amplifikaci s primerem AS15 všech izolátů zjištěných z území České republiky během práce na DP.

(1. *T. longibrachiatum*, 2. *T. saturnisporum*, 3. *T. virens*, 4. *T. koningii*, 5. *T. crassum*, 6. *T. harzianum*, 7. *T. koningiopsis*, 8. *T. citrinoviride*, 9. *T. polysporum*, 10. *T. viridescens*, 11. *T. tomentosum*, 12. *T. longipile*, 13. *T. hamatum*, 14. *T. virens*, 15. *T. gamsii*, 16. *T. ghanense*, 17. *T. atroviride*, 18. *T. sp.* (AK 115/00), 19. *T. viride*, 20. *T. aggressivum*, 21. *T. rossicum*, 22. *T. pseudokoningii*)



Obr. 6: UP-PCR fingerprint získaný po amplifikaci s primerem AS15 kmenů náležících k druhu *Trichoderma viride* (1. AK 170/ 00, 2. AK 89/00, 3. AK 37/06, 4. T27, 5. AK 98/00, 6. AK 126/96, 7. AK 137/02, 8. AK 34/10, 9. T4, 10. AK 69/07, 11. AK 43/05, 12. AK 114/00)

Tab. 12: Přehled izolátů použitých v molekulární analýze a jejich zařazení pomocí programu BLAST a databáze TrichOKEY

| kmen     | rDNA<br>(délka) | BLAST Match [Accession No.]              | %<br>shody | Počet<br>shodných<br>pozic | Kmeny se stejným UP-<br>PCR fingerprintem                     | Taxonomické zařazení                   |
|----------|-----------------|------------------------------------------|------------|----------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| AK110/91 | tef1 (900bp)    | <i>Hypocrea crassa</i> [EU280048.1]      | 99         | 818/827                    |                                                               | <i>H.crassa</i> / <i>T.crassum</i>     |
| AK237/93 | tef1 (900bp)    | <i>Hypocrea koningii</i> [EU280017.1]    | 97         | 650/668                    | CCF3834                                                       | <i>H. koningii</i> / <i>T.koningii</i> |
| AK125/07 | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma koningii</i> [EU280017.1] | 99         | 559/560                    | AK113/11, T7, T8                                              | <i>H.koningii</i> / <i>T. koningii</i> |
| AK24/94  | tef1 (900bp)    | <i>Hypocrea lixii</i> [AY605792.1]       | 100        | 810/810                    | AK112/99, AK170/06,<br>AK194/06, AK61/03,<br>AK84/93, CCF3814 | <i>H.lixii</i> / <i>T.harzianum</i>    |
| AK135/06 | tef1 (900bp)    | <i>Hypocrea lixii</i> [EF191322.1]       | 99         | 825/827                    | AK110/95, AK113/95,<br>AK39/06, AK44/05,<br>AK82/07, CCF2714  | <i>H.lixii</i> / <i>T.harzianum</i>    |
| AK60/03  | tef1 (900bp)    | <i>Hypocrea lixii</i> [EF191322.1]       | 99         | 825/827                    | AK13/05, AK233/94,<br>AK45/11, AK55/95,<br>AK61/97, AK95/06   | <i>H.lixii</i> / <i>T.harzianum</i>    |
| AK123/07 | tef1 (900bp)    | <i>Hypocrea lixii</i> [EF191329.1]       | 99         | 648/654                    | AK244/93, AK67/95                                             | <i>H.lixii</i> / <i>T.harzianum</i>    |
| AK108/95 | tef1 (900bp)    | <i>Hypocrea lixii</i> [EF392752.1]       | 99         | 713/716                    | AK175/95, AK183/02,<br>AK247/93, AK35/07,<br>AK73/92, T25     | <i>H.lixii</i> / <i>T.harzianum</i>    |
| T11      | tef1 (900bp)    | <i>Hypocrea lixii</i> [EU279990.1]       | 99         | 721/729                    | AK106/95, AK112/95,<br>T32, T35                               | <i>H.lixii</i> / <i>T.harzianum</i>    |
| AK200/06 | tef1 (900bp)    | <i>Hypocrea lixii</i> [FJ763170.1]       | 98         | 696/711                    |                                                               | <i>H.lixii</i> / <i>T.harzianum</i>    |
| AK71/92  | tef1 (900bp)    | <i>Hypocrea lixii</i> [FJ763170.1]       | 99         | 703/711                    | AK107/94, AK91/10,<br>AK94/10, CCF2687                        | <i>H.lixii</i> / <i>T.harzianum</i>    |

Tab. 12: pokračování

| kmen     | rDNA<br>(délka) | BLAST Match [Accession No.]                 | %<br>shody | Počet<br>shodných<br>pozic | Kmeny se stejným UP-<br>PCR fingerprintem                                                                                                                                                                                       | Taxonomické zařazení                 |
|----------|-----------------|---------------------------------------------|------------|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| CCF1555  | tef1 (900bp)    | <i>Hypocrea pachybasioides</i> [AY750886.1] | 99         | 527/531                    | AK188/02, AK221/01,<br>AK340, 44                                                                                                                                                                                                | <i>H.pachybasioides/T.polysporum</i> |
| CCF2823  | tef1 (900bp)    | <i>Hypocrea pachybasioides</i> [AY750886.1] | 99         | 527/531                    |                                                                                                                                                                                                                                 | <i>H.pachybasioides/T.polysporum</i> |
| AK185/02 | tef1 (900bp)    | <i>Hypocrea pachybasioides</i> [FJ860661.1] | 99         | 533/535                    | CCF3404, T16                                                                                                                                                                                                                    | <i>H.pachybasioides/T.polysporum</i> |
| AK101/00 | tef1 (900bp)    | <i>Hypocrea rufa</i> [DQ307543.1]           | 99         | 687/692                    | AK113/00, AK117/02,<br>AK177/02, AK184/02,<br>AK186/02, AK187/02,<br>AK204/01, AK207/96,<br>AK79/99, AK87/02,<br>AK92/00                                                                                                        | <i>H.rufa/T.viride</i>               |
| AK114/00 | tef1 (900bp)    | <i>Hypocrea rufa</i> [DQ307543.1]           | 99         | 687/692                    | AK103/00, AK104/00,<br>AK124/94, AK131/00,<br>AK134/02, AK137/02,<br>AK176/00, AK177/01,<br>AK185/01,<br>AK187/01, AK40/06,<br>AK43/02, AK81/91,<br>AK89/10, AK93/00,<br>AK93/11, AK97/00,<br>AK98/00, CCF3231, T4,<br>T20, T22 | <i>H.rufa/T.viride</i>               |

Tab. 12: pokračování

| kmen     | rDNA<br>(délka) | BLAST Match [Accession No.]              | %<br>shody | Počet<br>shodných<br>pozic | Kmeny se stejným UP-<br>PCR fingerprintem                                                           | Taxonomické zařazení               |
|----------|-----------------|------------------------------------------|------------|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| AK291/05 | tef1 (900bp)    | <i>Hypocrea rufa</i> [DQ307543.1]        | 99         | 721/726                    | AK103/05, AK132/00,<br>AK167/94, AK170/00,<br>AK195/06, AK202/01,<br>AK36/06, AK390, T3,<br>T6, T23 | <i>H.rufa/T.viride</i>             |
| AK37/06  | tef1 (900bp)    | <i>Hypocrea rufa</i> [DQ307543.1]        | 99         | 721/726                    | AK130/00, AK162/01,<br>AK173/00, AK43/05,<br>AK60/97, CCF3231                                       | <i>H.rufa/T.viride</i>             |
| AK126/96 | tef1 (900bp)    | <i>Hypocrea rufa</i> [EU280018.1]        | 99         | 554/558                    | AK34/10, AK35/10,<br>AK390, AK86/02,                                                                | <i>H.rufa/T.viride</i>             |
| AK71/07  | tef1 (900bp)    | <i>Hypocrea rufa</i> FJ763170.1]         | 98         | 696/711                    | AK110/02, AK171/00,<br>AK172/00, A234/01,<br>AK66/04, CCF1403                                       | <i>H.rufa/T.viride</i>             |
| CCF1611  | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma viride</i> [EU280018.1]   | 99         | 666/671                    | AK69/07, T33                                                                                        | <i>H.rufa/T.viride</i>             |
| AK89/00  | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma viride</i> [EU280018.1]   | 98         | 683/698                    | T27                                                                                                 | <i>H.rufa/T.viride</i>             |
| CCF2848  | tef1 (900bp)    | <i>Hypocrea virens</i> [EU280059.1]      | 99         | 680/682                    | AK112/11, AK134/06,<br>AK188/99, AK46/05,<br>CCF2889, T28                                           | <i>H.virens/T.virens</i>           |
| AK124/07 | tef1 (900bp)    | <i>Hypocrea virens</i> [EU280063.1]      | 99         | 650/655                    | AK122/06, AK149/05,<br>AK198/06, AK220/06,<br>T42                                                   | <i>H.virens/T.virens</i>           |
| AK174/00 | tef1 (900bp)    | <i>Hypocrea viridescens</i> [EU279999.1] | 99         | 515/521                    | AK169/00, AK257/93,<br>T40, T43                                                                     | <i>H.viridescens/T.viridescens</i> |

Tab. 12: pokračování

| kmen     | rDNA<br>(délka) | BLAST Match [Accession No.]                 | %<br>shody | Počet<br>shodných<br>pozic | Kmeny se stejným UP-<br>PCR fingerprintem    | Taxonomické zařazení                        |
|----------|-----------------|---------------------------------------------|------------|----------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------|
| AK186/01 | tef1 (900bp)    | <i>Hypocrea viridescens</i> [EU279999.1]    | 99         | 751/765                    | AK239/93, T5                                 | <i>H.viridescens</i> / <i>T.viridescens</i> |
| AK70/03  | tef1 (900bp)    | <i>Hypocrea viridescens</i> [EU279999.1]    | 99         | 751/765                    | AK253/93, T36                                | <i>H.viridescens</i> / <i>T.viridescens</i> |
| T31      | tef1 (900bp)    | <i>Hypocrea viridescens</i> [EU280016.1]    | 99         | 726/733                    |                                              | <i>H.viridescens</i> / <i>T.viridescens</i> |
| AK94/00  | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma viridescens</i> [EU279999.1] | 98         | 591/603                    | T10                                          | <i>H.viridescens</i> / <i>T.viridescens</i> |
| AK221/94 | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma aggressivum</i> [AY605798]   | 99         | 869/872                    | AK182/02                                     | <i>T. aggressivum</i>                       |
| T29      | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma atroviride</i> [AB280011.1]  | 99         | 701/705                    | AK118/11, AK220/94                           | <i>H.atroviridis</i> / <i>T.atroviride</i>  |
| AK26/10  | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma atroviride</i> [AB558914.1]  | 97         | 614/632                    | AK6/92, AK72/07                              | <i>H.atroviridis</i> / <i>T.atroviride</i>  |
| AK86/93  | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma atroviride</i> [AB558914.1]  | 99         | 652/653                    | AK113/99, AK114/11,<br>AK21/94, AK83/93, T24 | <i>H.atroviridis</i> / <i>T.atroviride</i>  |
| AK165/91 | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma atroviride</i> [AB558914.1]  | 100        | 829/829                    | AK114/95, AK175/91,<br>AK23/94, CCF3910      | <i>H.atroviridis</i> / <i>T.atroviride</i>  |
| AK164/91 | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma atroviride</i> [AB558914.1]  | 99         | 786/791                    | AK220/94, CCF2691,<br>T46                    | <i>H.atroviridis</i> / <i>T.atroviride</i>  |

Tab. 12: pokračování

| kmen     | rDNA<br>(délka) | BLAST Match [Accession No.]                   | %<br>shody | Počet<br>shodných<br>pozic | Kmeny se stejným UP-<br>PCR fingerprintem                                | Taxonomické zařazení                  |
|----------|-----------------|-----------------------------------------------|------------|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| AK116/99 | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma citrinoviride</i> [EU280036.1] | 99         | 822/827                    |                                                                          | <i>H.schweinitzii/T.citrinoviride</i> |
| AK167/91 | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma citrinoviride</i> [EU280036.1] | 99         | 829/832                    | AK51/94, CCF1455                                                         | <i>H.schweinitzii/T.citrinoviride</i> |
| CCF2715  | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma citrinoviride</i> [EU280036.1] | 99         | 822/824                    | AK145/96, AK90/10,<br>CCF1352, CCF3911                                   | <i>H.schweinitzii/T.citrinoviride</i> |
| CCF2768  | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma citrinoviride</i> [EU280036.1] | 99         | 697/706                    | AK16/00                                                                  | <i>H.schweinitzii/T.citrinoviride</i> |
| AK184/06 | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma gamsii</i> [EU280005.1]        | 98         | 814/834                    |                                                                          | <i>T.gamsii</i>                       |
| AK341    | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma ghanense</i> [EU280043.1]      | 98         | 800/816                    |                                                                          | <i>T.ghanense</i>                     |
| AK111/95 | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma hamatum</i> [EU279965.1]       | 98         | 602/614                    | AK254/93, T37, T39                                                       | <i>T.hamatum</i>                      |
| AK34/07  | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma hamatum</i> [EU279965.1]       | 99         | 611/618                    | AK203/01, AK254/93,<br>AK38/07, AK416,<br>AK62/94, T18, T30,<br>T34, T41 | <i>T.hamatum</i>                      |
| AK40/07  | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma hamatum</i> [EU279965.1]       | 98         | 706/721                    | AK121/99, AK15/94,<br>AK22/94, AK256/93,<br>CCF2390, T15                 | <i>T.hamatum</i>                      |

Tab. 12: pokračování

| kmen     | rDNA<br>(délka) | BLAST Match [Accession No.]                     | %<br>shody | Počet<br>shodných<br>pozic | Kmeny se stejným UP-<br>PCR fingerprintem | Taxonomické zařazení                 |
|----------|-----------------|-------------------------------------------------|------------|----------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|
| AK74/07  | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma hamatum</i> [EU279965.1]         | 98         | 602/614                    | AK111/02, T21                             | <i>T.hamatum</i>                     |
| AK283/05 | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma koningiopsis</i> [AB548214.1]    | 97         | 597/616                    | AK232/94                                  | <i>H.koningiopsis/T.koningiopsis</i> |
| AK109/95 | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma koningiopsis</i> [EU280028.1]    | 97         | 688/708                    | AK76/07                                   | <i>H.koningiopsis/T.koningiopsis</i> |
| AK197/06 | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma koningiopsis</i> [EU280028.1]    | 98         | 694/708                    | AK16/97, AK76/07                          | <i>H.koningiopsis/T.koningiopsis</i> |
| AK70/07  | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma koningiopsis</i> [EU280028.1]    | 98         | 755/769                    | AK68/07, AK73/07, T1                      | <i>H.koningiopsis/T.koningiopsis</i> |
| AK109/94 | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma koningiopsis</i> [EU280028.1]    | 99         | 714/716                    |                                           | <i>T. koningiopsis</i>               |
| AK158/01 | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma longibrachiatum</i> [AB568377.1] | 98         | 668/684                    | AK37/00, T23                              | <i>T. longibrachiatum</i>            |
| AK186/06 | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma longibrachiatum</i> [AB568377.1] | 99         | 680/684                    |                                           | <i>T.longibrachiatum</i>             |
| AK120/96 | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma longipile</i> [EU280051.1]       | 99         | 697/700                    |                                           | <i>T.longipile</i>                   |
| AK192/01 | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma longipile</i> [EU280051.1]       | 98         | 672/689                    |                                           | <i>T.longipile</i>                   |

Tab. 12: pokračování

| kmen     | rDNA<br>(délka) | BLAST Match [Accession No.]                   | %<br>shody | Počet<br>shodných<br>pozic | Kmeny se stejným UP-<br>PCR fingerprintem | Taxonomické zařazení       |
|----------|-----------------|-----------------------------------------------|------------|----------------------------|-------------------------------------------|----------------------------|
| AK6/06   | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma longipile</i> [EU280051.1]     | 98         | 672/689                    |                                           | <i>T.longipile</i>         |
| AK93/06  | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma longipile</i> [EU280051.1]     | 98         | 672/689                    |                                           | <i>T.longipile</i>         |
| CCF3126  | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma longipile</i> [EU280051.1]     | 98         | 672/689                    |                                           | <i>T.longipile</i>         |
| CCF1887  | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma reesei</i> [Z23012.1]          | 98         | 644/658                    |                                           | <i>H.jecorina/T.reesei</i> |
| CCF1855  | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma reesei</i> [Z23012.1]          | 99         | 727/732                    |                                           | <i>H.jecorina/T.reesei</i> |
| CCF3150  | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma rossicum</i> [EU280062.1]      | 99         | 934/937                    |                                           | <i>T. rossicum</i>         |
| CCF2983  | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma saturnisporum</i> [JN175581.1] | 99         | 622/627                    | T17                                       | <i>T.saturnisporum</i>     |
| T45      | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma saturnisporum</i> [JN175581.1] | 99         | 650/654                    |                                           | <i>T.saturnisporum</i>     |
| AK226/01 | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma tomentosum</i> [AY605761.1]    | 98         | 760/779                    |                                           | <i>T.tomentosum</i>        |
| AK80/99  | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma tomentosum</i> [AY605780.1]    | 99         | 601/605                    |                                           | <i>T. tomentosum</i>       |

Tab. 12: pokračování

| kmen     | rDNA<br>(délka) | BLAST Match [Accession No.]                  | %<br>shody | Počet<br>shodných<br>pozic | Kmeny se stejným UP-<br>PCR fingerprintem                    | Taxonomické zařazení         |
|----------|-----------------|----------------------------------------------|------------|----------------------------|--------------------------------------------------------------|------------------------------|
| AK52/94  | tef1 (900bp)    | <i>Trichoderma tomentosum</i> [EU279969.1]   | 99         | 723/724                    |                                                              | <i>T. tomentosum</i>         |
| AK185/06 | ITS1<br>(900bp) | <i>Hypocrea jecorina</i> [AF510497.1]        | 99         | 827/838                    |                                                              | <i>H.jecorina/T.reesei</i>   |
| AK36/07  | ITS1<br>(900bp) | <i>Hypocrea konigii</i> [FJ430782.1]         | 99         | 832/835                    | AK75/07, T2                                                  | <i>H.koningii/T. konigii</i> |
| AK289/05 | ITS1<br>(900bp) | <i>Hypocrea lixii</i> [GQ328856.1]           | 99         | 818/824                    | AK32/98, AK68/95,<br>CCF2713, T19, T38                       | <i>H.lixii/T.harzianum</i>   |
| CCF3813  | ITS1<br>(900bp) | <i>Trichoderma koningiopsis</i> [FJ430784.1] | 99         | 798/807                    | AK135/02, AK178/99,<br>AK38/06, AK45/05,<br>AK90/00, CCF3912 | <i>T. koningiopsis</i>       |
| AK199/06 | ITS1<br>(900bp) | <i>Trichoderma koningiopsis</i> [FJ430784.1] | 99         | 802/804                    | AK183/06, AK39/07,<br>AK94/06                                | <i>T. koningiopsis</i>       |

#### 4.2.1 Charakteristika druhů rodu *Trichoderma* dosud neznámých z území České republiky

*Trichoderma crassum* Bissett 1991, teleomorfa *Hypocrea crassa* P. Chaverri & Samuels

Originální citace: Bissett J. (1991): A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. - Can. J. Bot. 69: 2373-2417.

Studované izoláty:

AK 110/91: půda bukosmrkového lesa, Smrček u Pernštejna, Morava (izolace VIII. 1991)

Fenotypové znaky:

Kolonie na PDA při 22°C rychle rostoucí (při 35°C neroste), nejprve bílé, postupně světle zelené, sporulace efuzní. Bez charakteristické vůně. Byla pozorována žlutá pigmentace agaru. Konidiofory s hlavním vláknem zpravidla rovným. Boční větve (v několika případech zakončené sterilním výběžkem) vyrůstají nepravidelně a nesou nahloučené přesleny se 2-5 fialidami. Fialidy jsou obvykle lahvovitého tvaru, zužující se k bázi. Rozměry fialid jsou následující; délka: (8,5-)13,6-15,7(28,0) µm, šířka v nejširším místě: (3,3-)4,3-4,6(-5,7) µm.

Konidie protáhle elipsovité, hladké, zelené, (3,6-)3,9-5,2(-5,3) x (2,4-)2,6-3,6(-3,8) µm.

V kultuře se může tvořit synanamorfa typu *Gliocladium* (s přitisklými fialidami), kterou jsem u sledovaného kmene nezaznamenala.

Růstové znaky kolonií i mikroskopické znaky odpovídají originálnímu popisu. Izolát primárně identifikován analýzou tefla.

Výskyt a rozšíření ve světě:

Substrát: půda, rozkládající se dřevo (Samuels a kol. 2013)

Rozšíření: Severní a stř. Amerika, Nový Zéland, Thajsko (Chaverri a Samuels 2003, Samuels a kol. 2013).

Současný nález druhu *T. crassum* je tedy novým nálezem nejen pro Českou republiku, ale pravděpodobně i pro Evropu.

Morfologicky podobné druhy: *Trichoderma virens* (tvoří konidiofory typu *Gliocladium* jako *T. crassum*, konidie jsou takřka shodné velikosti a tvaru) se od *T. crassum* liší schopností růstu při 35 °C a poněkud rychlejším růstem při 25-30 °C a hojnou tvorbou chlamydospor). *T. crassum* tvoří obvykle sterilní výběžky (při mém pozorování nezaznamenané), čímž se liší jak od *T. virens*, tak od *T. flavofuscum* (Samuels a kol. 2013). *Trichoderma flavofuscum* tvoří rovněž konidiofory typu *Gliocladium*, liší se však žlutavými konidii, tvorbou chlamydospor a růstem při 35 °C; Chaverri a Samuels (2003) ji na základě studia molekulárních znaků považují za synonymum druhu *T. virens*.

---

*Trichoderma gamsii* Samuels & Druzhinina 2006, teleomorfa není známa

Originální citace: Jaklitsch W. M., Samuels G. J., Dodd S. J., Lu B., Druzhinina I.S. (2006): *Hypocrea rufa/ Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. - Stud. Mycol. 56: 135-177.

Studované izoláty:

AK 184/06: půda pastviny, Netluky u Prahy, stř. Čechy (izolace VIII. 2006)

Fenotypové znaky:

Kolonie na PDA při 22°C velmi rychle rostoucí, při vyšší teplotě (35°C) jen nepatrný nárůst. Nejprve se vytvářejí bílé pustuly, postupně získávají žlutou až zelenavou barvu, mycelium produkuje žlutý pigment a slabou vůni připomínající kokosové aroma. Byla zaznamenána též tvorba vzdušného mycelia. Konidiofory s hlavním vláknem rovným, s bočními větvemi vyrůstající obvykle v páru. Boční větve nesou fialidy - obvykle solitérní, několikrát však byly pozorovány též dvojice fialid. Fialidy lahvovité s výrazně rozšířenou střední částí a protáhlým vrcholkem. Délka fialid: (5,2-)8,5-10,0(-18,5) µm, šířka v nejširším místě: (1,5-)2,2-3,0(-4,0) µm (Samuels a kol. 2013).

Konidie jsou žluté až zelené, podlouhlé, hladké, (3,7-)4,1-5,0(-5,5) x (2,3-)2,8-3,5(-3,8) µm.

Růstové znaky kolonií i mikroskopické znaky odpovídají originálnímu popisu.

Izolát primárně identifikován analýzou ITS a tef1 $\alpha$ .

Výskyt a rozšíření ve světě:

Substrát: půda, izolována též jako endofyt *Ricinus communis*, *Lens esculenta* aj. (Rinu a kol. 2013, Samuels a kol. 2013).

Rozšíření: Itálie (Sardinie), Polsko, Rumunsko, Rusko, Indie, Austrálie, Spojené státy americké (Texas), Guatemala, Jihoafrická republika, Rwanda (Jaklitsch a kol. 2006, Blaszczyk a kol. 2011, Kamala a kol. 2013, Samuels a kol. 2013).

Morfologicky podobné druhy: *Trichoderma koningii*, *Trichoderma koningiopsis*. *Trichoderma gamsii* se však liší častou tvorbou prolifерujících fialid, které jsem při vlastních pozorováních nezaznamenala. Konidie *T. gamsii* navíc mají nejvyšší hodnotu poměru délky a šířky ze všech dosud známých druhů rodu *Trichoderma* (Jaklitsch a kol. 2006, Samuels a kol. 2013).

---

*Trichoderma ghanense* Yoshim. Doi, Abe & Sugi. 1987, teleomorfa není známa

Originální citace: Doi Y., Abe Y., Sugiyama J. (1987): *Trichoderma* sect. Saturnisporum, sect. nov. and *Trichoderma ghanense*, sp. nov.. - Bull. Natl. Sci. Mus. Tokio 13: 1-9.

