

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra rostlinné výroby a agroekologie, sekce rostlinolékařství

Studijní program: Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Všeobecné zemědělství

Specializace: Rostlinolékařství

**Stanovení suprese vybraných původců onemocnění rostlin pomocí
mykoparazitických hub**

(Diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce:

Prof. Ing. Zdeněk Landa, Csc.

Autor:

Jindřich Šmíd

České Budějovice

Duben 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 11/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

.....

datum

.....

Jindřich Šmíd

Poděkování:

Děkuji vedoucímu diplomové práce Prof. Ing. Zdeňku Landovi, Csc. za odborné vedení a cenné rady, které mně poskytl v průběhu zpracování diplomové práce. Dále děkuji Ing. Andree Bohaté, PhD. za její obětavou a všestrannou pomoc v průběhu této diplomové práce. Také děkuji pracovnícím katedry rostlinné výroby a agroekologie, sekce rostlinolékařství, Marii Nýdlové a Olze Divišové za technickou a praktickou výpomoc při zakládání pokusů v diplomové práci.

Abstrakt:

Diplomová práce je zaměřena na využití mykoparazitických hub *Trichoderma spp.*, *Clonostachys rosea f. catenulata* a *Coniothyrium minitans* v biologické ochraně rostlin proti významným fytopatogenním houbám *Sclerotinia sclerotiorum* a *Rhizoctonia solani*.

V pokusech byly testovány komerčně dostupné biopreparáty v Evropě a v USA, divoké kmeny hub rodu *Trichoderma* odizolované v rámci monitoringu mykoparazitických hub z ekologického a konvenčního systému hospodaření a dále kmeny houby *Coniothyrium minitans*. Hodnotily se jejich biologické a produkční vlastnosti. Z biologických vlastností se jedná o účinnost na fytopatogenní houby *Sclerotinia sclerotiorum* a *Rhizoctonia solani*. Po jednotlivých testech byly zaznamenány významné rozdíly mezi jednotlivými druhy, resp. kmeny. Některé kmeny vykazovaly větší mykoparazitickou schopnost a u patogena *S. sclerotiorum* výrazně ovlivnily nejen tvorbu, ale i velikost sklerocií.

Mykoparazitický efekt byl prokázán testem ověření parazitace vytvořených sklerocií *S. sclerotiorum*, resp. mycelia *R. solani*. Produkce spor byla hodnocena na umělých živných půdách nebo na přirozených substrátech.

klíčová slova: biologická ochrana, komerční biopreparáty, mykoparazitické houby, *Trichoderma spp.*, *Clonostachys rosea f. catenulata*, *Coniothyrium minitans*, fytopatogenní houby, *Sclerorinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*.

Abstract:

This M.Sc. thesis is aimed to use of mycoparasitic fungi *Trichoderma spp.*, *Clonostachys rosea f. catenulata* a *Coniothyrium minitans* in biological control against phytopathogenic fungi *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani*.

In experiments were evaluated strains from commercial biopesticides, native strains of *Trichoderma* isolated during monitoring of mycoparasitic fungi from ecological and traditional agriculture. All the strains were tested for biological and production properties. Efficacy of strains was evaluated against *S. sclerotiorum* and *R. solani*. Among the strains were found out different mycoparasitic abilities. Production and size of sclerotia were influenced by some strains of *Trichoderma* and *C. minitans*. Mycoparasitic effect was proved by test of verification of parasite sclerotia *S. sclerotiorum* or mycelium of *R. solani*. Production of spore of mycoparasitic fungi was evaluated from artificial medium PDA and solid substrates.

Key words: biological control, mycoparasitic fungi, commercial biopesticides, *Trichoderma spp.*, *Clonostachys rosea f. catenulata*, *Coniothyrium minitans*, phytopathogenic fungi, *Sclerorinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*

Obsah:

1. Úvod	1
2. Literární přehled	2
2.1. Biologická ochrana	2
2.2. Biologické vztahy mezi houbami	4
2.3. Navození hostitelské rezistence	8
2.4. Mykoparazitické houby	8
2.5. Přehled vybraných druhů mykoparazitických hub	9
2.6. Přehled vybraných půdních původců onemocnění rostlin	16
2.7. Biologická ochrana proti fytopatogenním houbám	18
2.8. Agrotechnická ochrana proti fytopatogenní houbě <i>S. sclerotiorum</i>	19
3. Materiál a metodika	21
4. Experimentální část a výsledky	28
5. Diskuze a závěry	59
6. Použité zdroje	63
7. Přílohy	70