Studované izoláty:

AK 341: půda smíšeného porostu na břehu Ohře, Postoloprty, SZ Čechy (III. 1989)

Fenotypové znaky:

Kolonie na PDA při běžné teplotě rychle rostoucí, při vyšší teplotě (35°C) též rychlý růst. Kolonie postupně získávají tmavě zelené zbarvení, nedochází k produkci pigmentu. Tvorba pustul nebyla opzorována. Bez charakteristické vůně. Konidiofory s charakteristicky silným rovným hlavním vláknem a párovitě postavenými bočními větvemi. Hlavní vlákno i boční větve nesou solitérní fialidy. Fialidy cylindrické, mnohdy lehce zahnuté. Délka fialid: (4,5-)6,0-10,5(-15,0)  $\mu\text{m}$ , šířka v nejširším místě: (2,0-)2.,5-3,5(-4,5)  $\mu\text{m}$  (Samuels a kol. 2013).

Konidie jsou zelené, elipsovité, hladké (výjimečně i mírně tuberkulózní), (3,8-4,5-5,6(-5,9) x (2,1-)2,2-3,0(-3,2)  $\mu\text{m}$ .

Růstové znaky kolonií i mikroskopické znaky odpovídají originálnímu popisu. Izolát primárně identifikován analýzou tef1 $\alpha$ .

Výskyt a rozšíření ve světě:

Substrát: půda, jehličnatý opad, *Theobroma cacao* (Samuels a kol. 2013)

Rozšíření: Amerika, Západní Afrika, Evropa, JV Asie, Austrálie (Samuels a kol. 2013).

Morfologicky podobné druhy: *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma saturnisporum* (Chaverri a kol. 2003). Hlavní vlákno však u *T. asperellum* i *T. saturnisporum* nese obvykle fialidy v přeslenech, na rozdíl od *T. ghanense* mající fialidy zpravidla solitérní. *Trichoderma ghanense* tvoří mírně tuberkulátní konidie, avšak tento znak není vždy pozorovatelný, což může vést k mylné identifikaci.

---

*Trichoderma rossicum* Bissett, C. P. Kubicek & Szakacs 2003, teleomorfa není známa

Originální citace: Bissett J., Szakacs G., Nolan C. A., Druzhinina I., Gradinger C., Kubicek C. P. (2003): New species of *Trichoderma* from Asia. - *Canad. J. Bot.* 81 (6): 570-586.

Studované izoláty:

CCF 3150: půda bukosmrkového lesa, Obří důl, Krkonoše, S Čechy (izolace IX. 2000); v CCF uchováván pod jménem *Trichoderma polysporum*.

Fenotypové znaky:

Na PDA vytváří při běžné teplotě pomalu rostoucí kolonie. Ty jsou bílé až světle nazelenalé. Hojně se vytváří vzdušné mycelium, nedochází k produkci pigmentu. Bez charakteristického zápachu. Jako všechny druhy náležící do sekce *Pachybasium* tvoří konidiofory jednotlivá vlákna s terminálním přeslenem fialid.

Konidie jsou hyalinní až světle zelené, obvykle cylindrického tvaru, hladké, (4,0-)4,3-5,6(-6,0) x (2,0-)2,3-2,9(-3,4)  $\mu\text{m}$ .

Růstové znaky kolonií i mikroskopické znaky odpovídají originálnímu popisu. Izolát primárně identifikován analýzou tef1 $\alpha$ .

Výskyt a rozšíření ve světě:

Substrát: půda, opad (Samuels a kol. 2013). Rozšíření: Rakousko, Rusko, Mexiko (Friedl a Druzhinina 2012, Samuels a kol. 2013).

Morfologicky podobné druhy: *Trichoderma stromaticum* (Bissett a kol. 2003). Hlavním rozlišením od *T. rossicum* je menší velikost, elipsovitý tvar a tmavší zbarvení konidií (Samuels a kol. 2013). Bílé zbarvení kolonií může vést k záměně s bíle sporujícími druhy, např. *T. polysporum*.

---

*Trichoderma longipile* Bissett 1991, teleomorfa *Hypocrea longipilosa* Jaklitsch 2009

Originální citace: Bissett J. (1991): A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section Pachybasium. - Can. J. Bot. 69: 2373-2417.

Studované izoláty:

AK 120/96: půda bukového lesa, Čertovo jezero, Šumava, JZ Čechy (izolace VII. 1996)

AK 93/06: antropogenní půda, odkaliště Chvaletice, V Čechy

AK 192/01: dřevo v kryptě kostela, Kynšperk nad Ohří, Z Čechy (izolace IX. 2001)

AK 6/06: substrát pískovcového osypu, Borový důl, České Švýcarsko, S Čechy (izolace XII. 2005)

CCF 3126: povrchová voda (rybník), Stráž pod Ralskem, S Čechy (izolace VI. 1999); v CCF uchováván pod jménem *Trichoderma atroviride*.

Fenotypové znaky:

Kolonie na PDA při 22°C poměrně pomalu rostoucí, při vyšší teplotě (35°C) nedochází k růstu mycelia. Nejprve se vytvářejí drobné pustuly bílé barvy, později se zbarvují šedě či zeleně. Neprodukuje žádný pigment ani charakteristickou vůni. Konidiofory jsou tvořeny hlavním vláknem, na němž se poměrně řídce vyskytují solitérní postranní větve. Boční větve nesou lahvovité, při bázi výrazně zúžené fialidy v přeslenech.

Konidie jsou šedé až zelené, válcovité, lehce protáhlé, hladké, (4,0-)4,5-5,2(-5,6) x (2,0-)2,2-3,0(-3,3)  $\mu\text{m}$ .

Růstové znaky kolonií i mikroskopické znaky odpovídají originálnímu popisu. Izoláty primárně identifikovány analýzou ITS a tef1 $\alpha$ .

Výskyt a rozšíření ve světě:

Substrát: rozkládající se dřevo, opad, půda (Bissett 1991c, Jaklitsch 2009).

Rozšíření: Severní Amerika, Evropa (Chaverri a kol. 2003, Jaklitsch 2009).

Morfologicky podobné druhy: *Trichoderma strictipile*, *Trichoderma spirale* (Chaverri a kol. 2003). Druh *T. spirale* se odlišuje přítomností terminálních či interkalárních chlamydospor, podobné druhy zároveň tvoří velikostně menší konidie, u *T. spirale* dosahující maximálně 4,8  $\mu\text{m}$  u *T. strictipile* dokonce jen 4,1  $\mu\text{m}$ . Podle Bissetta (1991c) je morfologicky takřka k nerozeznání od blízce příbuzného druhu *Trichoderma oblongisporum*.

---

#### **4.2.2 Trichoderma sp. AK 115/00**

##### **4.2.2.1 Morfologická charakteristika**

Substrát a lokalita nálezů: půda smíšeného lesa; Albeř, Nová Bystřice, jižní Čechy; 650 m n. m.

Datum izolace: září 2000

Fenotypové znaky:

Kolonie na PDA při 30°C poměrně pomalu rostoucí, nárůst za 72 hodin 7 - 10 cm. Naočkované Petriho misky s PDA při 35°C a 40°C po 72 hodinách nevykazovaly žádný nárůst mycelia. Žádný nárůst mycelia neproběhl po 72 hodinách též na SNA při 35°C. Charakter kolonií a fenotypové znaky jsou viditelné na Obr. 7 - 12.

Na PDA při laboratorní teplotě došlo po 4 dnech k růstu drobných bělavých pustul, které se později zbarvily světle až tmavě zeleně. Kolonie na PDA produkovaly světle žlutý pigment, avšak nevytvářely žádnou specifickou vůni.

Konidiofory vytváří tzv. "Pachybasium-like" větvení. Hlavní vlákno s krátkými postranními větvemi nesoucími krátké a široké fialidy rostoucí obvykle v

přeslenu. Délka fialid odpovídá rozměrům (4,0-)6,3-7,7(-9,6)  $\mu\text{m}$ , šířka v nejširším místě (2,2-)2,6-3,7(-4,6)  $\mu\text{m}$ .

Konidie jsou tmavě šedé až zelené, elipsovité až podlouhlé, hladké, (4,8-)5,2-5,7(-6,4) x (3,0-)3,5-3,9(-4,1)  $\mu\text{m}$ .

Morfologicky podobné druhy: *Trichoderma fertile*, *Trichoderma oblongisporum* (Samuels a kol. 2013). Oba tyto druhy se však zároveň liší přítomností chlamydospor, které u izolátu AK 115/00 pozorovány nebyly. Tvarem a velikostí konidií se blíží spíše *T. oblongisporum*, která má (stejně jako AK 155/00) výrazně větší konidie než *T. fertile*.

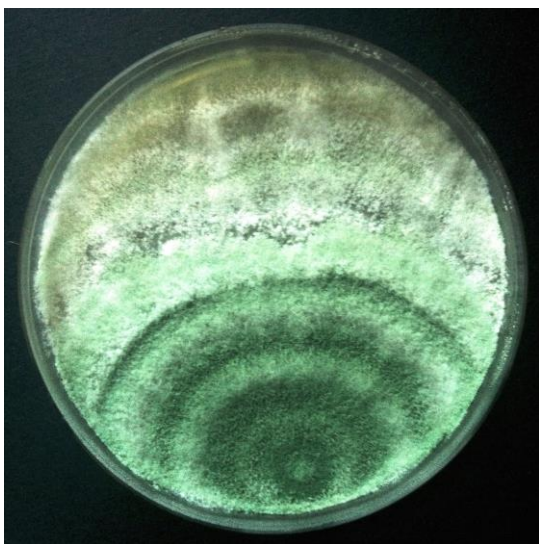
#### 4.2.2.2 Taxonomické zařazení

Pro zařazení kmene AK 115/00 do stávajícího systému rodu *Trichoderma* byly sestaveny kladogramy založené na oblasti genů rpb2, ITS, tef1 $\alpha$  - int4 a tef1 $\alpha$  - int5. Kladogramy jsem sestrojila pomocí metod Minimum evolution a Maximum likelihood za použití programu MEGA5 (Tamura a kol. 2011). Topologie (rozlišení sekcí a clades) bylo stejné u obou použitých metod. Metoda Minimum Evolution však vygenerovala kladogramy s většími podporami, a proto jsou v předkládané práci publikovány pouze kladogramy získané metodou Minimum Evolution, substituční model LogDet; bootstrap 500 opakování. Hlavním cílem analýz bylo umístění nového druhu (AK 115/00) do systému rodu *Trichoderma*, což se podařilo, potvrzují to 4 použité úseky rDNA i dva typy pilotních analýz. Na základě zjištěných příbuzenských vztahů byl nově nalezený druh *Trichoderma* sp. (AK 115/00) zařazen do sekce Pachybasium, Clade Semiorbis. Nejbližšími fylogeneticky příbuznými druhy jsou *Hypocrea hunua*, *Trichoderma moravica*, *Trichoderma fertile*, *Trichoderma semiorbis*, *Trichoderma oblongisporum* a *Trichoderma fomiticola*.

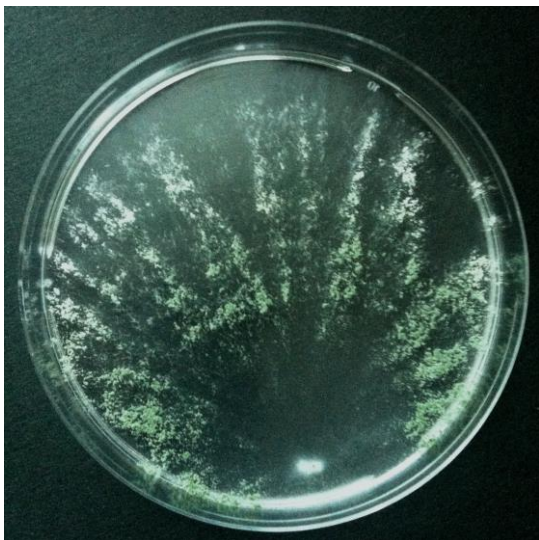
Zařazení jednotlivých kmenů do stávajícího systému rodu *Trichoderma* je znázorněno na Obr. 13 - 16.



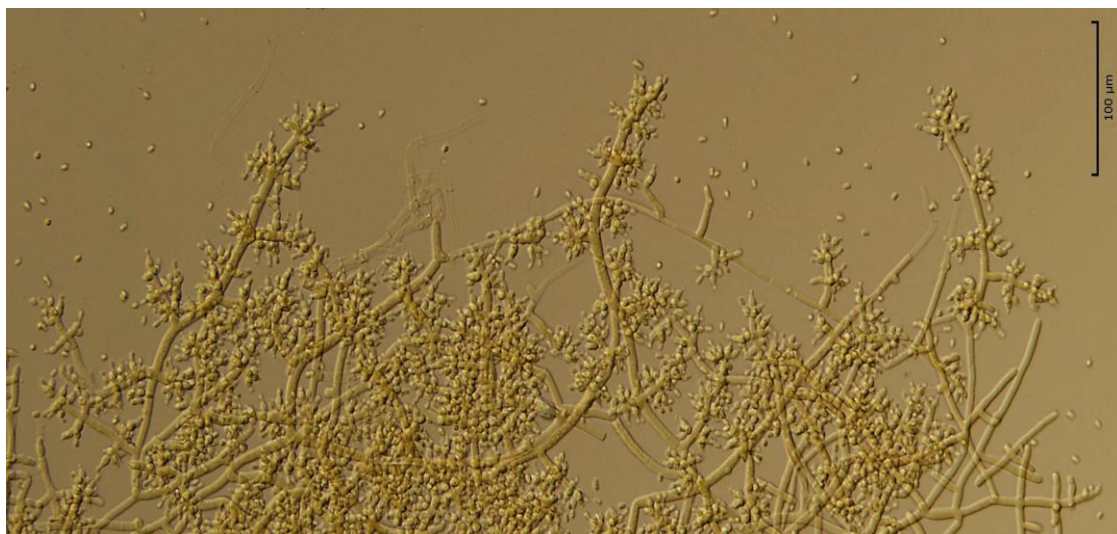
Obr. 7: *Trichoderma* sp. AK 115/00 - kolonie na PDA po 7 dnech při 22°C



Obr. 8: *Trichoderma* sp. AK 115/00 - kolonie na PDA po 14 dnech při 22°C



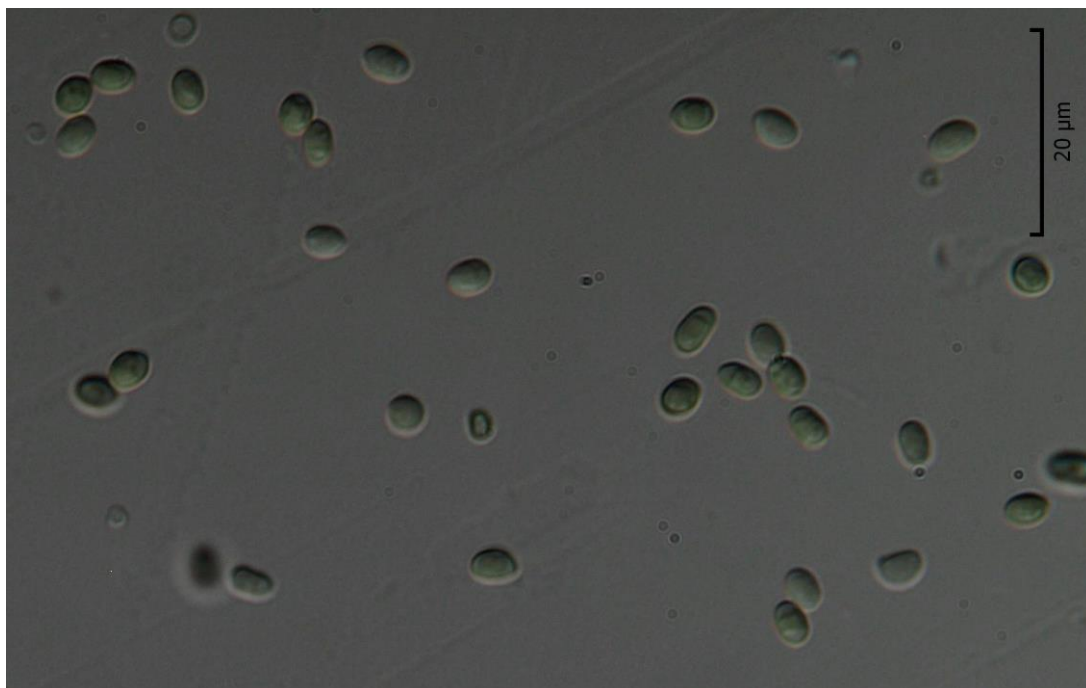
Obr. 9: *Trichoderma* sp. AK 115/00 - kolonie na SNA po 14 dnech při 22°C



Obr. 10: *Trichoderma* sp. AK 115/00 - konidiofory (Melzerovo činidlo, zvětšení 400x)

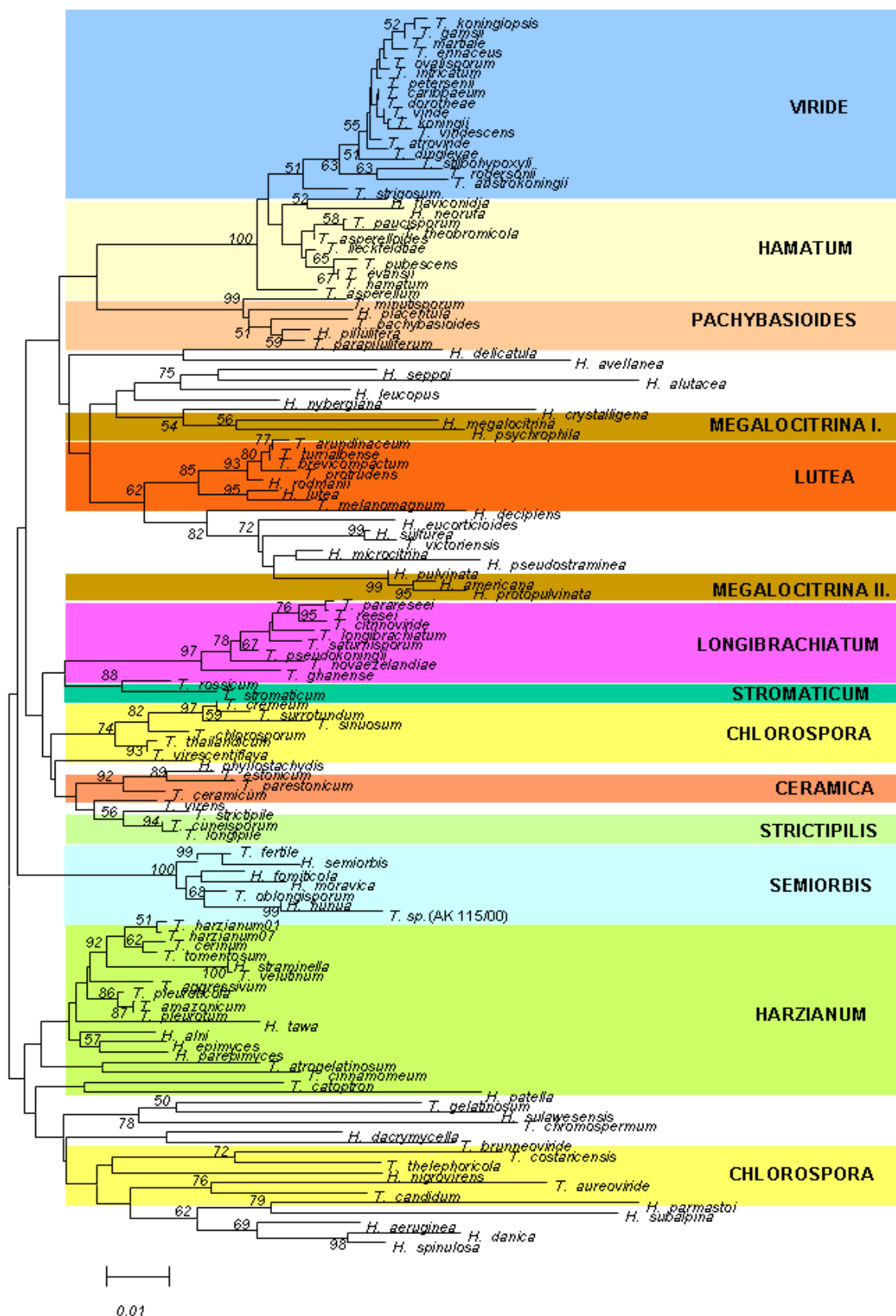


Obr. 11: *Trichoderma* sp. AK 115/00 - konidiofor (Melzerovo činidlo, zvětšení 640x)

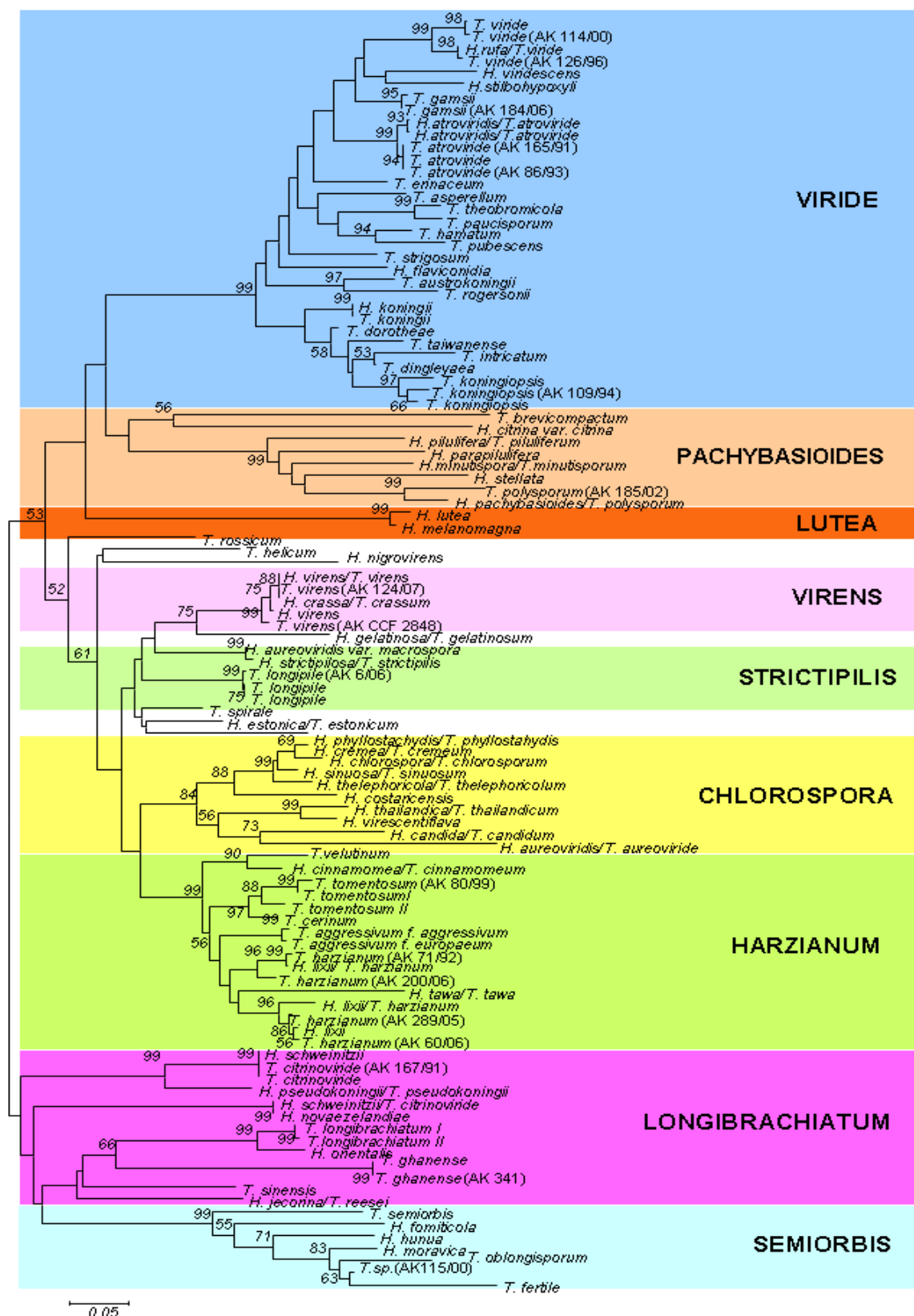


Obr. 12: *Trichoderma* sp. AK 115/00 - konidie (kyselina mléčná s bavlnovou modří, zvětšení 1000x)

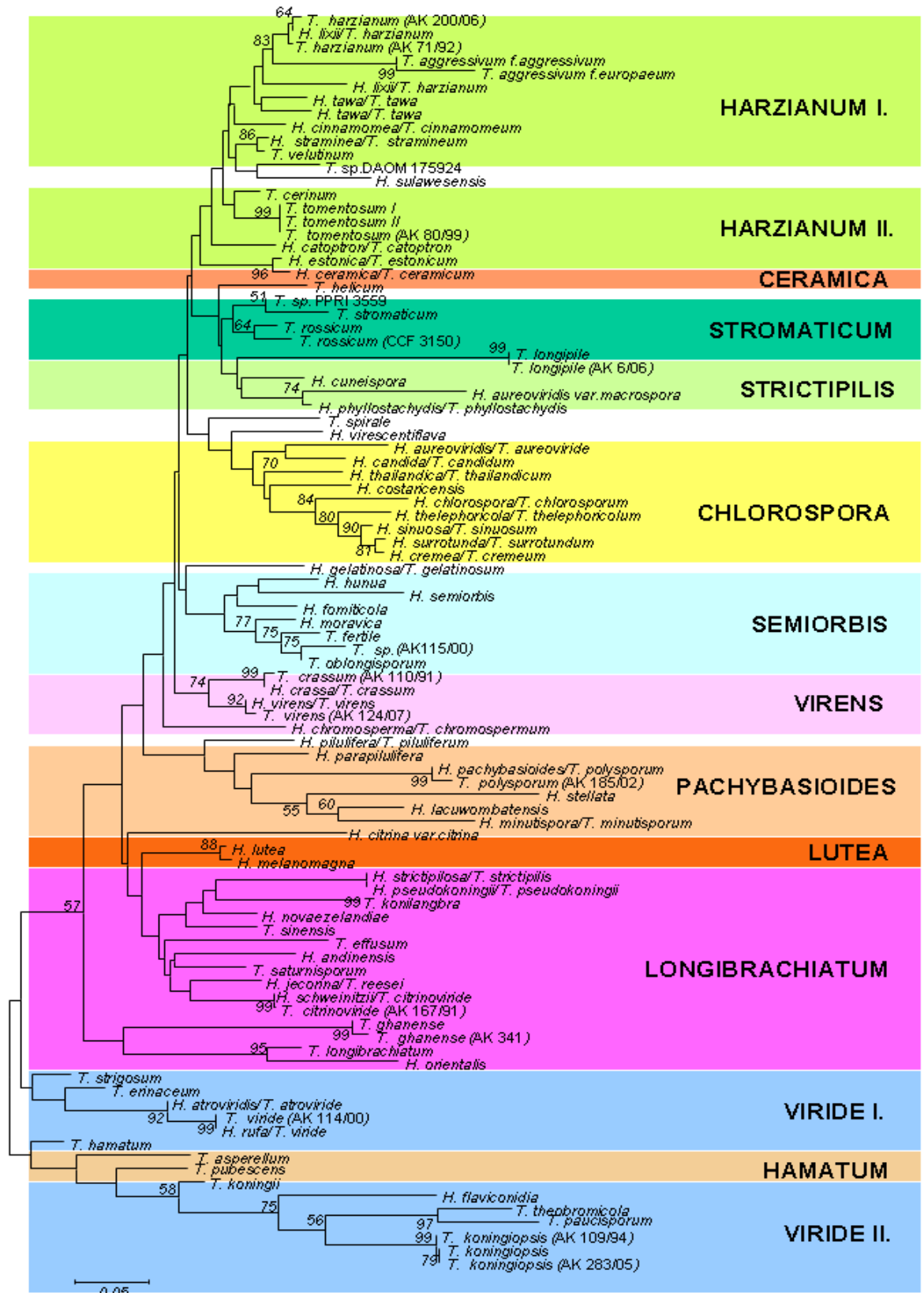
Obr. 13: Postavení nepopsaného taxonu (AK 115/00) v stávajícího systému rodu *Trichoderma*. (Fylogenetický strom založený na genu ITS1 a 4; metoda Minimum Evolution (MEGA5); substituční model LogDet; bootstrap 500 opakování).



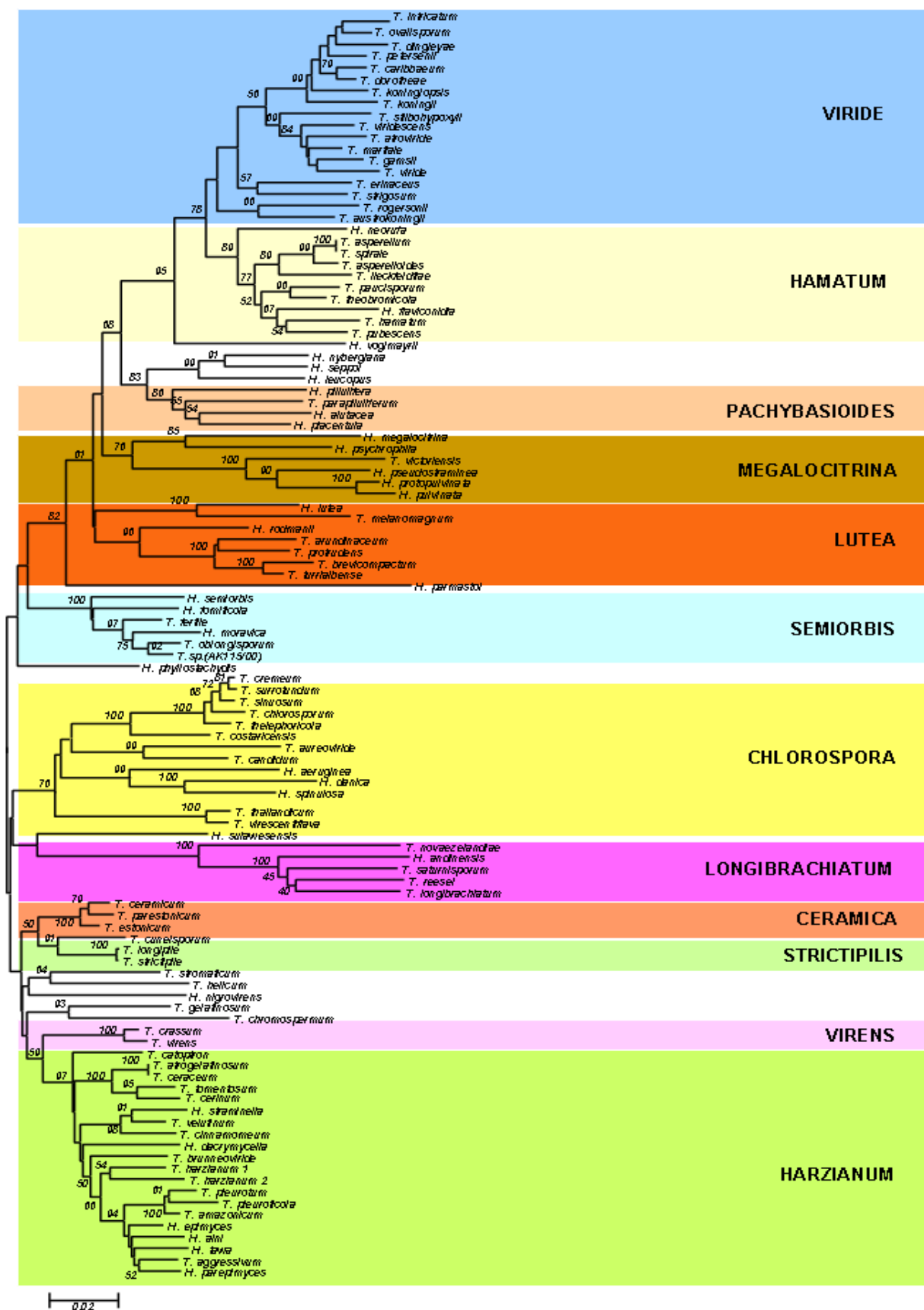
Obr. 14: Postavení studovaných izolátů včetně nepopsaného taxonu (AK 115/00) v stávajícího systému rodu *Trichoderma*. (Fylogenetický strom založený na genu *teflα-int4*; metoda Minimum Evolution (MEGA5); substituční model LogDet; bootstrap 500 opakování).



Obr. 15: Postavení studovaných izolátů včetně nepopsaného taxonu (AK 115/00) v stávajícího systému rodu *Trichoderma*. (Fylogenetický strom založený na genu *teflα - int5*; metoda Minimum Evolution (MEGA5); substituční model LogDet; bootstrap 500 opakování).



Obr. 16: Postavení nepopsaného taxonu (AK 115/00) v stávajícího systému rodu *Trichoderma*. (Fylogenetický strom založený na genu rpb2; metoda Minimum Evolution (MEGA5); substituční model LogDet; bootstrap 500 opakování).



#### 4.3 DIVERZITA RODU *TRICHODERMA* NA ÚZEMÍ ČESKÉ REPUBLIKY

Celkem je tedy v současné době z našeho území známo celkem 34 druhů potvrzených na základě sekvence DNA, což odpovídá přibližně 19 % z celkové známé diverzity rodu *Trichoderma*. Souborný přehled všech dosud zjištěných druhů rodu *Trichoderma* z území České republiky s použitou metodikou (morf = charakteristika dle fenotypových znaků, mol = určení molekulárními metodami) uvádí Tab. 13.

Tab. 13: Souborný přehled všech dosud zjištěných druhů rodu *Trichoderma* z území ČR (podle Jaklitch 2009, 2011, Ptáčnicková 2010, Nováková a kol. 2012, Kubátová a kol. 2009, Hujšlová 2006, Hujšlová a kol. 2010, Bukovská a kol. 2010, tato diplomová práce)

| DRUH                               | POUŽITÁ METODIKA |
|------------------------------------|------------------|
| <i>Trichoderma aggressivum</i>     | mol              |
| <i>Trichoderma atroviride</i>      | morf, mol        |
| <i>Trichoderma aureoviride</i>     | morf             |
| <i>Trichoderma citrinoviride</i>   | morf, mol        |
| <i>Trichoderma crassum</i>         | mol              |
| <i>Trichoderma dacrymycellum</i>   | mol              |
| <i>Trichoderma fertile</i>         | mol              |
| <i>Trichoderma gamsii</i>          | mol              |
| <i>Trichoderma ghanense</i>        | mol              |
| <i>Trichoderma lacteum</i>         | mol              |
| <i>Trichoderma hamatum</i>         | morf, mol        |
| <i>Trichoderma harzianum</i>       | morf, mol        |
| <i>Trichoderma koningii</i>        | morf, mol        |
| <i>Trichoderma koningiopsis</i>    | mol              |
| <i>Trichoderma longibrachiatum</i> | morf, mol        |
| <i>Trichoderma longipile</i>       | mol              |
| <i>Trichoderma minutisporum</i>    | morf, mol        |
| <i>Trichoderma moravicum</i>       | mol              |
| <i>Trichoderma oblongisporum</i>   | morf             |
| <i>Trichoderma pachypallidum</i>   | mol              |

|                                                     |           |
|-----------------------------------------------------|-----------|
| <i>Trichoderma piluliferum</i>                      | morf      |
| <i>Trichoderma polysporum</i>                       | morf, mol |
| <i>Trichoderma pseudokoningii</i>                   | morf, mol |
| <i>Trichoderma reesei</i>                           | mol       |
| <i>Trichoderma rossicum</i>                         | mol       |
| <i>Trichoderma saturnisporum</i>                    | morf, mol |
| <i>Trichoderma silvae-virgineae</i>                 | mol       |
| <i>Trichoderma sinuosum</i>                         | mol       |
| <i>Trichoderma</i> sp. ( <i>H. parapilulifera</i> ) | mol       |
| <i>Trichoderma</i> sp. ( <i>H. protopulvinata</i> ) | mol       |
| <i>Trichoderma</i> sp. ( <i>H. pulvinata</i> )      | mol       |
| <i>Trichoderma</i> sp. (AK 115/00)                  | mol       |
| <i>Trichoderma stritipile</i>                       | mol       |
| <i>Trichoderma tomentosum</i>                       | morf, mol |
| <i>Trichoderma virens</i>                           | morf, mol |
| <i>Trichoderma viride</i>                           | morf, mol |
| <i>Trichoderma viridescens</i>                      | mol       |

## 5 DISKUZE

Diverzita mikroskopických půdních hub z území České republiky byla předmětem celé řady výzkumů využívajících především klasické morfologické metody. Avšak podrobným studiem diverzity rodu *Trichoderma* s využitím moderních molekulárních metod se u nás dosud nikdo nezabýval. Hlavním cílem předkládané diplomové práce proto bylo získání informací o druhové diverzitě a výskytu tohoto rodu na našem území s využitím adekvátní metodiky.

### 5.1 POUŽITÁ METODIKA

#### 5.1.1 Výběr morfotypů

Ke zpracování vlastních půdních vzorků byla použita tzv. zřed'ovací metoda. Tato metoda je běžná při studiu diverzity půdních hub (viz např. Mueller a kol. 2004), s mírnými odlišnostmi ji použil rovněž Jaklitsch (2009) při studiu evropských druhů rodu *Trichoderma*. Určitým úskalím v dalším zpracování vzorků je výběr kolonií stejného morfotypu pro další studium. U rodu *Trichoderma* se ukazuje, že právě tento krok by mohl vést ke snížení šance na odhalení morfologicky podobných druhů. Jediným řešením tohoto úskalí by byla molekulární identifikace všech kolonií vykazujících příslušnost k rodu *Trichoderma*. Nicméně vzhledem k velkému množství a rychlému nárůstu kolonií (i přes velké zředění) by taková studie byla nezvládnutelná vzhledem k možnostem této diplomové práce.

#### 5.1.2 Spolehlivost druhového určení dle morfologických znaků

U všech studovaných izolátů byly pozorovány fenotypové znaky a nárůst kolonií na PDA a SNA při 35°C za 72 hodin, což je doporučovaná standardní metodika (Samuels a kol. 2013). Na základě zjištěných morfologických a fyziologických znaků byly jednotlivé izoláty přiřazeny k příslušnému morfotypu. Po porovnání s výsledky získanými sekvenací DNA jsem však našla chybné určení u 76 z 267 studovaných izolátů (Tab. 15 v kapitole Přílohy). Nesnadnost přesného druhového určení dle fenotypu naznačuje již skutečnost, že v nejobsáhlejších

morfologickém klíči (Samuels a kol. 2013) je obsaženo pouze 32 ze 181 popsáných druhů.

Pro morfologické určování se ukázaly být problematické především druhy s nízkou frekvencí výskytu, jako jsou např. *Trichoderma longipile* či *Trichoderma rossicum*, které se ve zmiňovaném klíči vůbec nevyskytují. Naopak u druhu *Trichoderma virens* se morfologické určení zcela shodovalo s druhovým určením na základě genové sekvence *tef 1α* a ITS. Druh je typický svým větvením konidioforů (tzv. "Gliocladium-like"), které je i ve světelném mikroskopu dobře pozorovatelné. Úskalím identifikace tohoto druhu je však výskyt stejného typu větvení i u druhu *Trichoderma crassum* a *Hypocrea nigrovirens*. Právě zmíněná *Trichoderma crassum* se mezi mými izoláty vyskytovala v podobě jednoho nálezu a dle morfologie byla nesprávně určena jako výše zmíněná *Trichoderma virens*. Obdobný problém morfologického odlišení se v mém souboru izolátů vyskytoval u druhů *Trichoderma pseudokoningii*, *T. koningii* a *T. koningiopsis*. V tomto případě byla *T. pseudokoningii* pomocí morfologického klíče chybně určena jako *T. koningii* ve 14 případech z 22 nálezů tohoto druhu. Správné určení druhu *T. koningiopsis* se zdařilo pouze ve čtyřech případech z 22. *T. koningiopsis* byla popsána a molekulárně odlišena od *T. koningii* teprve roku 2006 (Samuels a kol. 2006). Ukázalo se, že *T. koningii*, často citovaná ve studiích založených na fenotypových znacích, je druhem poměrně vzácným, vyskytujícím se spíše v Severní Americe a temperátní Evropě. Naopak *T. koningiopsis* patří v současné době z daleko více citovaným nálezům (Samuels a kol. 2006b, Hoyos-Carvajal a Bissett 2011).

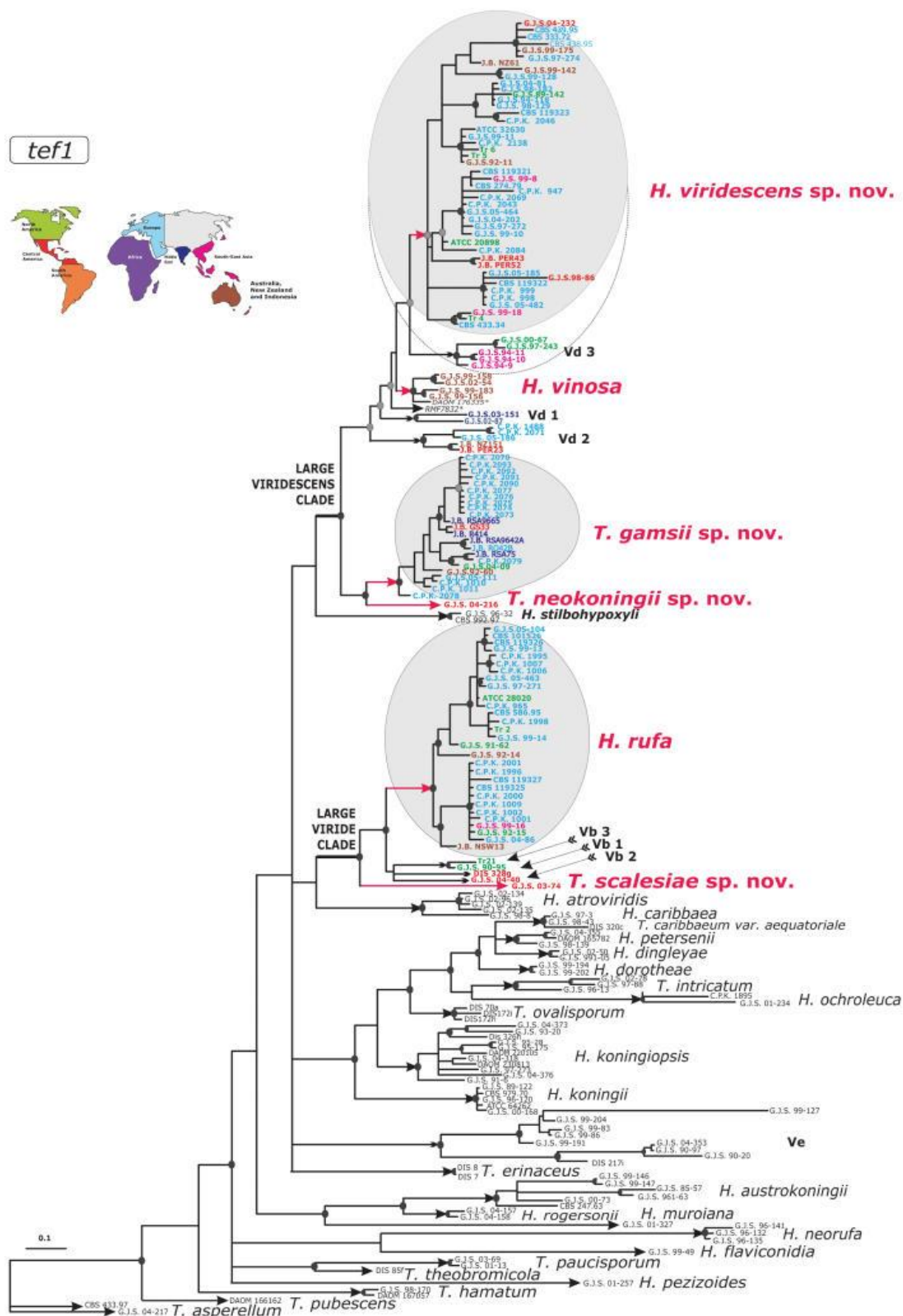
Druhým velkým problémem, který jsem musela při určování druhů řešit, byla existence morfologicky velice podobných druhů v komplexu *Trichoderma viride*. Jaklitsch a kol. (2006) se této skupině druhů věnovali podrobněji a zjistili, že izoláty určené díky charakteru fenotypových znaků jako *T. viride* jsou ve skutečnosti ve většině případů kosmopolitně se vyskytující druh *Trichoderma viridescens*. K morfologické záměně těchto dvou druhů došlo i v této diplomové práci. Jako *T. viride* jsem chybně označila 9 izolátů ze 14 posléze určených jako *T. viridescens*. Dalšími druhy patřícími do této skupiny jsou *Trichoderma asperellum*, odlišitelná od *T. viride* pouze skenováním elektronovým mikroskopem díky odlišnému charakteru hrbolků na povrchu konidií (Samuels a kol. 1999), *T. neokoningii* vyskytující se v tropických oblastech Peru, *T. gamsii*, *T. vinosum* a *T. scalesiae*, dosud nalezená pouze jako vzácně sporulující endofyt *Scalesia pedunculata* na Galapágách (Jaklitsch

a kol. 2006). Kladogram zobrazující podobnost těchto druhů s jejich geografickým rozdělením je znázorněn na Obr. 17. Tuberkulátní konidie jsem dále pozorovala u druhů *T. saturnisporum* a *T. ghanense*. Je proto zapotřebí se u těchto fylogeneticky pouze vzdáleně příbuzných druhů patřících do sekce *Longibrachiatum* vyvarovat záměně s výše uvedenými druhy z komplexu *Trichoderma viride*.

Na základě srovnání výsledků získaných fenotypovou a molekulární analýzou jsem dospěla k závěru, že fenotypové znaky jsou stále vhodným vodítkem k rozřazení do tzv. morfotypů, využitelných např. při následném UP-PCR fingerprintingu. Rozhodně však nejsou spolehlivým druhovým určovacím znakem, pokud se použijí jen jako jediná identifikační metoda.

### 5.1.3. Revize sbírkových izolátů rodu *Trichoderma*

Součástí zadání diplomové práce byla též revize 30 sbírkových izolátů CCF. Některé sbírkové kmeny (CCF 3813, 3814, 3834, 3862, 3865, 3910, 3911, 3912) byly již určeny molekulární analýzou, a proto jsou z tohoto srovnání vyloučeny. Z celkového počtu 22 kmenů identifikovaných pouze na základě fenotypových vlastností byla tato identifikace potvrzena molekulárními metodami pouze u 13 izolátů (viz Tab. 15 v kapitole Přílohy). Správné zařazení všech izolátů příslušného druhu bylo zjištěno u druhů *T. harzianum*, *T. reesei*, *T. saturnisporum*, *T. viride* a *T. virens*. V případě jednoho izolátu uloženého v CCF pod označením *T. polysporum* došlo k záměně s *T. rossicum*. Podobnost těchto dvou druhů náležících do sekce *Pachybasium* je dle referenční literatury (Bissett a kol. 2003) velmi výrazná a to především díky u rodu *Trichoderma* poměrně vzácnému bílému zbarvení sporulujících kolonií. Za zmínku stojí určitě ještě záměna izolátů určených sekvenací jako *T. citrinoviride*. K chybnému určení došlo dokonce ve 4 případech a to záměnou za *T. koningii* a *T. koningiopsis*. Zmíněné druhy náleží do stejné sekce i cladu (*Longibrachiatum*) a jsou si tedy velmi blízké nejen morfologicky ale i fylogeneticky. Všechny tyto druhy navíc patří do komplexu *Trichoderma koningii* (Samuels a kol. 2006), dříve považovaného za jediný druh (viz výše) a proto je jejich fenotypová záměna naprosto běžným jevem.



Obr. 17: Kladogram založený na oblasti *tef1α* rDNA zobrazující současné druhové uspořádání v sekci *Trichoderma*. Tmavě šedé plné kruhy zvýrazňují druhy s koeficientem pravděpodobnosti vyšším než 0,90, černé tečky v uzlech znamenají podporu vyšší než 0,95. Barva písma odpovídá regionu odběru znázorněnému na schematické mapě v levém rohu (převzato z Jaklitsch a kol. 2006).

#### 5.1.4 Metodika UP-PCR fingerprintingu

Metoda UP-PCR fingerprinting byla do studie zařazena především kvůli redukci počtu kmenů určených na sekvenování. Z primerů uváděných na [www.isth.info.cz](http://www.isth.info.cz) jako vhodných pro tuto metodu jsem vybrala dva, které poskytovaly nejvyšší rozlišovací schopnost - L45 a AS15 (Obr. 5 a 6). Z celkového počtu 267 bylo pro určení všech studovaných izolátů nutné sekvenovat pouze 65. Nutnost získání genové sekvence jsem díky této nenákladné metodě snížila na jednu čtvrtinu.

Navzdory skutečnosti, že lze tuto metodu poměrně dobře využít na rozřazení izolátů rodu *Trichoderma* do skupin shodných druhů, je v současné době tato metoda při studiu diverzity tohoto rodu používána jen vzácně. Možným využitím této metody při určení izolátů patřících do sekce *Trichoderma* se na přelomu tohoto tisíciletí zabývala především výzkumná skupina okolo dánské mykoložky M. Løbeek (Løbeek a Jensen 2002, Bulat a kol. 1998, Løbeek a kol. 2000, Cumagun a kol. 2000). Løbeek a kol. (2000) vyjadřují v práci zabývající se izoláty rodu *Trichoderma* ze zaplavených domů též přesvědčení o vhodnosti užití tohoto postupu ke druhovému určení. Ke stejnému závěru došli i Cumagun a kol. (2000) při studiu 42 izolátů rodu *Trichoderma* získaných z rýžových polí na Filipínách. V této práci byl použit (stejně jako v předkládané DP) primer L45 k rozřazení izolátů patřících ke druhům *Trichoderma viride* (neurčitelné pouze pomocí sekvence ITS) a *T. harzianum*. S příchodem moderní identifikace studovaných izolátů pomocí dalších úseků rDNA (např. *tef1α*, *rbp2* apod.), které poskytují přímé a spolehlivé druhové určení, však zájem o tuto metodu opadl.