1. Úvod

V minulém století vedla snaha člověka o dosažení maximální zemědělské produkce k velkoplošnému a častému používání pesticidů. Postupně se však začalo vyskytovat čím dál více problémů spojeným s jejich nadměrným a dlouhodobým používáním. Spolu s užíváním pesticidů se začaly pomalu objevovat problémy spojené s jejich častým používáním (vznik rezistentních populací škůdců, plevelných rostlin a houbových chorob, rezidua pesticidů v životním prostředí, snížení biodiverzity v agroekosystémech,...). Proto je nutné přistoupit k nějakým změnám v ochraně rostlin. Biologická ochrana se zatím využívá spíše ve sklenících, kdežto v polních podmínkách nenašla zatím příliš velké uplatnění. Jedním z organismů, které by mohly nalézt uplatnění v polních podmínkách, jsou mykoparazitické houby. Zejména se jedná o houby rodu *Trichoderma spp.*, *Pythium spp.*, *Coniothyrium spp.* a *Clonostachys spp.*

SMĚRNICE EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY 2009/128/ES ze dne 21. října 2009, kterou se stanovil rámec pro činnost Společenství za účelem dosažení udržitelného používání pesticidů. Na základě nařízení (ES) č. 1107/2009 a této směrnice je uplatňování zásad integrované ochrany rostlin povinné. Členské státy by ve svých národních akčních plánech měly popsat způsob, jak zajišťují uplatňování zásad integrované ochrany rostlin. Škodlivé organismy je třeba sledovat pomocí vhodných postupů a nástrojů, pokud jsou dostupné. Tyto vhodné nástroje by měly pokud možno zahrnovat pozorování na místě a vědecky podložené systémy varování, předpovědi a včasné diagnózy, pokud je to možné, jakož i využívání poradenství odborně kvalifikovaných poradců. Na základě výsledků sledování se musí profesionální uživatel rozhodnout, zda a kdy použije opatření na ochranu rostlin. Základním předpokladem rozhodování jsou pevně stanovené a vědecky podložené prahové hodnoty. Pokud jde o škodlivé organismy, je třeba před ošetřením vzít pokud možno v úvahu prahové hodnoty stanovené pro danou oblast, konkrétní území, plodiny a zvláštní klimatické podmínky. Před chemickými metodami **je nutné dát přednost udržitelným** biologickým, fyzikálním a jiným nechemickým metodám, pokud uspokojivě zajistí ochranu před škodlivými organismy (Anonym 1).

Cílem práce je objektivně posoudit a ověřit možnost využití mykoparazitických hub v ochraně rostlin proti vybraným původcům onemocnění rostlin. Realizovat modelovou studii polyfaktoriální charakteristiky vybraných kmenů mykoparazitických hub rodu *Trichoderma* a *C. minitans* se zaměřením na hodnocení biologických, růstových a produkčních vlastností kmenů.

2. Literární přehled

2.1. Biologická ochrana

Biologickou ochranu je možno definovat velmi úzce jako „Záměrné využívání přirozených nepřátel s cílem regulovat populace škůdců, chorob a plevelných rostlin“ až velmi široce, kdy spolu s přirozenými nepřáteli a antagonisty jsou do kategorie biologických metod zahrnovány i metody agrotechnické, bioracionální a genetické. Současné definice více inklinují k velmi úzkému pojetí, vymezují biologickou ochranu nejen jako záměrné využívání, ale i cílenou podporu přirozených nepřátel, ale zřetelně i jako záměrné využívání a podpora systémů v interakcích „živý proti živému“. Biologická ochrana rostlin proti původcům onemocnění rostlin může být definována jako redukce množství inokula nebo patogenní aktivity patogena pomocí jednoho nebo více mikroorganismů s mykoparazitickou nebo antagonistickou aktivitou (Landa 2002).

Biologickou ochranu v širším i užším smyslu slova považuje dnes většina odborníků za ekologicky, hygienicky i ekonomicky nejvhodnější metodu potlačování škůdců. Pracuje v přírodě vlastními prostředky, takže nezatěžuje životní prostředí a díky vysoce specifickému účinku zpravidla neohrožuje necílové organismy. Působí při tom dlouhodobě, nepotřebuje drahá zařízení, příliš mnoho vody či energie, ani náklady na kompenzaci lidského zdraví a životního prostředí. Biologická ochrana však také klade jisté nároky na své uživatele, zejména vyžaduje schopnost systematické práce a trpělivost. Výsledky se většinou dostaví o něco později než u ochrany chemické, jsou však výrazně trvalejší (Tichá 2001).