#### 5.1.5 Použití jednotlivých úseků DNA k druhové identifikaci

Molekulární metody hrají při současné znalosti druhové diverzity rodu *Trichoderma* nepostradatelnou úlohu pro správné druhové určení. Velké množství popsaných kryptických druhů dává morfologické determinaci mizivou šanci dosáhnout spolehlivého druhového určení. Přesná druhová determinace přitom hraje významnou úlohu především u druhů způsobujících onemocnění člověka, popř. u druhů s ekonomickým významem.

Patrně nejpoužívanější genovou oblastí pro determinaci zástupců rodu *Trichoderma* je úsek ITS. Jak uvádí Chaverri a kol. (2003b), ITS sekvence jsou

dostačujícím určovacím klíčem pro zástupce sekcí *Pachybasium*, *Longibrachiatum* a *Hypocreanum*. Zástupci poslední ze sekcí, *Trichoderma*, však v této oblasti nevykazují dostatečné množství rozdílných bazí a určit do příslušného druhu je nelze. Nejméně spolehlivé je druhové odlišení u trojice druhů *T. viride*, *T. koningii* a *T. atroviride* (Druzhinina a Kubicek 2005). U těchto izolátů se doporučuje sekvenovat úsek *tef1α* či *rpb2* s následným srovnáním v databázi TrichoBLAST popř. GenBank (Kopchinskyi a kol. 2005). K potvrzení správného zařazení vybraného izolátu do systému rodu *Trichoderma* se dále používají úseky *actin*, *calmodulin1*, *chitinase 18-5* či *β-tubulin2* (Hoyos-Carvajal a Bissett 2011). V předkládané diplomové práci jsem vycházela z předpokladu, že oblast *tef1α* je dostačujícím určovacím znakem pro zástupce všech sekcí, a pracovala jsem rovnou s tímto genovým úsekem. Podnětem k tomuto kroku bylo především snížení nákladů na sekvenaci při velkém množství zpracovávaných kmenů. Použití tohoto postupu se ukázalo jako vyhovující, v databázi GenBank či TrichoBLAST existovalo dostatečné množství referenčních kmenů ze spolehlivých zdrojů pro všechny zjištěné druhy.

Jak jsem již uvedla, oblast ITS patří v současné době stále k nepoužívanějšímu úseku rDNA používanému k druhovému určení zástupců rodu *Trichoderma*. Hlavním důvodem je dle mého názoru především to, že díky nejdelší době používání tohoto úseku existuje i nejobsáhlejší databáze sekvencí. Domnívám se však, že díky neustále postupujícímu studiu tohoto rodu bude přibývat sekvencí dalších úseků rDNA (jako je *tef1α*, *rpb2*, *calm1*, *chit18-5*, *TUBB2*), které jsou spolehlivějšími ukazateli druhové příslušnosti, a oblast ITS bude k pouhému druhovému zařazení používána čím dál tím méně.

## **5.2 ZJIŠTĚNÁ DIVERZITA RODU *TRICHODERMA* Z ÚZEMÍ ČESKÉ REPUBLIKY**

Srovnání výsledků studií pocházejících z různých geografických oblastí bývá velmi obtížné, protože prakticky nikdy nedochází k úplnému překryvu faktorů ovlivňujících výsledek. Mezi nejvýznamnější faktory patří použitá metodika včetně rozsahu sběru materiálu, biogeografické podmínky (především klimatické podmínky) a rozsah studované oblasti, a také charakter substrátu.

### 5.2.1 Srovnání výsledků s dostupnými literárními údaji

Během studia diverzity rodu *Trichoderma* bylo na základě studia celkem 262 izolátů z 98 lokalit na území České republiky zjištěno 22 druhů rodu *Trichoderma*. Druhové zastoupení a četnost nálezů byly následující: *T. viride* (69), *T. harzianum* (47), *T. hamatum* (23), *T. koningiopsis* (22), *T. atroviride* (19), *T. viridescens* (14), *T. virens* (13), *T. citrinoviride* (9), *T. koningii* (9), *T. polysporum* (9), *T. longipile* (5), *T. aggressivum* (4), *T. longibrachiatum* (4), *T. reesei* (3), *T. saturnisporum* (3), *T. tomentosum* (3), *T. crassum* (1), *T. gamsii* (1), *T. ghanense* (1), *T. pseudokoningii* (1), *T. rossicum* (1) a *Trichoderma* sp. AK 115/00 (1).

Jedinými dosud publikovanými zahraničními pracemi zaměřenými na rod *Trichoderma/Hypocrea* a částečně pokrývajících též území České republiky, se kterými by bylo možné zjištěné výsledky přímo srovnávat, jsou práce Jaklitsche (2009 a 2011). Tyto studie mapují výskyt rodu *Trichoderma* a *Hypocrea* na evropském území a uvádějí výskyt 75 druhů tohoto rodu, z toho 29 druhů zcela nových pro vědu. Jsou založeny na 620 nálezech z území 14 evropských států (včetně území České republiky) v období roku 2003-2008. Tyto publikace uvádějí z našeho území následující druhy: *T. citrinoviride*, *T. dacrymycellum*, *T. lacteum*, *T. minutisporum*, *T. moravicum*, *T. pachypallidum*, *T. polysporum*, *T. silvae-virgineae*, *T. sinuosum*, *Trichoderma* sp. (*H. parasilulifera*), *Trichoderma* sp. (*H. protopulvinata*), *Trichoderma* sp. (*H. pulvinata*), *T. strictipile*, *T. viride* a *T. viridescens*. Z těchto 15 druhů jsem v rámci diplomové práce zjistila pouze 4 druhy (*T. citrinoviride*, *T. polysporum*, *T. viride* a *T. viridescens*). Domnívám se, že hlavním důvodem tohoto rozdílu je odebíraný substrát. Jaklitsch se ve své práci zaměřil na studium dřevního substrátu, který je v mé práci zastoupen jen velmi okrajově. Předpokládám tedy, že pokud by byla tato práce rozšířena o odběry ze dřevního materiálu, byla by celková druhová diverzita vyšší. Druhou prací umožňující srovnání s výsledky DP je studie mapující diverzitu rodu *Trichoderma* na území Polska (Błaszcyk a kol. 2011). Studovaným substrátem bylo i v této studii dřevo, v menší míře pak půda (především substrát pěstíren žampionů). Výsledkem této studie bylo získání 170 izolátů rodu *Trichoderma* náležících k 14 druhům. Błaszcyk a kol. ve své práci publikovali nález následujících druhů: *T. harzianum* (43), *T. aggressivum* (35), *T. atroviride* (20), *T. koningii* (17), *T. viridescens* (13), *T. citrinoviride* (11), *T. viride* (7), *T. hamatum* (9), *T. virens* (6), *T. longibrachiatum* (4), *T. gamsii* (2), *T. koningiopsis* (1), *T. polysporum*

(1) a *T. tomentosum* (1). Největší zastoupení druhu *T. harzianum* na rozkládajícím se dřevě zcela odpovídá výsledku zjištěnému pro tento substrát i v předkládané DP. Velmi zajímavým se na první pohled zdá vysoké zastoupení druhu *Trichoderma aggressivum*, procentuální zastoupení 20,6%. Tato skutečnost je však pouze odrazem zastoupení jednotlivých substrátů. Stejně jako nálezy *T. aggressivum* v této DP, pocházely i izoláty tohoto druhu v práci Blaszczyk a kol. (2011) ze substrátu používaného k pěstování *Agaricus bisporus*. Vysoké zastoupení druhu *T. aggressivum* tak pouze reflektuje zastoupení 58 izolátů pocházejících ze žampionového substrátu. Ostatní nalezené druhy patří k běžným druhům vyskytujícím se na území Evropy a zcela se překrývají s nálezy zaznamenanými při studiu rodu *Trichoderma* na území ČR.

Velmi zajímavou se též jeví skutečnost, že některé druhy, citované v řadě zahraničních studií jako hojné s takřka kosmopolitním rozšířením, se na našem území dosud nepodařilo nalézt. Příkladem takového druhu je např. *Trichoderma asperellum*. Druh patřící do sekce *Trichoderma* vykazuje velmi podobné fenotypové znaky jako *Trichoderma viride* a při pouhém mikroskopickém pozorování by bylo velmi snadné tyto dva druhy zaměnit. Z publikované literatury (Hoyos-Carvajal a kol. 2009, Rivas a Pavone 2010, Kubicek a kol. 2003, Zhang a kol. 2005) vyplývá, že přirozený výskyt tohoto druhu je vázaný spíše na teplejší oblasti, především subtropy, na rozdíl od druhu *T. viride* vyskytujícím se v hojné míře na chladnějších lokalitách. Na druhou stranu však není výskyt druhu *T. asperellum* na našem území v budoucnu zcela vyloučen, protože má (podobně jako jiné druhy rodu *Trichoderma*) biotechnologický potenciál a mohl by tak být uměle introdukován i do naší přírody (pokud by bylo užití daného preparátu povoleno k používání i u nás) (Tondje a kol. 2007).

Jiným příkladem jsou *Trichoderma pleurotum* a *T. pleurotica*. Oba druhy jsou známy z pěstíren hlívy ve světě (Hatvani 2008, Sobieralski a kol. 2012, Kredics a kol. 2008) a mohly by se vyskytnout i na našem území. Zatím jsem však nezjistila publikované nálezy těchto druhů u nás. Z prostředí pěstíren hub jsem navíc zpracovala jen minimum nálezů, což vysvětluje dosavadní absenci výskytu těchto druhů.

Srovnání publikované literatury z nejbližších oblastí centrální Evropy tedy ukazuje, že diverzita rodu *Trichoderma* na území České republiky není ještě zcela jistě prozkoumána a studium dalších substrátů (především rozkládajícího se dřeva a hub včetně pěstovaných) by mohlo přinést další nové poznatky pro naše území.

### 5.2.2 Dominantní druhy (*T. harzianum* a *T. viride*) - substrátová a výšková preference

Studované kmeny pocházejí z různých zdrojů a projektů, a proto nejde podrobněji vyhodnotit substrátovou a výškovou preferenci. Málo studované substráty jsem se sice snažila doplnit vlastními sběry a rozšířit tak nalezené druhové spektrum, nicméně i tak nelze u většiny nalezených druhů ze zjištěných dat stanovit substrátovou ani výškovou preferenci. Proto se pokusím alespoň o částečné srovnání výskytu výrazně dominantních taxonů, *Trichoderma harzianum* a *T. viride*.

Druh *T. harzianum* je velmi unikátní svým kosmopolitním rozšířením a vysokou přizpůsobivostí, největší mezi zástupci rodu *Trichoderma*. Díky těmto vlastnostem značně dominuje na substrátech, na kterých se ostatní zástupci vyskytují méně kvůli ne zcela příznivým životním podmínkám (Chaverri a Samuels 2003, Samuels 2006). Příkladem takového substrátu z území ČR je např. silně zasolená půda NPR SOOS (Hujšlová 2006, Hujšlová a kol. 2010) nebo substrát výsypky uhelného dolu v severních Čechách (Bukovská a kol. 2010). Potvrzení této preference je patrné i z výsledků této práce. *T. harzianum* tvořila 36,6% izolátů pocházejících z antropogenní půdy (substrát odkaliště Chvaletice, Jívka u Radvanic a Měděnec). Zároveň je *T. harzianum* druhem preferujícím nižší nadmořské výšky (zcela dominuje mezi izoláty z oblasti 150 - 300 m n. m.), nicméně testování vlivu nadmořské výšky na spektrum *Trichoderma* spp. Nelze dle povahy dat učinit. Ze zahraničních prací jsem nenašla údaje o užší ekologické vazbě *T. harzianum*. Při studiu rodu *Trichoderma* v Číně (Zhang a kol. 2005) v oblasti Tibetu (přibližně 5000 m n. m.) byla zjištěna přítomnost jediného druhu a to právě *T. harzianum*. Životní podmínky ve výšce 5000 m n. m. jsou ovšem patrně tak extrémní, že zde jiné druhy nejsou schopny přežít a tak tato skutečnost opět potvrzuje značnou schopnost přizpůsobení se tohoto druhu různým ekologickým faktorům.

Dalším druhem s viditelnou vazbou na substrát je *Trichoderma viride*. Tento druh je specifický svým výskytem v půdě jehličnatého lesa a v opadu (Samuels a kol. 2013) a preferencí chladnějších regionů (Samuels 2006), což potvrzují i výsledky této diplomové práce. Klein a Eveleigh (1998) naměřili teplotní optimum tohoto druhu v rozmezí 8 - 16 °C. Ke stejnému závěru jsem došla v této práci i já, neboť druh *T. viride* značně dominuje mezi izoláty získanými z jedlobukového, smrkového a

klečového vegetačního stupně (tj. v nadmořské výšce 701 - nad 1250 m n. m.), kde se průměrné roční teploty drží velmi nízko (mezi 1 až 5,5°C).

### **5.3 ROZSAH STUDOVANÉHO MATERIÁLU VE VZTAHU KE ZJIŠTĚNÉ DIVERZITĚ**

Předkládaná diplomová práce je srovnatelná s výsledky podobně zaměřených prací. Např. Migheli a kol. (2009) během svého tříletého studia na Sardinii a ostrovech Tyrhénského moře zjistili na základě studia 482 izolátů z 15 půdních typů výskyt 14 druhů rodu *Trichoderma*. Další studií zabývající se diverzitou rodu *Trichoderma* provedli Zhang a kol. (2005) na území Číny. Zhang a kol. analyzovali 135 izolátů pocházejících z půdy a opadu šesti odlišných lokalit v rozmezí nadmořských výšek 500 - 5000 m n. m. a našli 11 známých a 2 dosud neznámé druhy rodu *Trichoderma*. Obzvláště zajímavými se ukázaly být izoláty z nadmořské výšky kolem 5000 m n. m., které všechny náležely k druhu *T. harzianum* (viz výše.). Studium výskytu rodu *Trichoderma* na území Ruska, Nepálu a severní Indie se zabývali Kullning a kol. (2000). Tito vědci zařadili 76 studovaných izolátů do 7 známých druhů a 5 nových druhů. Obdobnou studii provedli v jihovýchodní Asii i Kubicek a kol. (2003). Výsledkem jejich práce bylo získání 96 izolátů náležících do 10 druhů známých a nalezení dokonce 7 nových druhů. Obdobnou práci publikovali pro území jižní Ameriky Hoyos-Carvajal a kol. v roce 2009. Tato studie mapující zastoupení rodu *Trichoderma* v půdních vzorcích sedmi jihoamerických států na základě 182 izolátů prezentuje nález 20 známých druhů a 11 nových druhů.

Výsledky těchto studií včetně mé diplomové práce ukazují, že diverzita rodu *Trichoderma* není stále ještě zcela zmapovaná a skýtá vysoký potenciál nálezů nových druhů s možným využitím pro člověka.

### **5.4 DIVERZITA DRUHŮ RODU *TRICHODERMA* STUDOVANÁ MORFOLOGICKÝMI A MOLEKULÁRNÍMI METODAMI**

Porovnáme-li diverzitu druhů rodu *Trichoderma* na našem území v "pre-molekulární éře" (Ptáčnicková 2010) se současným stavem (výsledky této DP, Jaklitsch 2009 a 2011, Hujsová 2006, Kubátová a kol. 2009, Bukovská 2010, Hujsová a kol. 2010), docházíme ke stavu 16 druhů: 34 druhům. Mezi druhy určenými dle

fenotypových znaků a molekulárními metodami zatím nepotvrzenými je *Trichoderma minutisporum* izolovaná z výsypky dolu Theodor u Kladna (Bečvář 1998) a z povrchu kořenů dubu z jihozápadní Moravy (Dolejský a Novotný 1999, Novotný 1995). Dalším takovým druhem je *Trichoderma piluliferum* získaná z povrchu kořenů *Picea abies* v oblasti Krušných hor (Černý a kol. 1987) a ze vzorků ovzduší a stěrů stěn z Českých Budějovic (Řepová 1986). Absence těchto druhů v mém souboru izolátů lze vysvětlit tím, že typ substrátu, na kterém byly tyto druhy nalezeny, byl v mém souboru zastoupen zcela zanedbatelně.

Nově nalezeným druhy, které nebyly zaznamenány v literární rešerši (Ptáčníková 2010) jsou: *T. aggressivum*, *T. crassum*, *T. gamsii*, *T. ghanense*, *T. koningiopsis*, *T. longipile*, *T. reesei*, *T. rossicum*, *T. viridescens* a *Trichoderma* sp. AK 115/00. Nálezy těchto druhů byly komentovány v kapitole Výsledky.

Možnosti molekulárních metod ve srovnání s morfologickými metodami lze u rodu *Trichoderma* lze dále dokumentovat na příkladu studia diverzity půdních hub na Šumavě a v Chvaleticích. Z obou těchto oblastí jsem zpracovala vyšší počet izolátů. Kubátová a Váňová (2001) zaznamenali v oblasti Šumavy za pomoci morfologických metod 5 druhů rodu *Trichoderma*. V rámci diplomové práce jsem studovala 40 izolátů z oblasti Šumavy molekulárními metodami a zjistila 9 druhů. Druhým příkladem je oblast opuštěného odkaliště Chvaletice s popílkovým substrátem. Kubátová a kol. (2002) zaznamenali na této lokalitě 3 druhy rodu *Trichoderma* a další druhově neurčené izoláty. V této diplomové práci jsem z lokality Chvaletice molekulárními metodami studovala 33 izolátů a zjistila jsem výskyt 8 druhů. Oba příklady dokládají značnou omezenost využití morfologických metod pro spolehlivou identifikaci druhu rodu *Trichoderma* a zároveň velký pokrok, kterého lze v současné době dosáhnout využitím molekulárních analýz. Bohužel finanční náročnost tohoto studia je stále velmi vysoká.

## 6 ZÁVĚR

- Diplomová práce zaměřená na studium diverzity rodu *Trichoderma* na území České republiky je založená na zpracování celkem 267 izolátů (30 izolátů pocházejících ze sbírky CCF, 196 izolátů ze studijní sbírky A. Kubátové a 43 izolátů z vlastního zpracování odběrových vzorků).
- Izoláty byly získány z 98 lokalit na území Čech a Moravy, především z půdy a opadu, ale i dalších substrátů.
- Pro tento výzkum jsem použila fenotypovou charakteristiku, molekulární metodu UP-PCR fingerprinting a DNA sekvenování, což umožnilo identifikaci všech studovaných izolátů. Zvolený metodický postup, tj. rozřazení do morfotypů, využití molekulární metody UP-PCR fingerprintingu a DNA sekvenování (tefl $\alpha$ , příp. ITS), se ukázal jako vhodná a rychlá metodika.
- Celkem jsem na základě studia literatury a svých vlastních výsledků zaznamenala výskyt 34 druhů rodu *Trichoderma* patřících do 4 sekcí, z toho 21 vlastních nálezů. Jeden izolát bude popsán jako nový druh.
- Mezi studovanými izoláty jsem zaznamenala 5 nových nálezů pro území České republiky: *T. crassum*, *T. gamsii*, *T. ghanense*, *T. rossicum* a *T. longipile*.
- Na studovaných lokalitách jsem zaznamenala afinitu vybraných druhů k specifickému substrátu a nadmořské výšce. Takto specifickým druhem je na našem území *Trichoderma viride* vázaná na vyšší nadmořské výšky (nad 700 m n. m.) a půdu jehličnatého lesa a opad. Druh *Trichoderma harzianum* se naopak vyskytoval v hojné míře v nižších nadmořských výškách (150 - 500 m n. m.) především na dřevním substrátu a v antropogenní půdě. Ostatní druhy se na substrátech a nadmořských výškách vyskytovaly ve výrazně nižším zastoupení, nelze proto o jejich vazbě na studovaný substrát činit jednoznačné závěry.
- Rozdílné výsledky získané druhovým určením pomocí fenotypových znaků a molekulárně taxonomické analýzy (především sekvence DNA) ukázaly, že izoláty

rodu *Trichoderma* nelze v dnešní době, při existenci 181 platně popsanych druhů, spolehlivě přiřadit ke správnému druhu pouze na základě morfologie studovaného izolátu.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Akhtar K., Khalid A., Akhtar M., Ghauri M. (2009):** Removal and recovery of uranium from aqueous solutions by Ca-alginate immobilized *Trichoderma harzianum*. - Bioresource Technology 100(20): 4551-4558.
- Bečvář K. (1998):** Occurrence and diversity of microfungi and their communities in substrates of spoil banks. - Novitates Botanicae Universitatis Carolinae 12: 53-71.
- Bisby G. R. (1939):** *Trichoderma viride* Pers. ex Fr. and notes on *Hypocrea*. - Transactions of the British Mycological Society 23: 149-168. [cit. sec. Rifai 1969]
- Bissett J. (1984):** A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. - Canadian Journal of Botany 62: 924-931.
- Bissett J. (1991a):** A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. - Canadian Journal of Botany 69: 2357-2372.
- Bissett J. (1991b):** A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. - Canadian Journal of Botany 69: 2418-2420.
- Bissett J. (1991c):** A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. - Canadian Journal of Botany 69: 2373-2417.
- Bissett J., Szakacs G., Nolan C. A., Druzhinina I., Gradinger C., Kubicek C. P. (2003):** New species of *Trichoderma* from Asia. - Canadian Journal of Botany 81 (6): 570-586.
- Blaszcyk L., Popiel D., Chelkowski J., Koczyk G., Samuels G. J., Sobieralski K., Siwulski M. (2011):** Species diversity of *Trichoderma* in Poland. - Journal of Applied Genetics 52: 233-243.
- Brefeld O. (1891):** Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie. - Heinrich Schöningh, Münster. [cit. sec. Rifai 1969]
- Bukovská P., Jelínková M., Hršelová H., Sýkorová Z., Gryndler M. (2010):** Terminal restriction fragment length measurement errors are affected mainly by fragment length, G + C nucleotide content and secondary structure melting point. - Journal of Microbiological Methods 82: 223-228.
- Bulat S. A., Lübeck M., Mironenko N., Jensen D. F., Lübeck, P. S. (1998):** UP-PCR analysis and ITS1 ribotyping of *Trichoderma* and *Gliocladium*. - Mycological Research 102: 933-943.

- Clarkson J. P., Mead A., Payne T., Whipps J. M. (2004):** Effect of environmental factors and *Sclerotium cepivorum* isolate on sclerotial degradation and biological control of white rot by *Trichoderma*. - Plant Pathology 53: 353-362.
- Consolo V. F., Mónaco C. I., Cordo C. A., Salerno G. L. (2012):** Characterization of novel *Trichoderma* spp. isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economically important crops in Argentina. - World Journal of Microbiology and Biotechnology 28(4): 1389-1398.
- Culek M., Buček A., Grulich V., Hartl P., Hrabica A., Kocián J., Kyjovský Š., Lacina J. (2005):** Biogeografické členění České republiky II. díl. - 589 p., Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha.
- Cumagun C. J. R., Hockenhull J., Lübeck M. (2000):** Characterization of *Trichoderma* Isolates from philippine rice fields by UP-PCR and rDNA-ITS1 analysis: Identification of UP-PCR markers. - Journal of Phytopathology 148(2): 109-115.
- Černý M., Hršelová H., Cudlín P. (1987):** Mikromycety v mykorhizosféře smrku ztepilého. - In: Ekologie mykorrhiz a mykorhizních hub. Imise a mykorrhiza, Špindlerův mlýn, p. 50-57.
- Dingley J. M. (1952):** The *Hypocreales* of New Zealand. III: The genus *Hypocrea*. - Transactions and Proceedings of the Royal Society of New Zealand 79: 232-337. [cit. sec. Rifai 1969]
- Dingley J. M. (1957):** The *Hypocreales* of New Zealand. VII: A revision of records and species in the Hypocreaceae. - Transactions and Proceedings of the Royal Society of New Zealand 83: 643-662. [cit. sec. Rifai 1969]
- Dix N. J., Webster J. (1995):** Fungal Ecology. - 549 p., Chapman & Hall, London.
- Doi Y., Abe Y., Sugiyama, J. (1987):** *Trichoderma* sect. Saturnisporum, sect. nov. and *Trichoderma ghanense*, sp. nov. - Bulletin of the National Science Museum Tokyo 13: 1-9.
- Dolejský V., Novotný D. (1999):** Význam houbových parazitů v procesu chřadnutí dubů [The influence of fungal parasites on the decline of oak species]. - In: Jankovský L., Krejčíř R., Antonín V. (eds.): Houby a les. Sborník referátů, p. 71-80, Brno.
- Domsch K. H., Gams W., Anderson T. H. (2007):** Compendium of soil fungi. - 672 p., IHW-Verlag, Eching.

- Druzhinina I. S., Komon-Zelazowska M., Ismaiel A., Jaklitsch W. M., Mulaw T., Samuels G. J., Kubicek C. P. (2012):** Molecular phylogeny and species delimitation in the *Longibrachiatum* Clade of *Trichoderma*. - Fungal Genetics and Biology 49/5: 358-368.
- Druzhinina I. S., Kopchinskiy A. G. (2004-2008):** *Hypocrea/Trichoderma* Biodiversity, International Subcommission on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy. Převzato 22. 3. 2013 z <http://isth.info/biodiversity/index.php>.
- Druzhinina I. S., Kopchinskiy A. G., Komon M., Bissett J., Szakacs G., Kubicek C. P. (2005):** An oligonucleotide barcode for species identification on *Trichoderma* and *Hypocrea*. - Fungal Genetics and Biology 42: 813-828.
- Druzhinina I. S., Kopchinskiy A. G., Kubicek C. A. (2006):** The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. - Mycoscience 47: 55-64.
- Druzhinina I. S., Kubicek C. P. (2005):** Species koncept and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? - Journal of Zhejiang University Science 6B(2): 100-112.
- Druzhinina I. S., LaFe K., Willinger B., Komon-Zelazowska M., Ammirati J., Kubicek C. P., Rogers J. D. (2008):** An unknown species from Hypocreaceae isolated from human lung tissue of a patient with non-fatal pulmonary fibrosis. - Clinical Microbiology Newsletters. Published online 10. 1. 2008.
- Ezzi M., Lynch J. (2005):** Biodegradation of cyanide by *Trichoderma* spp. and *Fusarium* spp.. - Enzyme Microbiology and Technology 36(7): 849-854.
- Fassatiová O. (1979):** Plísňe a vláknité houby v technické mikrobiologii. - 211 p., SNTL, Praha.
- Fiedl M. A., Druzhinina I. S. (2011):** Taxon-specific metagenomics of *Trichoderma* reveals a narrow community of opportunistic species that regulate each other's development. - Microbiology. Published online 10. 11. 2011.
- Gams W., Bissett J. (1998):** Morphology and identification of *Trichoderma*. - In: Kubicek C. P., Harman E. G. (eds.): *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 1, p. 57-74, London.
- Gardes M., Bruns T. D. (1993):** ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. - Molecular Ecology 2: 113-118.

- Gazis R. O., Chaverri P. (2010):** Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. - Fungal Ecology 3(3): 240-254.
- Hall T. A. (1999):** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. - Nuclei Acids Symposium Series No. 41: 95-98.
- Harz C. O. (1871):** Einige neue Hyphomyceten Berlin's und Wien's nebst Beiträgen zur Systematik derselben. - Bulletin de la Societe imperiale des naturalistes de Moscow 44: 88-147. [cit. sec. Rifai 1969]
- Hatvani Lóránt (2008):** Mushroom pathogenic *Trichoderma* species: occurrence, biodiversity, diagnosis and axtracelullar enzyme production. - Disertační práce, 109 p.
- Hoyos-Carvajal L., Bissett J. (2011):** Biodiversity of *Trichoderma* in Neotropics. - InTechOpen. Published online 2. 12. 2011.
- Hoyos-Carvajal L., Orduz S., Bissett J. (2009):** Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. - Fungal Genetics and Biology 46(9): 615-631.
- Hujšlová M. (2006):** Půdní saprotrófní mikroskopické houby extrémních stanovišť (na příkladu NP Soos). - Dipl. práce, 116 p.
- Hujšlová M., Kubátová A., Chudíčková M., Kolařík M. (2010):** Diversity of fungal communities in saline and acidic soils in the Soos National Reserve, Czech Republic. - Mycological Progress 9: 1-15.
- Chaverri P., Castlebury L. A., Overton B. E., Samuels G. J. (2003):** *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. - Mycologia 95: 1100-1140.
- Chaverri P., Castlebury L., Samuels G., Geiser D. (2003b):** Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/ Hypocrea lixii* complex. - Molecular Phylogenetics and Evolution 27(2): 302-313.
- Chaverri P., Gazis R. O. (2011):** *Trichoderma amazonicum*, a new endophytic species on *Hevea brasiliensis* and *H. guianensis* from the Amazon basin. - Mycologia 103(1): 139-151.
- Chaverri P., Samuels G. J. (2003):** *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. - Studies in Mycology 48: 1-119.

- Chet I., Inbar J. (1997):** Fungi. - In: Anke T. (ed.): Fungal Biotechnology, p. 65-80, Weinheim.
- Chouaki T., Lavarde V., Lachaud L., Raccurt C. P., Hennequin C. (2002):** Invasive infections due to *Trichoderma* species: Report of 2 cases, finding of in vitro susceptibility testing, and review of the literature. - Clinical Infectious Diseases 35(11): 1360-1367.
- Jaklitsch W. M. (2009):** European species of *Hypocrea*. Part I. The green-spored species. - Studies in Mycology 63: 1-91.
- Jaklitsch W. M. (2011):** European species of *Hypocrea* part II: species with hyaline ascospores. - Fungal Diversity. Published online 15. 3. 2011.
- Jaklitsch W. M., Kubicek C. P., Druzhinina I. S. (2008):** Three European species of *Hypocrea* with reddish brown stromata and green ascospores. - Mycologia 100(5): 796-815.
- Jaklitsch W. M., Samuels G. J., Dodd S. L., Lu B. S., Druzhinina I. S. (2006):** *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. - Studies in Mycology 56:135-177.
- Kamala T., Devi S. I., Thingnam G., Somkuwar B. G. (2013):** Genetic diversity and species pattern of *Trichoderma* and *Hypocrea* in Manipur using in silico analysis. - Bioinformation. Published online 18. 1. 2013.
- Karmakar M., Ray R. (2011):** Current trends in research and application of microbial cellulases. - Research Journal of Microbiology 6(1): 41-53.
- Kim S. C., Shiriuzu T., Nakagiri A., Sotome K., Maekawa M. (2013):** *Trichoderma eijii* and *T. pseudolacteum*, two new species from Japan. - Mycological Progress. Published online 9. 1. 2013.
- Klein D., Eveleigh D. E. (1998):** Ecology of *Trichoderma*. - In: Kubicek C. P., Harman E. G. (eds.): *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 1, p. 57-74, London.
- Kopchinskiy A. G., Komon M., Kubicek C. P., Druzhinina I. S. (2005):** TrichoBLAST: A multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. - Mycological Research 109: 657-660.
- Kredics L., Kocsubé S., Manczinger L., Antal Z., Szekeres A., Druzhinina I. S., Komon-Zelazowska M., Kubicek C. P., Vágvölgyi C., Hatvani L. (2008):** Detection of *Trichoderma pleurotum* and *T. pleuroticola*, the causative agents of yoster mushroom green mould in the cultivation substrate of *Pleurotus*

- ostreatus* by a PCR-based test. - *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 55: 209-210.
- Kredics, L., Antal, Z., Dóczy, I., Manczinger, L., Kevei, F., Nagy, E. (2003):** Clinical importance of the genus *Trichoderma*. - *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 50: 105-117.
- Kubátová A., Kolařík M., Jablonský I. (2009):** *Trichoderma aggressivum* - první nález v České republice. - *Mykologické Listy* 109: 18-24.
- Kubátová A., Prášil K., Váňová M. (2002):** Diversity of soil microscopic fungi on abandoned industrial deposits. - *Cryptogamie, Mycologie* 23(3): 205-219.
- Kubátová A., Váňová M. (2001):** Present state of research on soil microfungi of the Bohemian Forest (Šumava Mts.). - *Silva Gabreta* 7: 165-176.
- Kubicek C. P. (2004):** Molecular biology of biocontrol *Trichoderma*. - In: Arora D. K. (ed.): *Fungal biotechnology in agricultural, food and environmental applications*, p. 135-146, New York.
- Kubicek C. P., Komon-Zelazowska M., Druzhinina I. S. (2008):** Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. - *Journal of Zhejiang University Science B* 9(10): 753-763.
- Kubicek C., Bissett J., Druzhinina I., Kulling-Grandier C., Szakacs G. (2003):** Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South East Asian isolates. - *Fungal Genetics and Biology* 38(3): 310-319.
- Kubicek-Pranz E. M. (1998):** Nutrition, cellular structure and basic metabolic pathways in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Kubicek C. P., Harman E. G. (eds.): *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1, p. 95-119, London.
- Kulling C., Szakacs G., Kubicek C. (2000):** Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberian and the Himalaya. - *Mycological Research* 104(9): 1117-1125.
- Lieckfeldt E., Cavnac Y., Fekete C., Börner T. (2000):** Endochitinase gene-based phylogenetic analysis of *Trichoderma*. - *Microbiological Research* 155:1-9.
- Lieckfeldt E., Kuhls K., Muthumeenakshi S. (1998):** Molecular taxonomy of *Trichoderma* and *Gliocladium* and their teleomorphs. - In: Kubicek C. P., Harman E. G. (eds.): *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1, p. 35-56, London.
- Lieckfeldt E., Seifert K. A. (2000):** An evaluation of the use of ITS sequences in the taxonomy of the Hypocreales. - *Studies in Mycology* 45: 35- 44.

- Lübeck M., Bulat S. A., Alekhina I. A., Lieckfeldt E. (2004):** Delineation of species within the *Trichoderma viride/atroviride/koningii* complex by UP-PCR cross-blot hybridization. - FEMS Microbiology Letters 237: 255-260.
- Lübeck M., Jensen D. F. (2002):** Monitoring of biocontrol agents based on *Trichoderma* strains following their application to glasshouse crops by combining dilution plating with UP-PCR fingerprinting. - Biocontrol Science and Technology 12(3): 371-380.
- Lübeck M., Poulsen S. K., Lübeck P. S., Jensen D. F., Thrane U. (2000):** Identification of *Trichoderma* strains from building materials by ITS1 ribotyping, UP-PCR fingerprinting and UP-PCR cross hybridization. - FEMS Microbiology Letters 185: 129-134.
- Meincke R., Weinert N., Radl V., Schloter M., Smalla K., Berg G. (2010):** Development of a molecular approach to describe the composition of *Trichoderma* communities. - Journal of Microbiological Methods 80: 63-69.
- Migheli Q., Blamas V., Komon-Zelazowska M., Scherm B., Fiori S., Kopchinskiy A., Kubicek C., Druzhinina I. (2009):** Soils of a Mediterranean hot spot of biodiversity and endemism (Sardinia, Tyrrhenian Islands) are inhabited by pan-European, invasive species of *Hypocrea/Trichoderma*. - Environmental Microbiology 11(1): 35-46.
- Mueller G. M., Bills G. F., Foster M. S. (2004):** Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods. - 736 p., Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Nevalainen H., Neethling D. (1998):** The safety of *Trichoderma* and *Gliocladium*. - In: Kubicek C. P., Harman E. G. (eds.): *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1, p. 139-181, London.
- Niamke J. N., Wang N. S. (2004):** Cellulose degradation by fungi. - In: Arora D. K. (ed.): Fungal biotechnology in agricultural, food and environmental applications, p. 363-372, New York.
- Nováková A., Šimonovičová A., Kubátová A. (2012):** List of cultivable microfungi recorded from soils, soil related substrates and underground environment of the Czech and Slovak Republics. - [Link page - Mycotaxon 119: 593]; 189 pp.
- Novotný D. (1995):** Příspěvek k mykoflóře kořenů dubů s tracheomykózními příznaky [Contribution to mycoflora of the oak roots with tracheomycotic symptoms]. - In: Čížková D., Švecová M. (eds.): Sborník referátů (II) z odborného semináře Aktuální problémy ochrany dřevin, p. 52-64, Prachatice.

- O'Donnell K. (1993):** *Fusarium* and its near relatives. - In: Reynolds D. R., Taylor A. F. (eds.): The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics, p. 57-74, Wallington.
- Papavizaz G. C. (1985):** *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. - Annual Review of Phytopatology 23: 23-54.
- Ptáčnicková Š. (2010):** Mikroskopické houby rodu *Trichoderma*. - Bakal. práce, 61 p.
- Respinis S., Vogel G., Bengli C., Tobolka M., Petrini O., Samuels G. J. (2010):** MALDI-TOF MS of *Trichoderma*: a model system for the identification of microfungi. - Mycological Progress 9(1): 79-100.
- Rifai M. A. (1969):** A revision of the genus *Trichoderma*. - Mycological Papers 116: 1-56.
- Rinu K., Sati P., Pandey A. (2013):** *Trichoderma gamsii* (NFCCI 2177): A newly isolated endophytic, psychrotolerant, plant growth promoting, and antagonistic fungal strain. - Journal of Basic Microbiology. Published online 8. 4. 2013.
- Rivas M., Pavone D. (2010):** Diversidad de *Trichoderma* spp. en plantaciones de *Theobroma cacao* l. del estado Carabobo, Venezuela, y su capacidad biocontroladora sobre *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer. - Interciencia: Revista de Ciencia y Tecnología de América 35(10): 777-783.
- Řepová A. (1986):** Výskyt mikroskopických hub v ovzduší budovy ČSAV v Českých Budějovicích [The occurrence of microscopic fungi in air of the building of the Czechoslovak Academy of Science at České Budějovice]. - Česká Mykologie 40: 19-29.
- Sadfi-Zouaoui N., Hannachi I., Rouaissi M., Hajlaoui M., Rubio M. B., Monte E., Boudabous A., Hermosa M. (2009):** Biodiversity of *Trichoderma* strains in Tunisia. - Canadian Journal of Microbiology 55(2): 154-162.
- Samson R. A., Houbraken J., Thrane U., Frisvad J. C., Andersen B. (2010):** Food and indoor fungi. - 390 p., CBS Utrecht.
- Samuels G. J. (2006):** *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. - Phytopathology 96: 195-206.
- Samuels G. J., Dodd S. L., Lu B. S., Petrini O., Schroers H. J., Druzhinina I. S. (2006):** The *Trichoderma koningii* morphological species. - Studies in Mycology 56: 67-135.

- Samuels G. J., Gams W., Castlebury L. A., Petrini O. (2002):** *Trichoderma* species associated with green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. - *Mycologia* 94(1): 146-170.
- Samuels G. J., Chaverri P., Farr D. F., McCray E. B. (2013):** *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Převezato 11. 6. 2013, z <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>.
- Samuels G. J., Ismaiel A., Mulaw T. B., Szakacs G., Druzhinina I. S., Kubicek C. P., Jaklitsch W. M. (2012):** The Longibrachiatum clade of *Trichoderma*: a revision with new species. - *Fungal Diversity* 55(1): 77-108.
- Samuels G. J., Lieckfeldt E., Nirenberg H. I. (1999):** *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia and redescription *T. viride*. - *Sydowia* 51: 71-88.
- Samuels G. J., Suarez C., Solis K., Holmes K., Thomas S., Ismaiel A., Evans H. (2006b):** *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two new species isolated from cacao in South America. - *Mycological Research* 110(4): 381-392.
- Samuels, G. J. (1996):** *Trichoderma*: A review of biology and systematics of the genus. - *Mycological Research* 100: 923 - 935.
- Sivasithamparam K., Ghisalberti E. L. (1998):** Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. - In: Kubicek C. P., Harman E. G. (eds.): *Trichoderma and Gliocladium* Vol. 1, p. 139-181, London.
- Sobieralski K., Siwulski M., Komon-Zelazowska M., Blaszczyk L., Sas-Golak I., Fruzynska-Jozwiak D. (2012):** Impact of *Trichoderma pleurotum* and *T. pleuroticola* isolates on yielding of *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm.. - *Journal of Plant Protection Research* 52(1): 165-168.
- Supothina S., Isaka M., Wongs P. (2007):** Optimization of culture conditions for production of the anti-tubercular alkaloid hirsutellone A by *Trichoderma gelatinosum* BCC 7579. - *Letters in Applied Microbiology* 44(5): 531-537.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Masatoshi N., Sudhir K. (2011):** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. - *Molecular Biology and Evolution* 28(10): 2731 - 2739.

- Tang J., Liu L., Hua S., Chen Y., Chen J. (2009):** Improved degradation of organophosphate dichlorvos by *Trichoderma atroviride* transformants generated by restriction enzyme-mediated integration (REMI). - Bioresource Technology 100(1): 480-483.
- Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. (1994):** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. - Nucleic Acids Research 22 (22): 4673-4680.
- Thrane U., Poulsen S. B., Nirenberg H. I., Lieckfeldt E. (2001):** Identification of *Trichoderma* strains by image analysis of HPLC chromatograms. - FEMS Microbiology Letters 203: 249-255.
- Tondje P. R., Roberts D. P., Bon M. C., Widner T., Samuels G. J., Ismaiel A., Begoude A. D., Tchana T., Nyemb-Tshomb E., Ndounbe-Nkeng M., Bateman R., Fontem D., Hebbar K. P. (2007):** Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in cameroon. - Biological Control 43: 202-212.
- Tramoy P. (2008):** Review on the enzyme market. - Lifescience online. Published online 1. 11. 2010.
- Tulasne L. R., Tulasne C. (1865):** Selecta Fungorum Carpologia 3. - Paris. [cit. sec. Rifai 1969]
- Widden P., Hsu D. (1987):** Competition between *Trichoderma* species: effect of temperature and litter type. - Soil Biology and Biochemistry 19: 89 - 93.
- Xia X., Lie T. K., Qian X., Zheng Z., Huang Y., Shen Y. (2011):** Species diversity, distribution, and genetic structure of endophytic and epiphytic *Trichoderma* associated with banana roots. - Microbial Ecology 61: 619-625.
- Zhang C., Druzhinina I., Kubicek C., Xu T. (2005):** *Trichoderma* biodiversity in China: evidence for a North to South distribution of species in East Asia. - FEMS Microbiology Letters 251(2): 251-257.

## 7 PŘÍLOHY

Tab. 14: Seznam známých druhů rodu *Trichoderma* a jejich spojení s teleomorfo (převzato z [www.mycobank.org/](http://www.mycobank.org/))

| Název taxonu                                         | Autor                                                | Sekce       | Rok publikace | Teleomorfa                                          |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------|---------------|-----------------------------------------------------|
| <i>Trichoderma aeroaquaticum</i>                     | K. Yamaguchi, Tsurumi, Chuaseeharonnachai & Nakagiri |             | 2012          |                                                     |
| <i>Trichoderma aerugineum</i>                        | Jaklitsch                                            |             | 2009          | <i>Hypocrea aeruginea</i> Jaklitsch                 |
| <i>Trichoderma aeruginosum</i>                       | Link                                                 |             | 1816          |                                                     |
| <i>Trichoderma aethiopicum</i>                       | Mullaw, C. P. Kubicek & Samuels                      |             | 2012          |                                                     |
| <i>Trichoderma aggressivum</i>                       | Samuels & W. Gams                                    | Pachybasium | 2002          |                                                     |
| <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>aggressivum</i> |                                                      | Pachybasium |               |                                                     |
| <i>Trichoderma aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>   | Samuels & W. Gams                                    | Pachybasium | 2002          |                                                     |
| <i>Trichoderma albolutescens</i>                     | Jaklitsch                                            |             | 2011          | <i>Hypocrea albolutescens</i> Jaklitsch             |
| <i>Trichoderma alni</i>                              | Jaklitsch                                            |             | 2008          | <i>Hypocrea alni</i> Jaklitsch                      |
| <i>Trichoderma alutaceum</i>                         | Jaklitsch                                            |             | 2011          | <i>Hypocrea alutacea</i> (Pers.) Ces. & De Not.     |
| <i>Trichoderma amazonicum</i>                        | P. Chaverri & Gazis                                  |             | 2011          |                                                     |
| <i>Trichoderma arachnoideum</i>                      | Kuritzina & Sizova                                   |             | 1967          |                                                     |
| <i>Trichoderma arundinaceum</i>                      | Zafari, Gräfenhan & Samuels                          |             | 2008          |                                                     |
| <i>Trichoderma asperelloides</i>                     | Samuels                                              |             | 2010          |                                                     |
| <i>Trichoderma asperellum</i>                        | Samuels, Lieckf. & Nirenberg                         | Trichoderma | 1999          |                                                     |
| <i>Trichoderma atlanticum</i>                        | Jaklitsch                                            |             | 2011          | <i>Hypocrea atlantica</i> Jaklitsch                 |
| <i>Trichoderma atroviride</i>                        | P. Karst.                                            | Trichoderma | 1892          | <i>Hypocrea atroviridis</i> Dodd, Lieckf. & Samuels |

Tab. 14 - pokračování

| Název taxonu                                           | Autor                                | Sekce         | Rok publikace | Teleomorfa                                        |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------|---------------|---------------|---------------------------------------------------|
| <i>Trichoderma auranteffusum</i>                       | Jaklitsch                            |               | 2011          | <i>Hypocrea auranteffusa</i> Jaklitsch            |
| <i>Trichoderma aureoviride</i>                         | Rifai                                | Hypocreanum   | 1969          | <i>Hypocrea aureoviridis</i> Plowr. & Cooke       |
| <i>Trichoderma aureum</i>                              | Pers.                                |               | 1801          |                                                   |
| <i>Trichoderma austriacum</i>                          | Jaklitsch                            |               | 2011          | <i>Hypocrea austriaca</i> Jaklitsch & Voglmayr    |
| <i>Trichoderma austrokingii</i>                        | Samuels & Druzhinina                 | Trichoderma   | 2006          | <i>Hypocrea austrokingii</i> Samuels & Druzhinina |
| <i>Trichoderma bavaricum</i>                           | Jaklitsch                            |               | 2011          | <i>Hypocrea bavarica</i> Jaklitsch                |
| <i>Trichoderma brassicae</i>                           | Schumach.                            |               | 1803          |                                                   |
| <i>Trichoderma brevicompactum</i>                      | G. F. Kraus, C. P. Kubicek & W. Gams | Lone Lineages | 2004          |                                                   |
| <i>Trichoderma brunneoviride</i>                       | Jaklitsch                            |               | 2008          | <i>Hypocrea brunneoviridis</i> Jaklitsch          |
| <i>Trichoderma caesium</i>                             | Pers.                                |               | 1794          |                                                   |
| <i>Trichoderma calamagrostidis</i>                     | Jaklitsch                            |               | 2011          | <i>Hypocrea calamagrostidis</i> Jaklitsch         |
| <i>Trichoderma candidum</i>                            | Alb. & Schwein.                      | Hypocreanum   | 1805          |                                                   |
| <i>Trichoderma capillare</i>                           | Samuels & C. P. Kubicek              |               | 2012          |                                                   |
| <i>Trichoderma caribbaeum</i>                          | Samuels & Schroers                   | Trichoderma   | 2006          |                                                   |
| <i>Trichoderma caribbaeum</i> var. <i>aequatoriale</i> | Samuels & H. C. Evans                | Trichoderma   | 2006          |                                                   |
| <i>Trichoderma caribbaeum</i> var. <i>caribbaeum</i>   |                                      | Trichoderma   | 2006          | <i>Hypocrea caribbaea</i> Samuels & Schroers      |

Tab. 14 - pokračování

| Název taxonu                      | Autor                            | Sekce           | Rok publikace | Teleomorfa                                   |
|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------|---------------|----------------------------------------------|
| <i>Trichoderma carneum</i>        | Schumach.                        |                 | 1803          |                                              |
| <i>Trichoderma catoptron</i>      | P. Chaverri & Samuels            | Pachybasium     | 2003          | <i>Hypocrea catoptron</i> Berk. & Broome     |
| <i>Trichoderma ceraceum</i>       | P. Chaverri & Samuels            |                 | 2003          |                                              |
| <i>Trichoderma ceramicum</i>      | P. Chaverri & Samuels            | Hypocreanum     | 2003          | <i>Hypocrea ceramica</i> Ellis & Everh.      |
| <i>Trichoderma cerinum</i>        | Bissett, C. P. Kubicek & Szakacs | Pachybasium     | 2003          |                                              |
| <i>Trichoderma chlorosporum</i>   | P. Chaverri & Samuels            | Hypocreanum     |               |                                              |
| <i>Trichoderma chromospermum</i>  | P. Chaverri & Samuels            | Lone Lineages   | 2003          | <i>Hypocrea chromosperma</i> Cooke & Peck    |
| <i>Trichoderma cinnabarinum</i>   | Wallr.                           |                 | 1833          |                                              |
| <i>Trichoderma cinnamomeum</i>    | P. Chaverri & Samuels            | Pachybasium     | 2003          |                                              |
| <i>Trichoderma citrinoviride</i>  | Bissett                          | Longibrachiatum | 1984          |                                              |
| <i>Trichoderma collae</i>         | (Schwein.) Sacc.                 |                 | 1886          |                                              |
| <i>Trichoderma compactum</i>      | Z. F. Yu & K. Q. Zhang           | Lone Lineages   | 2007          |                                              |
| <i>Trichoderma cordobense</i>     | Speg.                            |                 | 1926          |                                              |
| <i>Trichoderma corfecianum</i>    | Sacc.                            |                 | 1911          |                                              |
| <i>Trichoderma crassum</i>        | Bissett                          | Pachybasium     | 1992          | <i>Hypocrea crassa</i> P. Chaverri & Samuels |
| <i>Trichoderma cremeum</i>        | P. Chaverri & Samuels            | Hypocreanum     | 2003          |                                              |
| <i>Trichoderma croceum</i>        | Bissett                          |                 | 1991          |                                              |
| <i>Trichoderma crystalligenum</i> | Jaklitsch                        |                 | 2006          | <i>Hypocrea crystalligena</i> Jaklitsch      |
| <i>Trichoderma cuenispurum</i>    | P. Chaverri & Samuels            |                 | 2003          |                                              |
| <i>Trichoderma dacrymycellum</i>  | Jaklitsch                        |                 | 2009          |                                              |
| <i>Trichoderma delicatulum</i>    | Jaklitsch                        |                 | 2011          | <i>Hypocrea delicatula</i> Tul. & C. Tul.    |

Tab. 14 - pokračování

| Název taxonu                    | Autor                                           | Sekce           | Rok publikace | Teleomorfa                               |
|---------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------|---------------|------------------------------------------|
| <i>Trichoderma deliquescens</i> | (Sopp) Jaklitsch                                |                 | 2011          | <i>Hypocrea lutea</i> (Tode) Petch       |
| <i>Trichoderma desrochii</i>    | Sartory & Bainier                               |                 | 1913          |                                          |
| <i>Trichoderma dingleyae</i>    | Samuels & Dodd                                  |                 | 2006          | <i>Hypocrea dingleyae</i> Samuels & Dodd |
| <i>Trichoderma dorotheae</i>    | Samuels & Dodd                                  | Trichoderma     | 2006          | <i>Hypocrea dorotheae</i> Samuels & Dodd |
| <i>Trichoderma dubium</i>       | Alb. & Schwein.                                 |                 | 1804          |                                          |
| <i>Trichoderma effusum</i>      | Bissett, C. P. Kubicek & Szakacs                | Longibrachiatum | 2003          |                                          |
| <i>Trichoderma eijii</i>        | C. S. Kim & N. Maek.                            |                 | 2012          |                                          |
| <i>Trichoderma epimyces</i>     | Jaklitsch                                       |                 | 2008          | <i>Hypocrea epimyces</i> Sacc. & Pat.    |
| <i>Trichoderma erinaceum</i>    | Bissett, C. P. Kubicek & Szakacs                | Trichoderma     | 2003          |                                          |
| <i>Trichoderma estonicum</i>    | P. Chaverri & Samuels                           | Hypocreanum     | 2003          |                                          |
| <i>Trichoderma evansii</i>      | Samuels                                         |                 | 2009          |                                          |
| <i>Trichoderma fasciculatum</i> | Bissett                                         |                 | 1992          |                                          |
| <i>Trichoderma fertile</i>      | Bissett                                         | Pachybasium     | 1992          |                                          |
| <i>Trichoderma flagellatum</i>  | Mullaw, C. P. Kubicek & Samuels                 |                 | 2012          |                                          |
| <i>Trichoderma flavofuscum</i>  | (J. H. Mill., Giddens & A.A. Foster)<br>Bissett |                 | 1992          |                                          |
| <i>Trichoderma flavum</i>       | Sommerf.                                        |                 | 1826          |                                          |
| <i>Trichoderma fomiticola</i>   | Jaklitsch                                       |                 | 2009          | <i>Hypocrea fomiticola</i> Jaklitsch     |
| <i>Trichoderma fuscum</i>       | Schumach.                                       |                 | 1803          |                                          |
| <i>Trichoderma gamsii</i>       | Samuels & Druzhin.                              |                 | 2006          |                                          |
| <i>Trichoderma gelatinosum</i>  | P. Chaverri & Samuels                           |                 | 2003          | <i>Hypocrea gelatinosa</i> (Tode) Fr.    |
| <i>Trichoderma ghanense</i>     | Yoshim. Doi, Y. Abe & Sugiy.                    | Longibrachiatum | 1987          |                                          |
| <i>Trichoderma gillesii</i>     | Samuels                                         |                 | 2012          |                                          |

Tab. 14 - pokračování

| Název taxonu                       | Autor                            | Sekce           | Rok publikace | Teleomorfa                                          |
|------------------------------------|----------------------------------|-----------------|---------------|-----------------------------------------------------|
| <i>Trichoderma globosum</i>        | Schwein.                         |                 | 1822          |                                                     |
| <i>Trichoderma gracile</i>         | Samuels & G. Szakacs             |                 | 2012          |                                                     |
| <i>Trichoderma granulorum</i>      | Fuckel                           |                 | 1870          |                                                     |
| <i>Trichoderma guttatum</i>        | Alb. & Schwein.                  |                 | 1805          |                                                     |
| <i>Trichoderma hamatum</i>         | (Bonord.) Bainier                | Trichoderma     | 1906          |                                                     |
| <i>Trichoderma harzianum</i>       | Rifai                            | Harzianum       | 1969          | <i>Hypocrea lixii</i> Pat.                          |
| <i>Trichoderma helicum</i>         | Bissett, C. P. Kubicek & Szakacs | Lone Lineages   | 2003          |                                                     |
| <i>Trichoderma inhamatum</i>       | Veerkamp & W. Gams               |                 | 1983          |                                                     |
| <i>Trichoderma intricatum</i>      | Samuels & Dodd                   | Trichoderma     | 2006          | <i>Hypocrea intricata</i> Samuels & Dodd            |
| <i>Trichoderma junci</i>           | Jaklitsch                        |                 | 2011          | <i>Hypocrea junci</i> Jaklitsch                     |
| <i>Trichoderma konilangbra</i>     | Samuels, Petrini & C.P. Kubicek  | Longibrachiatum | 1998          |                                                     |
| <i>Trichoderma koningii</i>        | Oudem.                           | Trichoderma     | 1902          | <i>Hypocrea koningii</i> Lieckf., Samuels & W. Gams |
| <i>Trichoderma koningiopsis</i>    | Samuels, C. Suárez & H. C. Evans | Trichoderma     | 2006          | <i>Hypocrea koningiopsis</i> Samuels                |
| <i>Trichoderma lacteum</i>         | Bissett                          |                 | 1992          |                                                     |
| <i>Trichoderma laeve</i>           | Pers.                            |                 | 1796          |                                                     |
| <i>Trichoderma lateritioroseum</i> | Lib.                             |                 |               |                                                     |
| <i>Trichoderma leucopus</i>        | Jaklitsch                        |                 | 2011          | <i>Hypocrea leucopus</i> (P. Karst.) H.L. Chamb.    |
| <i>Trichoderma lieckfeldtiae</i>   | Samuels                          |                 | 2009          |                                                     |
| <i>Trichoderma longibrachiatum</i> | Rifai                            | Longibrachiatum | 1969          |                                                     |
| <i>Trichoderma longipile</i>       | Bissett                          | Pachybasium     | 1991          | <i>Hypocrea longipilosa</i> Jaklitsch               |
| <i>Trichoderma luteffusum</i>      | Jaklitsch                        |                 | 2011          | <i>Hypocrea luteffusa</i> Jaklitsch                 |

Tab. 14 - pokračování

| Název taxonu                         | Autor                          | Sekce         | Rok publikace | Teleomorfa                                                         |
|--------------------------------------|--------------------------------|---------------|---------------|--------------------------------------------------------------------|
| <i>Trichoderma luteocrystallinum</i> | Jaklitsch                      |               | 2011          | <i>Hypocrea luteocrystallina</i> Jaklitsch, Siepe & L.G. Krieglst. |
| <i>Trichoderma margaretense</i>      | Jaklitsch                      |               | 2011          | <i>Hypocrea margaretensis</i> Jaklitsch                            |
| <i>Trichoderma martiale</i>          | Samuels                        |               | 2008          |                                                                    |
| <i>Trichoderma melanomagnum</i>      | P. Chaverri & Samuels          | Lone Lineages | 2003          |                                                                    |
| <i>Trichoderma mienum</i>            | C. S. Kim, Nakagiri & N. Maek. |               | 2012          |                                                                    |
| <i>Trichoderma minutisporum</i>      | Bissett                        | Pachybasium   | 1991          | <i>Hypocrea minutispora</i> B.S. Lu, Fallah & Samuels              |
| <i>Trichoderma minutum</i>           | Bainier                        |               | 1906          |                                                                    |
| <i>Trichoderma moravicum</i>         | Jaklitsch                      |               | 2011          | <i>Hypocrea moravica</i> Petr.                                     |
| <i>Trichoderma mycophilum</i>        | (Pers.) Schwein.               |               | 1822          |                                                                    |
| <i>Trichoderma neokoningii</i>       | Samuels & Sober.               |               | 2006          |                                                                    |
| <i>Trichoderma neorufoides</i>       | Jaklitsch                      |               | 2011          | <i>Hypocrea neorufoides</i> Jaklitsch                              |
|                                      |                                |               |               |                                                                    |
| <i>Trichoderma nigrovirens</i>       | Goddard                        | Lone Lineages | 1913          |                                                                    |
| <i>Trichoderma oblongisporum</i>     | Bissett                        | Pachybasium   | 1992          |                                                                    |
| <i>Trichoderma ovalisporum</i>       | Samuels & Schroers             | Trichoderma   | 2004          |                                                                    |
| <i>Trichoderma pachypallidum</i>     | Jaklitsch                      |               | 2011          | <i>Hypocrea pachypallida</i> Jaklitsch                             |
| <i>Trichoderma parepimyces</i>       | Jaklitsch                      |               | 2009          | <i>Hypocrea parepimyces</i> Jaklitsch                              |
| <i>Trichoderma parestonicum</i>      | Jaklitsch                      |               | 2009          | <i>Hypocrea parestonica</i> Jaklitsch                              |
| <i>Trichoderma paucisporum</i>       | Samuels, C. Suárez & K. Solis  |               | 2006          |                                                                    |
| <i>Trichoderma pedunculatum</i>      | Schumach.                      |               | 1803          |                                                                    |
| <i>Trichoderma penicillatum</i>      | Wallr.                         |               | 1833          |                                                                    |

Tab. 14 - pokračování

| Název taxonu                         | Autor                         | Sekce           | Rok publikace | Teleomorfa                                          |
|--------------------------------------|-------------------------------|-----------------|---------------|-----------------------------------------------------|
| <i>Trichoderma petersenii</i>        | Samuels, Dodd & Schroers      | Trichoderma     | 2006          | <i>Hypocrea petersenii</i> Samuels, Dodd & Schroers |
| <i>Trichoderma pezizoideum</i>       | Wallr.                        |                 | 1833          |                                                     |
| <i>Trichoderma phellinicola</i>      | Jaklitsch                     |                 | 2011          | <i>Hypocrea phellinicola</i> Jaklitsch              |
| <i>Trichoderma phyllostachydis</i>   | P. Chaverri & Samuels         | Lone Lineages   | 2003          | <i>Hypocrea phyllostachydis</i> P. Chaverri & Cand. |
| <i>Trichoderma piluliferum</i>       | J. Webster & Rifai            | Pachybasium     | 1969          | <i>Hypocrea pilulifera</i> J. Webster & Rifai       |
| <i>Trichoderma pinnatum</i>          | Samuels                       |                 | 2012          |                                                     |
| <i>Trichoderma placentula</i>        | Jaklitsch                     |                 | 2011          | <i>Hypocrea placentula</i> Grove                    |
| <i>Trichoderma pleuroti</i>          | S.H. Yu & M.S. Park           | Pachybasium     | 2006          | -                                                   |
| <i>Trichoderma pleuroticola</i>      | S.H. Yu & M.S. Park           | Pachybasium     | 2006          |                                                     |
| <i>Trichoderma polysporum</i>        | (Link) Rifai                  | Pachybasium     | 1969          | <i>Hypocrea pachybasioides</i> Yoshim. Doi          |
| <i>Trichoderma protrudens</i>        | Samuels & Chaverri            |                 | 2008          |                                                     |
| <i>Trichoderma pseudocandidum</i>    | P. Chaverri, Samuels & Minnis |                 | 2009          |                                                     |
| <i>Trichoderma pseudokoningii</i>    | Rifai                         | Longibrachiatum | 1969          |                                                     |
| <i>Trichoderma pseudolacteum</i>     | C. S. Kim & N. Maek.          |                 | 2012          |                                                     |
| <i>Trichoderma pseudonigrovirens</i> | P. Chaverri, Samuels & Minnis |                 | 2009          | <i>Hypocrea nigrovirens</i> P. Chaverri & Samuels   |

Tab. 14 - pokračování

| Název taxonu                        | Autor                            | Sekce           | Rok publikace | Teleomorfa                                               |
|-------------------------------------|----------------------------------|-----------------|---------------|----------------------------------------------------------|
| <i>Trichoderma psychrophilum</i>    | Jaklitsch                        |                 | 2011          | <i>Hypocrea psychrophila</i> E. Müll., Aebi & J. Webster |
| <i>Trichoderma pubescens</i>        | Bissett                          | Trichoderma     | 1992          |                                                          |
| <i>Trichoderma pyrenium</i>         | Pers.                            |                 | 1801          |                                                          |
| <i>Trichoderma racemosum</i>        | McAlpine                         |                 | 1902          |                                                          |
| <i>Trichoderma reesei</i>           | E. G. Simmons                    | Longibrachiatum | 1977          |                                                          |
| <i>Trichoderma rogersonii</i>       | Samuels                          |                 | 2006          | <i>Hypocrea rogersonii</i> Samuels                       |
| <i>Trichoderma rossicum</i>         | Bissett, C. P. Kubicek & Szakacs | Pachybasium     | 2003          |                                                          |
| <i>Trichoderma rubropallens</i>     | Schwein.                         |                 | 1832          |                                                          |
| <i>Trichoderma samuelsii</i>        | Jaklitsch & Voglmayr             |                 | 2012          |                                                          |
| <i>Trichoderma saturnisporopsis</i> | Samuels & W Jaklitsch            |                 | 2012          |                                                          |
| <i>Trichoderma saturnisporum</i>    | Hammill                          | Longibrachiatum | 1970          |                                                          |
| <i>Trichoderma scalesiae</i>        | Samuels & H. C. Evans            |                 | 2006          |                                                          |
| <i>Trichoderma seppoi</i>           | Jaklitsch                        |                 | 2008          |                                                          |
| <i>Trichoderma silvae-virgineae</i> | Jaklitsch                        |                 | 2011          | <i>Hypocrea silvae-virgineae</i> Jaklitsch               |
| <i>Trichoderma sinensis</i>         | Bissett, C. P. Kubicek & Szakacs | Longibrachiatum | 2003          |                                                          |
| <i>Trichoderma sinuosum</i>         | P. Chaverri & Samuels            | Hypocreanum     | 2003          | <i>Hypocrea sinuosa</i> P. Chaverri & Samuels            |
| <i>Trichoderma solani</i>           | Samuels, V. Doyle & V. S. Lopez  |                 | 2012          |                                                          |
| <i>Trichoderma spirale</i>          | Bissett                          | Lone Lineages   | 1992          |                                                          |
| <i>Trichoderma stilbohypoxyli</i>   | Samuels & Schroers               | Trichoderma     | 2006          | <i>Hypocrea stilbohypoxyli</i> B.S. Lu & Samuels         |

Tab. 14 - pokračování

| Název taxonu                      | Autor                                         | Sekce       | Rok publikace | Teleomorfa                                                |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------|-------------|---------------|-----------------------------------------------------------|
| <i>Trichoderma stramineum</i>     | P. Chaverri & Samuels                         | Pachybasium | 2003          | <i>Hypocrea straminella</i> P. Chaverri, Samuels & Minnis |
| <i>Trichoderma strictipile</i>    | Bissett                                       |             | 1992          | <i>Hypocrea strictipilosa</i> P. Chaverri & Samuels       |
| <i>Trichoderma strigosum</i>      | Bissett                                       | Trichoderma | 1991          |                                                           |
| <i>Trichoderma stromaticum</i>    | Samuels & Pardo-Schulth.                      | Pachybasium | 2000          |                                                           |
| <i>Trichoderma subalpinum</i>     | Jaklitsch                                     |             | 2011          | <i>Hypocrea subalpina</i> Petr.                           |
| <i>Trichoderma subeffusum</i>     | Jaklitsch                                     |             | 2011          | <i>Hypocrea subeffusa</i> Jaklitsch                       |
| <i>Trichoderma surrotundum</i>    | P. Chaverri & Samuels                         | Hypocreanum | 2003          |                                                           |
| <i>Trichoderma sympodianum</i>    | Kulik                                         |             | 1960          |                                                           |
| <i>Trichoderma taiwanense</i>     | Samuels & M. L. Wu                            | Trichoderma | 2006          |                                                           |
| <i>Trichoderma tawa</i>           | P. Chaverri & Samuels                         | Trichoderma | 2003          | <i>Hypocrea tawa</i> Dingley                              |
| <i>Trichoderma taxi</i>           | Chu L. Zhang, F. C. Lin & C. P. Kubicek       |             | 2007          |                                                           |
| <i>Trichoderma thailandicum</i>   | P. Chaverri & Samuels                         | Pachybasium | 2003          |                                                           |
| <i>Trichoderma thelephoricola</i> | P. Chaverri & Samuels                         | Hypocreanum | 2003          |                                                           |
| <i>Trichoderma theobromicola</i>  | Samuels & H. C. Evans                         | Trichoderma | 2006          |                                                           |
| <i>Trichoderma tomentosum</i>     | Bissett                                       | Pachybasium | 1991          |                                                           |
| <i>Trichoderma tremelloides</i>   | Jaklitsch                                     |             | 2011          | <i>Hypocrea tremelloides</i> (Schumach.) Fr.              |
| <i>Trichoderma turrialbense</i>   | Samuels, Degenkolb, K. F. Nielsen & Gräfenhan |             | 2008          |                                                           |
| <i>Trichoderma valdunense</i>     | Jaklitsch                                     |             | 2011          | <i>Hypocrea valdunensis</i> Jaklitsch                     |
| <i>Trichoderma varians</i>        | Sartory & Bainier                             |             | 1912          |                                                           |

Tab. 14 - pokračování

| Název taxonu                                     | Autor                                           | Sekce         | Rok publikace | Teleomorfa                                                 |
|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------|---------------|------------------------------------------------------------|
| <i>Trichoderma varium</i>                        | Ehrenb.                                         |               | 1818          |                                                            |
| <i>Trichoderma velutinum</i>                     | Bissett, C. P. Kubicek & Szakacs                | Pachybasium   | 2003          |                                                            |
| <i>Trichoderma vinosum</i>                       | Samuels                                         |               | 2006          | <i>Hypocrea vinosa</i> Cooke                               |
| <i>Trichoderma violaceum</i>                     | Oudem.                                          |               | 1904          |                                                            |
| <i>Trichoderma virens</i>                        | (J. H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx        | Pachybasium   | 1987          | <i>Hypocrea virens</i> P. Chaverri, Samuels & E.L. Stewart |
| <i>Trichoderma viride</i>                        | Pers.                                           | Trichoderma   | 1794          | <i>Hypocrea rufa</i> (Pers.) Fr.                           |
| <i>Trichoderma viride</i> var. <i>kizhanense</i> | Krapiv., L. A. Poljak. & Sizova                 | Trichoderma   | 1975          |                                                            |
| <i>Trichoderma viridescens</i>                   | (A. S. Horne & H. S. Will.) Jaklitsch & Samuels | Trichoderma   | 2006          | <i>Hypocrea viridescens</i> Jaklitsch & Samuels            |
| <i>Trichoderma voglmayrii</i>                    | Jaklitsch                                       | Lone Lineages | 2006          | <i>Hypocrea voglmayrii</i> Jaklitsch                       |
| <i>Trichoderma vulpinum</i>                      | Fuckel                                          |               | 1874          |                                                            |
| <i>Trichoderma yunnanense</i>                    | Z. F. Yu & K. Q. Zhang                          |               | 2007          |                                                            |

Tab. 15: Přehled studovaných izolátů rodu *Trichoderma* včetně charakteru substrátu a lokality. (Izoláty označené \* nepochází z území ČR, nebyly do studie zařazeny, byly pouze revidovány).

| Číslo izolátu | Identifikace genotypová            | Identifikace fenotypová                      | Rok izolace | Kategorie substrátu    | Substrát                                          | m n. m. | Lokalita                                     | Region      |
|---------------|------------------------------------|----------------------------------------------|-------------|------------------------|---------------------------------------------------|---------|----------------------------------------------|-------------|
| AK182/02      | <i>T. aggressivum</i>              | <i>T. aggressivum</i>                        | XI. 2002    | půda rašeliništní      | substrát rašeliniště v borosmrkovém lese          | 730     | Rašeliniště Houska, Šumava                   | JZ Čechy    |
| AK221/94      | <i>T. aggressivum</i>              | <i>T. aggressivum</i>                        | XI. 1994    | dřevo/povrch brouků    | <i>Quercus petraea</i> , větev                    | 400     | Dřevíč u Nižbora, Křivoklátsko               | stř. Čechy  |
| CCF3862       | <i>T. aggressivum f. europaeum</i> | <i>T. harzianum</i> / <i>T. aggressivum</i>  | VI. 2007    | ostatní                | žampionový substrát                               | 500     | Kovářov - Předbořice                         | stř. Čechy  |
| CCF3865       | <i>T. aggressivum f. europaeum</i> | <i>T. harzianum</i> / <i>T. aggressivum</i>  | VII.2006    | ostatní                | žampionový substrát                               | 500     | Kovářov - Předbořice                         | stř. Čechy  |
| AK113/99      | <i>T. atroviride</i>               | <i>T. atroviride</i> / <i>T. aggressivum</i> | VI. 1999    | dřevo/povrch brouků    | <i>Scolytus intricatus</i> , <i>Quercus robur</i> | 190     | Bačov, Velký Osek, Polabí                    | stř. Čechy  |
| AK114/11      | <i>T. atroviride</i>               | <i>T. viride</i>                             | IX. 2011    | půda antropogenní      | substrát výsyvky                                  | 760     | výsyпка dolu Eduard u Jáchymova, Krušné hory | Z Čechy     |
| AK114/95      | <i>T. atroviride</i>               | <i>T. atroviride</i>                         | IX. 1995    | dřevo/povrch brouků    | <i>Quercus robur</i> , kmen                       | 320     | Znojemsko                                    | J Morava    |
| AK118/11      | <i>T. atroviride</i>               | <i>T. atroviride</i>                         | XI. 2011    | potraviný/krmiva       | voda balená, ochucená                             |         | Praha                                        | stř. Čechy  |
| AK164/91      | <i>T. atroviride</i>               | <i>T. viride</i> (bez hrbolků)               | XII. 1991   | dřevo/povrch brouků    | <i>Quercus</i> sp.                                | 350     | Okrouhlo, Jílové u Prahy                     | stř. Čechy  |
| AK165/91      | <i>T. atroviride</i>               | <i>T. viride</i> (bez hrbolků)               | XII. 1991   | dřevo/povrch brouků    | <i>Quercus</i> sp.                                | 350     | Okrouhlo, Jílové u Prahy                     | stř. Čechy  |
| AK175/91      | <i>T. atroviride</i>               | <i>T. viride</i>                             | XII. 1991   | dřevo/povrch brouků    | <i>Quercus petraea</i> , kmen                     | 350     | Okrouhlo, Jílové u Prahy                     | stř. Čechy  |
| AK21/94       | <i>T. atroviride</i>               | <i>T. aggressivum</i> / <i>T. atroviride</i> | IV. 1994    | dřevo/povrch brouků    | <i>Pinus nigra</i> , kmen                         | 450     | Hudlice u Berouna                            | stř. Čechy  |
| AK220/94      | <i>T. atroviride</i>               | <i>T. atroviride</i>                         | XI. 1994    | dřevo/povrch brouků    | <i>Quercus petraea</i> , větev                    | 400     | Dřevíč u Nižbora, Křivoklátsko               | stř. Čechy  |
| AK23/94       | <i>T. atroviride</i>               | <i>T. aureoviride</i>                        | IV. 1994    | dřevo/povrch brouků    | <i>Pinus nigra</i> , kořen                        | 450     | Hudlice u Berouna                            | stř. Čechy  |
| AK26/10       | <i>T. atroviride</i>               | <i>T. atroviride</i>                         | II. 2010    | ostatní                | plesnivý nápoj Ice Tea                            | 210     | Praha                                        | stř. Čechy  |
| AK6/92        | <i>T. atroviride</i>               | <i>T. aggressivum</i>                        | II. 1992    | dřevo/povrch brouků    | <i>Picea abies</i> , borka                        | 1060    | Kvilda, Šumava                               | JZ Čechy    |
| AK72/07       | <i>T. atroviride</i>               | <i>neurceno</i>                              | II. 2007    | půda                   | půda s travinným porostem                         | 280     | Hradčany u Mimoně                            | S Čechy     |
| AK83/93       | <i>T. atroviride</i>               | <i>T. viride</i> (bez hrbolků)               | V. 1993     | dřevo/povrch brouků    | <i>Quercus robur</i> , kmen                       | 500     | Dešov, Moravské Budějovice                   | JZ Morava   |
| AK86/93       | <i>T. atroviride</i>               | <i>T. atroviride</i>                         | V. 1993     | dřevo/povrch brouků    | <i>Quercus robur</i> , kmen                       | 500     | Dešov, Moravské Budějovice                   | JZ Morava   |
| CCF2691 *     | <i>T. atroviride</i>               | <i>T. hamatum</i>                            | X.1985      | půda jehličnatého lesa | půda modřínového lesa                             |         | Cisowek, Suwalski park                       | Polsko      |
| CCF3910       | <i>T. atroviride</i>               | <i>T. atroviride</i>                         | XI.2006     | opad                   | listový opad břízy v opadových sáčcích            | 215     | Chvaletice                                   | V Čechy     |
| T24           | <i>T. atroviride</i>               | <i>T. atroviride</i>                         | III. 2012   | opad                   | opad dubohabrového lesa                           | 400     | Ždánice                                      | V Morava    |
| T29           | <i>T. atroviride</i>               | <i>T. viride</i> (bez hrbolků)               | III. 2012   | opad                   | opad olšiny                                       | 435     | Zálesí                                       | Z Morava    |
| T46           | <i>T. atroviride</i>               | <i>T. atroviride</i>                         | III. 2012   | opad                   | opad olšiny                                       | 420     | Mirochov                                     | J Čechy     |
| AK116/99      | <i>T. citrinoviride</i>            | <i>T. citrinoviride</i>                      | III. 1999   | potraviný/krmiva       | těstoviny                                         |         | Česká republika                              |             |
| AK145/96      | <i>T. citrinoviride</i>            | <i>T. citrinoviride</i>                      | VIII. 1996  | ovzduší                | venkovní ovzduší                                  | 210     | Praha                                        | stř. Čechy  |
| AK16/00       | <i>T. citrinoviride</i>            | <i>T. citrinoviride</i>                      | I. 2000     | ostatní                | obal na jogurt                                    | 350     | Benešov                                      | stř. Čechy  |
| AK167/91      | <i>T. citrinoviride</i>            | <i>T. longibrachiatum</i>                    | XII. 1991   | dřevo/povrch brouků    | <i>Quercus</i> sp.                                | 350     | Okrouhlo, Jílové u Prahy                     | stř. Čechy  |
| AK51/94       | <i>T. citrinoviride</i>            | <i>T. koningii</i>                           | IV. 1994    | dřevo/povrch brouků    | <i>Pinus silvestris</i> , kmen                    | 450     | Hudlice u Berouna                            | stř. Čechy  |
| AK90/10       | <i>T. citrinoviride</i>            | <i>T. citrinoviride</i>                      | IX. 2010    | ovzduší                | vnitřní ovzduší nemocnice                         | 210     | Olomouc                                      | stř. Morava |
| CCF1352       | <i>T. citrinoviride</i>            | <i>T. koningii</i>                           | 1968        | ostatní                | povrch stěny podzemní štol                        |         | Příbram                                      | stř. Čechy  |
| CCF1455 *     | <i>T. citrinoviride</i>            | <i>T. koningii</i>                           | 1972        | půda alpinská          | půda blíže nespecifikována                        |         | Himálaj                                      | Asie        |
| CCF2715       | <i>T. citrinoviride</i>            | <i>T. pseudokoningii</i>                     | IV.1986     | dřevo/povrch brouků    | <i>Picea</i> sp., dřevo pařezu                    | 350     | Třebotov, Praha - západ                      | stř. Čechy  |
| CCF2768 *     | <i>T. citrinoviride</i>            | <i>T. pseudokoningii</i>                     | VIII.1992   | půda                   | půda skleníku                                     |         | Heverlee                                     | Belgie      |
| CCF3911       | <i>T. citrinoviride</i>            | <i>T. citrinoviride</i>                      | IX.2006     | opad                   | listový opad břízy v opadových sáčcích            | 215     | Chvaletice                                   | V Čechy     |
| AK110/91      | <i>T. crassum</i>                  | <i>T. virens</i>                             | VIII. 1991  | půda smíš./list. lesa  | půda smíšeného lesa                               | 440     | Smrček u Pernštejna                          | stř. Morava |
| AK184/06      | <i>T. gamsii</i>                   | <i>T. koningii</i>                           | VIII. 2006  | půda zemědělská        | půda pastviny                                     | 300     | Netluky, Praha - Uhřetěves                   | stř. Čechy  |
| AK341         | <i>T. ghanense</i>                 | <i>T. longibrachiatum</i>                    | III. 1989   | půda smíš./list. lesa  | půda smíšeného porostu říčního břehu              | 190     | Postoloprty                                  | SZ Čechy    |
| AK111/02      | <i>T. hamatum</i>                  | <i>T. hamatum</i>                            | X. 2002     | půda rašeliništní      | substrát rašeliniště                              | 1430    | Úpské rašeliniště, Krkonoše                  | SV Čechy    |
| AK111/95      | <i>T. hamatum</i>                  | <i>T. hamatum</i>                            | IX. 1995    | půda antropogenní      | substrát odkaliště                                | 215     | Chvaletice                                   | V Čechy     |
| AK121/99      | <i>T. hamatum</i>                  | <i>T. hamatum</i>                            | VII. 1999   | půda rašeliništní      | substrát rašeliniště                              | 730     | rašeliniště Houska, Šumava                   | JZ Čechy    |
| AK15/94       | <i>T. hamatum</i>                  | <i>T. hamatum</i>                            | III. 1994   | půda antropogenní      | substrát odkaliště                                | 215     | Chvaletice                                   | V Čechy     |

Tab. 15: pokračování

| Číslo izolátu | Identifikace genotypová | Identifikace fenotypová  | Rok izolace | Kategorie substrátu    | Substrát                                              | m n. m. | Lokalita                               | Region     |
|---------------|-------------------------|--------------------------|-------------|------------------------|-------------------------------------------------------|---------|----------------------------------------|------------|
| AK203/01      | <i>T. hamatum</i>       | <i>T. hamatum</i>        | X. 2001     | půda rašeliništní      | substrát rašeliniště pod kosodřevinou                 | 1400    | Úpské rašeliniště, Krkonoše            | SV Čechy   |
| AK22/94       | <i>T. hamatum</i>       | <i>T. hamatum</i>        | IV. 1994    | dřevo/povrch brouků    | <i>Pinus nigra</i> , kořen                            | 450     | Hudlice u Berouna                      | stř. Čechy |
| AK254/93      | <i>T. hamatum</i>       | <i>T. hamatum</i>        | X. 1993     | půda rašeliništní      | substrát rašeliniště                                  | 740     | Mrtvý luh, Šumava                      | JZ Čechy   |
| AK256/93      | <i>T. hamatum</i>       | <i>T. hamatum</i>        | XI. 1993    | půda smíř./list. lesa  | půda bukového lesa                                    | 950     | Medvědice, Stožec, Šumava              | JZ Čechy   |
| AK34/07       | <i>T. hamatum</i>       | <i>T. hamatum</i>        | I. 2007     | půda antropogenní      | substrát odkaliště                                    | 215     | Chvaletice                             | V Čechy    |
| AK38/07       | <i>T. hamatum</i>       | <i>T. hamatum</i>        | I. 2007     | půda antropogenní      | substrát odkaliště                                    | 215     | Chvaletice                             | V Čechy    |
| AK40/07       | <i>T. hamatum</i>       | <i>T. koningii</i>       | I. 2007     | půda antropogenní      | substrát odkaliště                                    | 215     | Chvaletice                             | V Čechy    |
| AK416         | <i>T. hamatum</i>       | <i>T. hamatum</i>        | VIII. 1989  | půda smíř./list. lesa  | půda bukosmrkového lesa                               | 725     | Velký Špičák (Českomoravská vrchovina) | V Čechy    |
| AK62/94       | <i>T. hamatum</i>       | <i>T. hamatum</i>        | V. 1994     | půda rašeliništní      | substrát rašeliniště                                  | 1070    | Jezerní slat', Šumava                  | JZ Čechy   |
| AK74/07       | <i>T. hamatum</i>       | <i>T. hamatum</i>        | II. 2007    | půda                   | půda s travinným porostem                             | 280     | Hradčany u Mimoně                      | S Čechy    |
| CCF2390       | <i>T. hamatum</i>       | <i>T. hamatum</i>        | IX. 1988    | dřevo/povrch brouků    | trouchnivá kůra                                       | 400     | Řevnice                                | stř. Čechy |
| T15           | <i>T. hamatum</i>       | <i>T. hamatum</i>        | III. 2012   | opad                   | opad dubohabrového lesa                               | 355     | Nevojice                               | V Morava   |
| T18           | <i>T. hamatum</i>       | <i>T. hamatum</i>        | III. 2012   | opad                   | opad dubohabrového lesa                               | 305     | Mikulov                                | J Morava   |
| T21           | <i>T. hamatum</i>       | <i>T. pseudokoningii</i> | III. 2012   | opad                   | opad olšiny                                           | 430     | Zálesi                                 | Z Morava   |
| T30           | <i>T. hamatum</i>       | <i>T. hamatum</i>        | III. 2012   | opad                   | opad olšiny                                           | 430     | Zálesi                                 | Z Morava   |
| T34           | <i>T. hamatum</i>       | <i>T. pseudokoningii</i> | III. 2012   | opad                   | opad dubohabrového lesa                               | 410     | Kloboučky                              | V Morava   |
| T37           | <i>T. hamatum</i>       | <i>T. hamatum</i>        | III. 2012   | opad                   | opad olšiny                                           | 490     | Staňkov                                | J Čechy    |
| T39           | <i>T. hamatum</i>       | <i>T. pseudokoningii</i> | III. 2012   | opad                   | opad bukového lesa                                    | 510     | Annín                                  | J Čechy    |
| T41           | <i>T. hamatum</i>       | <i>T. hamatum</i>        | III. 2012   | opad                   | opad dubohabrového lesa                               | 355     | Nevojice                               | V Morava   |
| AK106/95      | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>      | VIII. 1995  | půda jehličnatého lesa | půda smrkového lesa                                   | 1305    | Svaroh, Šumava                         | JZ Čechy   |
| AK107/94      | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>      | VI. 1994    | půda antropogenní      | substrát odkaliště                                    | 215     | Chvaletice                             | V Čechy    |
| AK108/95      | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. citrinoviride</i>  | IX. 1995    | dřevo/povrch brouků    | <i>Quercus petraea</i> , kořen                        | 450     | Plasy u Plzně                          | Z Čechy    |
| AK110/95      | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>      | IX. 1995    | půda antropogenní      | substrát odkaliště                                    | 215     | Chvaletice                             | V Čechy    |
| AK112/95      | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>      | IX. 1995    | dřevo/povrch brouků    | <i>Quercus robur</i> , kmen                           | 320     | Znojensko                              | J Morava   |
| AK112/99      | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>      | VI. 1999    | dřevo/povrch brouků    | <i>Scolytus intricatus</i> , <i>Quercus robur</i>     | 190     | Bačov, Velký Osek, Polabí              | stř. Čechy |
| AK113/95      | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>      | IX. 1995    | dřevo/povrch brouků    | <i>Quercus robur</i> , větev                          | 320     | Znojensko                              | J Morava   |
| AK123/07      | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. hamatum</i>        | IV. 2007    | půda antropogenní      | substrát odkaliště                                    | 215     | Chvaletice                             | V Čechy    |
| AK13/05       | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. aggressivum</i>    | VI. 2005    | dřevo/povrch brouků    | mraveniště pod borkou kmene                           | 160     | PR Černínovsko u Neratovic             | stř. Čechy |
| AK135/06      | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. atroviride</i>     | VI. 2006    | půda antropogenní      | substrát odkaliště                                    | 500     | Jívka u Radvanic                       | SV Čechy   |
| AK170/06      | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>      | VIII. 2006  | půda zemědělská        | půda pastviny                                         | 300     | Netluky, Praha - Uhřetěves             | stř. Čechy |
| AK175/95      | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>      | XII. 1995   | půda antropogenní      | substrát odkaliště                                    | 215     | Chvaletice                             | V Čechy    |
| AK183/02      | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>      | XI. 2002    | půda jehličnatého lesa | půda blatkového lesa                                  | 730     | Rašeliniště Houska, Šumava             | JZ Čechy   |
| AK194/06      | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>      | IV. 2006    | půda zemědělská        | půda strniště                                         | 270     | Praha - Uhřetěves                      | stř. Čechy |
| AK200/06      | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>      | IV. 2006    | půda antropogenní      | substrát odkaliště                                    | 215     | Chvaletice                             | V Čechy    |
| AK233/94      | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>      | XII. 1994   | půda antropogenní      | substrát odkaliště                                    | 215     | Chvaletice                             | V Čechy    |
| AK24/94       | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>      | IV. 1994    | dřevo/povrch brouků    | <i>Robinia pseudoacacia</i> , kmen                    | 380     | Hudlice u Berouna                      | stř. Čechy |
| AK244/93      | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>      | XI. 1993    | půda smíř./list. lesa  | půda bukového lesa                                    | 950     | Medvědice, Stožec, Šumava              | JZ Čechy   |
| AK247/93      | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>      | VII. 1993   | půda antropogenní      | substrát odkaliště                                    | 215     | Chvaletice                             | V Čechy    |
| AK289/05      | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>      | X. 2005     | půda antropogenní      | substrát odkaliště                                    | 215     | Chvaletice                             | V Čechy    |
| AK32/98       | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>      | IV. 1998    | dřevo/povrch brouků    | <i>Scolytus intricatus</i> , <i>Quercus polycarpa</i> | 190     | Libický luh, Velký Osek                | stř. Čechy |
| AK35/07       | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>      | I. 2007     | půda antropogenní      | substrát odkaliště                                    | 215     | Chvaletice                             | V Čechy    |
| AK39/06       | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>      | I. 2006     | půda                   | půda s travinným porostem                             | 280     | Hradčany u Mimoně                      | S Čechy    |

Tab. 15: pokračování

| Číslo izolátu | Identifikace genotypová | Identifikace fenotypová | Rok izolace | Kategorie substrátu   | Substrát                                            | m n. m. | Lokalita                       | Region      |
|---------------|-------------------------|-------------------------|-------------|-----------------------|-----------------------------------------------------|---------|--------------------------------|-------------|
| AK44/05       | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>     | VI. 2005    | půda antropogenní     | substrát odkaliště                                  | 810     | Měděnec                        | SZ Čechy    |
| AK45/11       | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>     | III. 2011   | ostatní               | stěr ze stěny podzemní štol                         | 430     | Trhové Dušníky, Příbramsko     | stř. Čechy  |
| AK55/95       | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>     | IV. 1995    | ostatní               | krém na ruce s <i>Calendula officinalis</i>         | 400     | Nové Město nad Metují          | V Čechy     |
| AK60/03       | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. atroviride</i>    | V. 2003     | dřevo/povrch brouků   | <i>Carpinus betulus</i> , ležící větev              | 300     | Všenory                        | stř. Čechy  |
| AK61/03       | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. aggressivum</i>   | V. 2003     | dřevo/povrch brouků   | <i>Carpinus betulus</i> , ležící větev              | 300     | Všenory                        | stř. Čechy  |
| AK61/97       | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>     | IV. 1997    | dřevo/povrch brouků   | <i>Scolytus intricatus</i> , <i>Quercus petraea</i> | 500     | Kohoutov, Zbiroh, Křivoklátsko | stř. Čechy  |
| AK67/95       | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>     | III. 1995   | půda antropogenní     | substrát odkaliště                                  | 215     | Chvaletice                     | V Čechy     |
| AK68/95       | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>     | III. 1995   | půda antropogenní     | substrát odkaliště                                  | 215     | Chvaletice                     | V Čechy     |
| AK71/92       | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>     | VI. 1992    | dřevo/povrch brouků   | <i>Quercus petraea</i> , kmen                       | 450     | Hluboká nad Vltavou            | J Čechy     |
| AK73/92       | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>     | VI. 1992    | dřevo/povrch brouků   | <i>Quercus petraea</i> , kmen                       | 450     | Hluboká nad Vltavou            | J Čechy     |
|               |                         |                         |             |                       |                                                     |         |                                |             |
| AK82/07       | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>     | II. 2007    | půda antropogenní     | substrát odkaliště                                  | 215     | Chvaletice                     | V Čechy     |
| AK84/93       | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>     | V. 1993     | dřevo/povrch brouků   | <i>Quercus robur</i> , kmen                         | 500     | Dešov, Moravské Budějovice     | JZ Morava   |
| AK91/10       | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>     | IX. 2010    | ovzduší               | vnitřní ovzduší nemocnice                           | 210     | Olomouc                        | stř. Morava |
| AK94/10       | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>     | XI. 2010    | dřevo/povrch brouků   | ležící větev                                        | 350     | Praha - Ládví                  | stř. Čechy  |
| AK95/06       | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>     | III. 2006   | půda antropogenní     | substrát odkaliště                                  | 215     | Chvaletice                     | V Čechy     |
| CCF2687 *     | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>     | X.1985      | půda smíš./list. lesa | půda v městském parku                               |         | Suwalki                        | Polsko      |
| CCF2713       | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>     | IV.1986     | dřevo/povrch brouků   | <i>Picea</i> sp., dřevo pařezu                      | 350     | Třebotov, Praha - západ        | stř. Čechy  |
| CCF2714       | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>     | V.1986      | dřevo/povrch brouků   | <i>Picea</i> sp., dřevo pařezu                      | 300     | Průhonice u Prahy              | stř. Čechy  |
| CCF3814       | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>     | XI.2003     | půda                  | slabě zasolená půda (pH 7,4), bylinný porost        | 440     | NPR Soos                       | Z Čechy     |
| T11           | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>     | IX. 2009    | půda zemědělská       | půda pole s cukrovou řepou                          | 280     | Střednice                      | stř. Čechy  |
| T19           | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. aggressivum</i>   | III. 2012   | půda                  | půda vřesoviště                                     | 320     | Znojmo                         | J Morava    |
| T25           | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>     | III. 2012   | opad                  | opad dubohabrového lesa                             | 250     | Mikulov                        | J Morava    |
| T32           | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>     | III. 2012   | opad                  | opad olšiny                                         | 435     | Zálesí                         | Z Morava    |
| T35           | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. aggressivum</i>   | III. 2012   | půda                  | půda vřesoviště                                     | 290     | Znojmo                         | J Morava    |
| T38           | <i>T. harzianum</i>     | <i>T. harzianum</i>     | III. 2012   | opad                  | opad bukového lesa                                  | 50      | Annín                          | J Čechy     |
| AK113/11      | <i>T. koningii</i>      | <i>T. koningiopsis</i>  | IX. 2011    | půda antropogenní     | substrát výsyvky                                    | 840     | poblíž Potůčků, Krušné hory    | Z Čechy     |
| AK125/07      | <i>T. koningii</i>      | <i>T. koningii</i>      | IV. 2007    | půda antropogenní     | substrát odkaliště                                  | 215     | Chvaletice                     | V Čechy     |
| AK237/93      | <i>T. koningii</i>      | <i>T. koningii</i>      | XI. 1993    | půda antropogenní     | substrát odkaliště                                  | 215     | Chvaletice                     | V Čechy     |
| AK36/07       | <i>T. koningii</i>      | <i>T. koningii</i>      | I. 2007     | půda antropogenní     | substrát odkaliště                                  | 215     | Chvaletice                     | V Čechy     |
| AK75/07       | <i>T. koningii</i>      | <i>T. atroviride</i>    | II. 2007    | půda                  | půda s travinným porostem                           | 280     | Hradčany u Mimoně              | S Čechy     |
| CCF3834       | <i>T. koningii</i>      | <i>T. koningii</i>      | VIII.2004   | půda                  | slabě zasolená půda (pH 6,4), bylinný porost        | 440     | NPR Soos                       | Z Čechy     |
| T2            | <i>T. koningii</i>      | <i>T. koningii</i>      | IX. 2009    | opad                  | opad smíšeného lesa                                 | 460     | Plavy                          | S Čechy     |
| T7            | <i>T. koningii</i>      | <i>T. koningii</i>      | IX. 2009    | opad                  | opad smrkového lesa                                 | 290     | Nebužely                       | stř. Čechy  |
| T8            | <i>T. koningii</i>      | <i>T. koningii</i>      | IX. 2009    | opad                  | opad smrkového lesa                                 | 290     | Nebužely                       | stř. Čechy  |
| AK109/94      | <i>T. koningiopsis</i>  | <i>T. harzianum</i>     | VI. 1994    | půda antropogenní     | substrát odkaliště                                  | 215     | Chvaletice                     | V Čechy     |
| AK109/95      | <i>T. koningiopsis</i>  | <i>T. koningii</i>      | IX. 1995    | ostatní               | trus                                                | 215     | Chvaletice                     | V Čechy     |
| AK135/02      | <i>T. koningiopsis</i>  | <i>T. koningii</i>      | X. 2002     | půda alpinská         | půda horského trávníku                              | 1150    | Obří důl, Krkonoše             | SV Čechy    |
| AK16/97       | <i>T. koningiopsis</i>  | <i>T. koningii</i>      | II. 1997    | ovzduší               | venkovní ovzduší                                    | 210     | Praha                          | stř. Čechy  |
| AK178/99      | <i>T. koningiopsis</i>  | <i>T. koningiopsis</i>  | VIII. 1999  | půda rašeliništní     | substrát rašeliniště v borosmrkovém lese            | 730     | Rašeliniště Houska, Šumava     | JZ Čechy    |
| AK183/06      | <i>T. koningiopsis</i>  | <i>T. koningiopsis</i>  | VIII. 2006  | půda zemědělská       | půda pastviny                                       | 300     | Netluky, Praha - Uhřetěves     | stř. Čechy  |
| AK197/06      | <i>T. koningiopsis</i>  | <i>T. koningii</i>      | IV. 2006    | ostatní               | půdní kůsta na ploše s lišejníky                    | 300     | Střezov, Březno                | SZ Čechy    |

Tab. 15: pokračování

| Číslo izolátu | Identifikace genotypová   | Identifikace fenotypová    | Rok izolace | Kategorie substrátu   | Substrát                                     | m n. m. | Lokalita                                 | Region     |
|---------------|---------------------------|----------------------------|-------------|-----------------------|----------------------------------------------|---------|------------------------------------------|------------|
| AK199/06      | <i>T. koningiopsis</i>    | <i>T. koningii</i>         | IV. 2006    | půda                  | půda s travinným porostem                    | 280     | Hradčany u Mimoně                        | S Čechy    |
| AK232/94      | <i>T. koningiopsis</i>    | <i>T. koningii</i>         | XII. 1994   | půda antropogenní     | substrát odkaliště                           | 215     | Chvaletice                               | V Čechy    |
| AK283/05      | <i>T. koningiopsis</i>    | <i>T. atroviride</i>       | X. 2005     | půda antropogenní     | substrát odkaliště                           | 215     | Chvaletice                               | V Čechy    |
| AK38/06       | <i>T. koningiopsis</i>    | <i>T. koningii</i>         | I. 2006     | půda                  | půda s travinným porostem                    | 280     | Hradčany u Mimoně                        | S Čechy    |
| AK39/07       | <i>T. koningiopsis</i>    | <i>T. koningii</i>         | I. 2007     | půda antropogenní     | substrát odkaliště                           | 215     | Chvaletice                               | V Čechy    |
| AK45/05       | <i>T. koningiopsis</i>    | <i>T. koningii</i>         | VI. 2005    | ostatní               | půdní krusta na ploše s lišejníky            | 300     | Střezov, Březno                          | SZ Čechy   |
| AK68/07       | <i>T. koningiopsis</i>    | <i>T. koningii</i>         | I. 2007     | půda                  | půda s travinným porostem                    | 280     | Hradčany u Mimoně                        | S Čechy    |
| AK70/07       | <i>T. koningiopsis</i>    | <i>T. aureoviride</i>      | I. 2007     | půda                  | půda s travinným porostem                    | 280     | Hradčany u Mimoně                        | S Čechy    |
| AK73/07       | <i>T. koningiopsis</i>    | <i>T. koningii</i>         | II. 2007    | půda                  | půda s travinným porostem                    | 280     | Hradčany u Mimoně                        | S Čechy    |
| AK76/07       | <i>T. koningiopsis</i>    | <i>T. koningii</i>         | II. 2007    | půda                  | půda s travinným porostem                    | 280     | Hradčany u Mimoně                        | S Čechy    |
| AK90/00       | <i>T. koningiopsis</i>    | <i>T. aureoviride</i>      | VII. 2000   | půda alpská           | půda horského trávníku                       | 1350    | Velká Kotelní jáma, Krkonoše             | SV Čechy   |
| AK94/06       | <i>T. koningiopsis</i>    | <i>T. koningii</i>         | III. 2006   | půda antropogenní     | substrát odkaliště                           | 215     | Chvaletice                               | V Čechy    |
| CCF3912       | <i>T. koningiopsis</i>    | <i>T. koningiopsis</i>     | III.2007    | opad                  | listový opad břízy v opadových sáčcích       | 280     | Hradčany u Mimoně                        | S Čechy    |
| T1            | <i>T. koningiopsis</i>    | <i>T. koningii</i>         | IX. 2009    | opad                  | opad smíšeného lesa                          | 460     | Plavy                                    | S Čechy    |
| CCF3813       | <i>T. koningiopsis</i>    | <i>T. koningiopsis</i>     | V.2005      | půda                  | slabě zasolená půda (pH 6,5), bylinný porost | 440     | NPR Soos                                 | Z Čechy    |
| AK158/01      | <i>T. longibrachiatum</i> | <i>T. longibrachiatum</i>  | VII. 2001   | potraviny/krmiva      | zaplísňené obilky pšenice                    | 320     | Buštěhrad                                | stř. Čechy |
| AK186/06      | <i>T. longibrachiatum</i> | <i>T. longibrachiatum</i>  | VIII. 2006  | půda zemědělská       | půda pastviny                                | 300     | Netluky, Praha - Uhřetěves               | stř. Čechy |
| AK37/00       | <i>T. longibrachiatum</i> | <i>T. longibrachiatum</i>  | V. 2000     | ostatní               | kosmetický přípravek, balzám na vlasy        | 210     | Praha                                    | stř. Čechy |
| T23           | <i>T. longibrachiatum</i> | <i>T. pseudokoningii</i>   | III. 2012   | opad                  | opad dubohabrového lesa                      | 400     | Ždánice                                  | V Morava   |
| AK120/96      | <i>T. longipile</i>       | <i>T. virens</i>           | VII. 1996   | půda smíš./list. lesa | půda bukového lesa                           | 1040    | Čertovo jezero, Šumava                   | JZ Čechy   |
| AK192/01      | <i>T. longipile</i>       | <i>T. atroviride</i>       | IX. 2001    | dřevo/povrch brouků   | dřevěné prkno v kryptě kostela               | 450     | Kynšperk n/Ohří                          | Z Čechy    |
| AK6/06        | <i>T. longipile</i>       | <i>T. atroviride</i>       | XII. 2005   | ostatní               | substrát pískovcovéh osypu                   | 350     | Borový důl, Mezní louka, České Švýcarsko | S Čechy    |
| AK93/06       | <i>T. longipile</i>       | <i>T. atroviride</i>       | III. 2006   | půda antropogenní     | substrát odkaliště                           | 215     | Chvaletice                               | V Čechy    |
| CCF3126       | <i>T. longipile</i>       | <i>T. atroviride</i>       | VI.1999     | ostatní               | povrchová voda (rybník)                      | 310     | Stráž pod Ralskem                        | S Čechy    |
| AK185/02      | <i>T. polysporum</i>      | <i>T. polysporum</i>       | XI. 2002    | půda smíš./list. lesa | půda bukosmrkového lesa                      | 1100    | Plešné jezero, Šumava                    | JZ Čechy   |
| AK188/02      | <i>T. polysporum</i>      | <i>T. polysporum</i>       | XI. 2002    | půda alpská           | půda květnaté louky                          | 1160    | Velká Kotelní jáma, Krkonoše             | SV Čechy   |
| AK221/01      | <i>T. polysporum</i>      | <i>T. polysporum</i>       | XI. 2001    | půda smíš./list. lesa | půda bukosmrkového lesa                      | 780     | Údolí Vydry, Šumava                      | JZ Čechy   |
| AK340         | <i>T. polysporum</i>      | <i>T. polysporum</i>       | III. 1989   | půda smíš./list. lesa | půda smíšeného porostu říčního břehu         | 190     | Postoloprty                              | SZ Čechy   |
| CCF1555       | <i>T. polysporum</i>      | <i>T. polysporum</i>       | 1976        | půda                  | úhor                                         | 260     | Srbsko                                   | stř. Čechy |
| CCF2823       | <i>T. polysporum</i>      | <i>T. polysporum</i>       | X.1993      | půda smíš./list. lesa | půda bukového lesa                           | 950     | Medvědice, Stožec, Šumava                | JZ Čechy   |
| CCF3404       | <i>T. polysporum</i>      | <i>T. polysporum</i>       | X.2003      | půda smíš./list. lesa | půda smrkového lesa                          | 1200    | Pramen Vltavy, Šumava                    | JZ Čechy   |
| T16           | <i>T. polysporum</i>      | <i>Dle klíce neurceno!</i> | III. 2012   | půda zemědělská       | půda pole s obilím                           | 250     | Boleradice                               | J Morava   |
| T44           | <i>T. polysporum</i>      | <i>T. polysporum</i>       | III. 2012   | půda zemědělská       | půda pole s kukuřicí                         | 185     | MLčechvosty                              | stř. Čechy |
| T9            | <i>T. pseudokoningii</i>  | <i>T. pseudokoningii</i>   | IX.2009     | opad                  | opad smrkového lesa                          | 290     | Nebužely                                 | stř. Čechy |
| AK185/06      | <i>T. reesei</i>          | <i>T. citrinoviride</i>    | VIII. 2006  | půda zemědělská       | půda pastviny                                | 300     | Netluky, Praha - Uhřetěves               | stř. Čechy |
| CCF1855       | <i>T. reesei</i>          | <i>T. reesei</i>           |             | ostatní               | mutageneze kmene QM9414                      |         |                                          |            |
| CCF1887       | <i>T. reesei</i>          | <i>T. reesei</i>           |             | ostatní               | mutageneze kmene 139                         |         |                                          |            |
| CCF3150       | <i>T. rossicum</i>        | <i>T. polysporum</i>       | IX.2000     | půda smíš./list. lesa | půda bukosmrkového lesa                      | 1180    | Obří důl, Krkonoše                       | SV Čechy   |
| CCF2983       | <i>T. saturnisporum</i>   | <i>T. saturnisporum</i>    | VI.1996     | půda smíš./list. lesa | půda bukového lesa                           | 1250    | Ždaniidla, Šumava                        | JZ Čechy   |
| T17           | <i>T. saturnisporum</i>   | <i>T. saturnisporum</i>    | III. 2012   | opad                  | opad dubového lesa                           | 300     | Konice                                   | J Morava   |
| T45           | <i>T. saturnisporum</i>   | <i>Dle klíce neurceno!</i> | III. 2012   | opad                  | opad bukového lesa                           | 500     | Nuzerov                                  | J Čechy    |
| AK226/01      | <i>T. tomentosum</i>      | <i>T. minutisporum</i>     | XI. 2001    | půda rašeliníštní     | substrát rašeliníště pod kosodřevinou        | 1365    | Navorská louka, Krkonoše                 | SV Čechy   |

Tab. 15: pokračování

| Číslo izolátu | Identifikace genotypová | Identifikace fenotypová  | Rok izolace | Kategorie substrátu    | Substrát                          | m n. m. | Lokalita                                   | Region     |
|---------------|-------------------------|--------------------------|-------------|------------------------|-----------------------------------|---------|--------------------------------------------|------------|
| AK52/94       | <i>T. tomentosum</i>    | <i>T. pseudokoningii</i> | IV. 1994    | dřevo/povrch brouků    | <i>Pinus silvestris</i> , kmen    | 450     | Hudlice u Berouna                          | stř. Čechy |
| AK80/99       | <i>T. tomentosum</i>    | <i>T. harzianum</i>      | VI. 1999    | půda zemědělská        | půda louky                        | 400     | Dobronice u Bechyně                        | J Čechy    |
| AK112/11      | <i>T. virens</i>        | <i>T. virens</i>         | IX. 2011    | půda antropogenní      | substrát výsypky                  | 840     | poblíž Potůčků, Krušné hory                | Z Čechy    |
| AK122/06      | <i>T. virens</i>        | <i>T. virens</i>         | VI. 2006    | půda antropogenní      | substrát odkaliště                | 410     | Ostrov, Karlovy Vary                       | Z Čechy    |
| AK124/07      | <i>T. virens</i>        | <i>T. virens</i>         | IV. 2007    | půda antropogenní      | substrát odkaliště                | 215     | Chvaletice                                 | V Čechy    |
| AK134/06      | <i>T. virens</i>        | <i>T. virens</i>         | VI. 2006    | půda antropogenní      | substrát odkaliště                | 500     | Jívka u Radvanic                           | SV Čechy   |
| AK149/05      | <i>T. virens</i>        | <i>T. virens</i>         | VIII. 2005  | půda antropogenní      | substrát odkaliště                | 500     | Jívka u Radvanic                           | SV Čechy   |
| AK188/99      | <i>T. virens</i>        | <i>T. virens</i>         | IX. 1999    | půda alpská            | půda horského trávníku            | 1350    | Čertova zahrádka, Krkonoše                 | SV Čechy   |
| AK198/06      | <i>T. virens</i>        | <i>T. virens</i>         | IV. 2006    | půda antropogenní      | substrát odkaliště                | 215     | Chvaletice                                 | V Čechy    |
| AK220/06      | <i>T. virens</i>        | <i>T. virens</i>         | IX. 2006    | dřevo/povrch brouků    | <i>Ulmus laevis</i> , endofyt     | 190     | Libický luh, Velký Osek                    | stř. Čechy |
| AK46/05       | <i>T. virens</i>        | <i>T. virens</i>         | VI. 2005    | ostatní                | půdní krusta na ploše s lišejníky | 300     | Střezov, Březno                            | SZ Čechy   |
| CCF2848       | <i>T. virens</i>        | <i>T. virens</i>         | VI.1993     | půda antropogenní      | substrát odkaliště                | 215     | Chvaletice                                 | V Čechy    |
| CCF2889       | <i>T. virens</i>        | <i>T. virens</i>         | 1975        | dřevo/povrch brouků    | <i>Picea abies</i>                |         | Albrechtice                                | V Čechy    |
| T28           | <i>T. virens</i>        | <i>T. virens</i>         | III. 2012   | opad                   | opad dubového lesa                | 300     | Konice                                     | J Morava   |
| T42           | <i>T. virens</i>        | <i>T. virens</i>         | III. 2012   | opad                   | opad dubového lesa                | 315     | Kurdějov                                   | J Morava   |
| AK101/00      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>         | VII. 2000   | půda alpská            | půda horského trávníku            | 1200    | Lavinová rokle, Obří důl, Krkonoše         | SV Čechy   |
| AK103/00      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>         | VII. 2000   | půda alpská            | půda horského trávníku            | 950     | Sněhová jáma, Obří důl, Krkonoše           | SV Čechy   |
| AK103/05      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>         | VI. 2005    | půda antropogenní      | substrát odkaliště                | 800     | Měděnec, Krušné hory                       | Z. Čechy   |
| AK104/00      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>         | VII. 2000   | půda alpská            | půda horského trávníku            | 1500    | Studniční hora, Krkonoše                   | SV Čechy   |
| AK110/02      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>         | X. 2002     | půda rašeliništní      | substrát rašeliniště              | 1430    | Úpské rašeliniště, Krkonoše                | SV Čechy   |
| AK113/00      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>         | IX. 2000    | půda jehličnatého lesa | půda smrkového lesa               | 650     | Albeř, Nová Bystřice                       | J Čechy    |
| AK114/00      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>         | IX. 2000    | půda smíš./list. lesa  | půda smíšeného lesa               | 650     | Albeř, Nová Bystřice                       | J Čechy    |
| AK117/02      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>         | X. 2002     | půda rašeliništní      | substrát rašeliniště              | 1425    | Úpské rašeliniště, Krkonoše                | SV Čechy   |
| AK124/94      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>         | VII. 1994   | dřevo/povrch brouků    | <i>Quercus robur</i> , větev      | 210     | PR Velký Kuntínov PR                       | J Morava   |
| AK126/96      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>         | VII. 1996   | ovzduší                | venkovní ovzduší                  | 210     | Praha                                      | stř. Čechy |
| AK130/00      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>         | X. 2000     | půda jehličnatého lesa | půda smrkového lesa               | 1320    | Trojmezí, Šumava                           | JZ Čechy   |
| AK131/00      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>         | X. 2000     | půda jehličnatého lesa | půda smrkového lesa               | 1355    | Trojmezná, Šumava                          | JZ Čechy   |
| AK132/00      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>         | X. 2000     | půda jehličnatého lesa | půda smrkového lesa               | 1340    | Trojmezná, Šumava                          | JZ Čechy   |
| AK134/02      | <i>T. viride</i>        | <i>T. aureoviride</i>    | X. 2002     | půda jehličnatého lesa | půda kosodřeviny                  | 1170    | Obří důl, Krkonoše                         | SV Čechy   |
| AK137/02      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>         | X. 2002     | půda rašeliništní      | substrát rašeliniště              | 1360    | Malá Kotelní jáma, Krkonoše                | SV Čechy   |
| AK162/01      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>         | VII. 2001   | půda rašeliništní      | substrát rašeliniště              | 1425    | Úpské rašeliniště, Krkonoše                | SV Čechy   |
| AK167/94      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>         | IX. 1994    | půda rašeliništní      | substrát rašeliniště              | 1040    | Mlynářská slat', Šumava                    | JZ Čechy   |
| AK170/00      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>         | XII. 2000   | půda rašeliništní      | substrát rašeliniště              | 1345    | Rakouská louka (Plechý - Trojmezí), Šumava | JZ Čechy   |
| AK171/00      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>         | XII. 2000   | půda jehličnatého lesa | půda smrkového lesa               | 1370    | Plechý, Šumava                             | JZ Čechy   |
| AK172/00      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>         | XII. 2000   | půda jehličnatého lesa | půda smrkového lesa               | 1345    | Plechý, Šumava                             | JZ Čechy   |
| AK173/00      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>         | XII. 2000   | půda jehličnatého lesa | půda smrkového lesa               | 880     | Údolí Vydry, Šumava                        | JZ Čechy   |
| AK176/00      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>         | XII. 2000   | půda jehličnatého lesa | půda borového lesa                | 800     | Údolí Vydry, Šumava                        | JZ Čechy   |
| AK177/00      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>         | XII. 2000   | půda jehličnatého lesa | půda borového lesa                | 790     | Údolí Vydry, Šumava                        | JZ Čechy   |
| AK177/01      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>         | VII. 2001   | půda smíš./list. lesa  | půda olšiny                       | 730     | Údolí Vydry, Šumava                        | JZ Čechy   |
| AK184/02      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>         | XI. 2002    | půda jehličnatého lesa | půda blatkového lesa              | 730     | Rašeliniště Houska, Šumava                 | JZ Čechy   |
| AK185/01      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>         | VII. 2001   | půda smíš./list. lesa  | půda buk-smrkového lesa           | 750     | Údolí Vydry, Šumava                        | JZ Čechy   |
| AK186/02      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>         | XI. 2002    | půda jehličnatého lesa | půda smrkového lesa               | 1350    | Plechý, Šumava                             | JZ Čechy   |

Tab. 15: pokračování

| Číslo izolátu | Identifikace genotypová | Identifikace fenotypová | Rok izolace | Kategorie substrátu    | Substrát                                            | m n. m. | Lokalita                                 | Region     |
|---------------|-------------------------|-------------------------|-------------|------------------------|-----------------------------------------------------|---------|------------------------------------------|------------|
| AK187/01      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | VII. 2001   | půda rašeliništní      | substrát rašeliniště                                | 1425    | Úpské rašeliniště, Krkonoše              | SV Čechy   |
| AK187/02      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | XI. 2002    | půda alpinská          | půda horského trávníku                              | 1275    | Velká Kotelní jáma, Krkonoše             | SV Čechy   |
| AK195/06      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | IV. 2006    | půda zemědělská        | půda pastviny                                       | 300     | Netluky, Praha - Uhřetěves               | stř. Čechy |
| AK202/01      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | X. 2001     | půda rašeliništní      | substrát rašeliniště pod kosodřevinou               | 1440    | Úpské rašeliniště, Krkonoše              | SV Čechy   |
| AK204/01      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | X. 2001     | půda rašeliništní      | substrát rašeliniště                                | 1425    | Úpské rašeliniště, Krkonoše              | SV Čechy   |
| AK207/96      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | XI. 1996    | ovzduší                | venkovní ovzduší                                    | 210     | Praha                                    | stř. Čechy |
| AK234/01      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | XII. 2001   | půda jehličnatého lesa | půda pod kosodřevinou                               | 1360    | Mumlavská louka, Krkonoše                | SV Čechy   |
| AK291/05      | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | X. 2005     | ostatní                | substrát pískovcovéh osypu                          | 350     | Borový důl, Mezní louka, České Švýcarsko | S Čechy    |
| AK34/10       | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | III. 2010   | ostatní                | stěr ze stěny podzemní štoly                        | 300     | Solenice                                 | stř. Čechy |
| AK35/10       | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | III. 2010   | ostatní                | sediment podzemní štoly                             | 300     | Solenice                                 | stř. Čechy |
| AK36/06       | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | I. 2006     | ostatní                | půdní krusta, travinný porost                       | 280     | Hradčany u Mimoně                        | S Čechy    |
| AK37/06       | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | I. 2006     | půda                   | půda s travinným porostem                           | 280     | Hradčany u Mimoně                        | S Čechy    |
| AK390         | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | IX. 1989    | půda smíš./list. lesa  | půda bukosmrkového lesa                             | 725     | Velký Špičák, Českomoravská vrchovina    | JV Čechy   |
| AK40/06       | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | I. 2006     | půda                   | půda s travinným porostem                           | 280     | Hradčany u Mimoně                        | S Čechy    |
| AK43/02       | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | VI. 2002    | půda rašeliništní      | substrát rašeliniště pod kosodřevinou               | 1300    | Pančavská louka (Krkonoše)               | SV Čechy   |
| AK43/05       | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | VI. 2005    | půda antropogenní      | substrát odkaliště                                  | 810     | Měděnec                                  | SZ Čechy   |
| AK60/97       | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | VI. 1997    | dřevo/povrch brouků    | <i>Scolytus intricatus</i> , <i>Quercus petraea</i> | 500     | Kohoutov, Zbiroh, Křivoklátsko           | stř. Čechy |
| AK66/04       | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | V. 2004     | ostatní                | stěr ze stěny podzemní štoly                        | 650     | Bedřichov, Jizerské hory                 | S Čechy    |
| AK69/07       | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | I. 2007     | půda                   | půda s travinným porostem                           | 280     | Hradčany u Mimoně                        | S Čechy    |
| AK71/07       | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | II. 2007    | půda                   | půda s travinným porostem                           | 280     | Hradčany u Mimoně                        | S Čechy    |
| AK79/99       | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | VI. 1999    | půda smíš./list. lesa  | půda listnatého lesa                                | 400     | Dobronice u Bechyně                      | J Čechy    |
| AK81/91       | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | VII. 1991   | půda zemědělská        | půda louky                                          | 400     | Louňovice                                | stř. Čechy |
| AK86/02       | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | VII. 2002   | půda smíš./list. lesa  | půda bukosmrkového lesa                             | 1110    | Plešné jezero, Šumava                    | JZ Čechy   |
| AK87/02       | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | VII. 2002   | půda jehličnatého lesa | půda smrkového lesa                                 | 750     | rašeliniště Houska, Šumava               | JZ Čechy   |
| AK89/00       | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | VII. 2000   | půda alpinská          | půda horského trávníku                              | 1350    | Velká Kotelní jáma, Krkonoše             | SV Čechy   |
| AK92/00       | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | VII. 2000   | půda alpinská          | půda horské louky                                   | 1250    | Velká Kotelní jáma, Krkonoše             | SV Čechy   |
| AK93/00       | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | VII. 2000   | půda antropogenní      | substrát staré výsypky                              | 1100    | Rudník, Obří důl, Krkonoše               | SV Čechy   |
| AK93/11       | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | VI. 2011    | ostatní                | jablečný nápoj                                      | 220     | Praha                                    | stř. Čechy |
| AK97/00       | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | VII. 2000   | půda alpinská          | půda horského trávníku                              | 1350    | Úpská jáma, Obří důl, Krkonoše           | SV Čechy   |
| AK98/00       | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | VII. 2000   | půda alpinská          | půda horského trávníku                              | 1330    | Obří důl, Úpský vodopád (Krkonoše)       | SV Čechy   |
| CCF1403       | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | 1972        | půda                   | půda Botanické zahrady UK                           | 210     | Praha                                    | stř. Čechy |
| CCF1611 *     | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | 1977        | ostatní                | neznámý původ                                       |         |                                          |            |
| CCF3231       | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | VII.2001    | půda jehličnatého lesa | půda smrkového lesa                                 | 850     | údolí Vydry, Šumava                      | JZ Čechy   |
| T20           | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | III. 2012   | opad                   | opad dubohabrového lesa                             | 305     | Mikulov                                  | J Morava   |
| T22           | <i>T. viride</i>        | <i>T. atroviride</i>    | III. 2012   | půda zemědělská        | půda pole s řepkou olejkou                          | 155     | Dušníky                                  | stř. Čechy |
| T26           | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | III. 2012   | opad                   | opad dubohabrového lesa                             | 410     | Kloboučky                                | V Morava   |
| T27           | <i>T. viride</i>        | <i>T. viridescens</i>   | III. 2012   | opad                   | opad dubohabrového lesa                             | 355     | Nevojice                                 | V Morava   |
| T3            | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | IX. 2009    | opad                   | opad lužního lesa                                   | 160     | Lužec nad Vltavou                        | stř. Čechy |
| T33           | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | III. 2012   | opad                   | opad dubohabrového lesa                             | 410     | Kloboučky                                | V Morava   |
| T4            | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | IX. 2009    | opad                   | opad lužního lesa                                   | 160     | Lužec nad Vltavou                        | stř. Čechy |
| T6            | <i>T. viride</i>        | <i>T. viride</i>        | IX. 2009    | opad                   | opad smrkového lesa                                 | 290     | Nebužely                                 | stř. Čechy |
| AK169/00      | <i>T. viridescens</i>   | <i>T. aureoviride</i>   | XII. 2000   | půda jehličnatého lesa | půda smrkového lesa                                 | 1370    | Plechý - Trojmezí, Šumava                | JZ Čechy   |

Tab. 15: pokračování

| Číslo izolátu | Identifikace genotypová | Identifikace fenotypová | Rok izolace | Kategorie substrátu    | Substrát                               | m n. m. | Lokalita                   | Region     |
|---------------|-------------------------|-------------------------|-------------|------------------------|----------------------------------------|---------|----------------------------|------------|
| AK174/00      | <i>T. viridescens</i>   | <i>T. viride</i>        | XII. 2000   | půda jehličnatého lesa | půda smrkového lesa                    | 860     | Údolí Vydry, Šumava        | JZ Čechy   |
| AK186/01      | <i>T. viridescens</i>   | <i>T. viride</i>        | VII. 2001   | půda smíř./list. lesa  | půda bukosmrkového lesa                | 780     | Údolí Vydry, Šumava        | JZ Čechy   |
| AK239/93      | <i>T. viridescens</i>   | <i>T. atroviride</i>    | XI. 1993    | půda smíř./list. lesa  | půda bukového lesa                     | 950     | Medvědice, Stožec, Šumava  | JZ Čechy   |
| AK253/93      | <i>T. viridescens</i>   | <i>T. viridescens</i>   | X. 1993     | půda smíř./list. lesa  | půda bukového lesa                     | 950     | Medvědice, Stožec, Šumava  | JZ Čechy   |
| AK257/93      | <i>T. viridescens</i>   | <i>T. atroviride</i>    | XI. 1993    | půda smíř./list. lesa  | půda bukového lesa                     | 950     | Medvědice, Stožec, Šumava  | JZ Čechy   |
| AK70/03       | <i>T. viridescens</i>   | <i>T. viride</i>        | VIII. 2003  | dřevo/povrch brouků    | <i>Carpinus betulus</i> , ležící větev | 300     | Všenory                    | stř. Čechy |
| AK94/00       | <i>T. viridescens</i>   | <i>T. viride</i>        | VII. 2000   | půda smíř./list. lesa  | půda bukosmrkového lesa                | 1180    | Rudník, Obří důl, Krkonoše | SV Čechy   |
| T10           | <i>T. viridescens</i>   | <i>T. viride</i>        | IX. 2009    | opad                   | opad bukového lesa                     | 270     | Kokořínský důl             | stř. Čechy |
| T31           | <i>T. viridescens</i>   | <i>T. viride</i>        | III. 2012   | půda                   | půda vřesoviště                        | 320     | Znojmo                     | J Morava   |
| T36           | <i>T. viridescens</i>   | <i>T. viride</i>        | III. 2012   | opad                   | opad lužního lesa                      | 152     | Obříství                   | stř. Čechy |
| T40           | <i>T. viridescens</i>   | <i>T. viridescens</i>   | III. 2012   | opad                   | opad bukového lesa                     | 750     | Milešice                   | J Čechy    |
| T43           | <i>T. viridescens</i>   | <i>T. viride</i>        | III. 2012   | půda                   | půda vřesoviště                        | 320     | Znojmo                     | J Morava   |
| T5            | <i>T. viridescens</i>   | <i>T. viride</i>        | IX. 2009    | opad                   | opad lužního lesa                      | 160     | Lužec nad Vltavou          | stř. Čechy |
| AK115/00      | <i>Trichoderma</i> sp.  | <i>T. aureoviride</i>   | IX. 2000    | půda smíř./list. lesa  | půda smíšeného lesa                    | 650     | Albeř, Nová Bystřice       | J Čechy    |