Biologická ochranu můžeme definovat také jako režii přesného řízení společné složky ekosystémů k ochraně rostlin proti patogenům. V tomto ohledu je mikrobiální rozmanitost klíčovým přírodním zdrojem (Kennedy, Smith 1995). Biologická ochrana chrání kvalitu životního prostředí snížením chemických vstupů a je charakteristická jako trvale udržitelné hospodaření. (Altieri 1994; Jeffries, Bareq 1995). Mezi další výhody biologické ochrany bezesporu patří i snižování reziduí v potravě, zachování přirozených nepřátel a zvýšení biodiverzity ekosystémů (Lacey *et al.* 2001). Zároveň je i nepravděpodobné, že by mohlo dojít k rezistenci k bioagens (Bale *et al.* 2007). Naopak mezi nevýhody biologické ochrany oproti ochraně chemické patří perzistence, specifita (buď příliš široké nebo příliš úzké spektrum hostitelů), rychlost účinku a cena (Lacey *et al.* 2001)

S cílem pochopit možnosti a vymezení biologické ochrany, a to zejména za účelem uskutečnění kompetentního programu biologické ochrany. Je nezbytné povědomí i o ekologických základech biologické ochrany. 3 vzájemně propojené koncepty, kterým musíme porozumět, jsou: (1) myšlenka diskrétní populace a společenstev, (2) rovnováha přírody a (3) přirozená kontrola čísel. Biologická ochrana je projevem sdružení různých, vzájemně závislých druhů v přírodě. Ale druhy existují jako skupiny jednotlivců. Ty se kříží, rozmnožují se a umírají. Rozmnožováním se sami udržují jako určitá skupina, která se na místní úrovni nazývá populace (Boughey 1961).

Pojmy "biologická ochrana" a používané synonymum "bioochrana" (v angličtině biological control and biocontrol) jsou dodnes používány v různých oblastech biologie, především v entomologii a patologii rostlin. V entomologii se stále používají k popisu využití živých predátorů a parazitoidů hmyzu, entomopatogenních hlístic, nebo mikrobiálních patogenů (entomopatogenní houby, bakterie a viry) k potlačení populací různých škůdců hmyzu. V rostlinné patologii se tento termín používá jako mikrobiální mykoparazit nebo antagonist k potlačení původců onemocnění rostlin, stejně jako použití patogenů pro ochranu rostlin proti společenstvu plevelů. Ve všech oblastech se však organismus, který potlačuje škůdce nebo patogeny, označuje pod pojmem "agens biologické ochrany" (V angličtině používaný termín BCA – biological control agents). (US Congress, 1995).

Metody biologické ochrany proti původcům onemocnění rostlin lze rozčlenit na metody přímé a nepřímé (Alabouvette, Lemanceau 1999). Vzhledem ke složitosti vazeb mezi organizmy v prostředí je toto členění značně teoretické a jednotlivé metody vykazují řadu modifikací a vzájemně se prolínají (Landa 2002). Přímé metody zahrnují introdukci specifických mikrobiálních antagonistů do půdy nebo jejich aplikaci na nadzemní části rostlin. Nepřímé strategie ochrany rostlin proti fytopatogenním mikroorganismům jsou založeny na aplikaci organické hmoty do půdy, díky níž se zvyšuje mikrobiální aktivita půdy a tím dochází k podpoře působení antagonistů nebo mykoparazitů. Další metoda je založena na stimulaci rostlinných obranných mechanismů proti jednotlivým patogenům předchozí inokulací rostlin avirulentními nebo hypovirulentními (slabě patogenní) kmeny fytopatogenních organizmů (Bohatá 2005).

2.2. Biologické vztahy mezi houbami

Nejdůležitější interakce odehrávající se v oblasti rhizosféry lze rozdělit do **tří hlavních skupin**: **(1) rostlina** - interakce způsobené rostlinami, které si mezi sebou konkurují (soutěží v boji o živiny) ; **(2) kořen - mikroorganismus** - interakce, která je dána činností rostlin, které stimulují růst mikroorganismů kolem kořenů (rhizosférový efekt) a mikrobiální aktivitou, která má vliv na vývoj rostlin, a to buď ve prospěch rostliny, nebo naopak navozením choroby, a **(3) mikroorganismy** – interakce mezi mikroorganismy samotnými, které zahrnují jak synergické, tak i antagonistické aktivity (Stoztky 1972; Lynch 1990).

Různé antagonistické mikroorganismy mají potenciální schopnost interference s patogenními mikroorganismy rostlin v průběhu jejich růstu nebo až během vývoje a poskytují tak celou řadu možností, jak je využít v biologické ochraně. Mezi mikrobiálními antagonistickými reakcemi mezi mikroorganismy v běžných podmínkách prostředí patří podle Alabouvette, Lemanceau (1999) tyto typy interakcí: antibioza, kompetice, mykoparazitismus.

Právě tyto interakce představují základní mechanismy, jež jsou využívány v biologické ochraně rostlin. Všechny výše uvedené interakce se nevyskytují vždy samostatně, ale vzájemně se kombinují.

Antibioza zahrnuje takové interakce mezi organismy, jež vyvolávají tvorbu nízkomolekulárních difúzních látek nebo antibiotik produkované mikroorganismem, které následně inhibují růst a vývoj organismu jiného. Tyto látky zahrnují proteiny a enzymy, které usmrtí nebo inhibují cílový organismus a poškozují jeden organismus metabolickou produkcí organismu druhého. Většina mikroorganismů produkuje a vylučuje jednu nebo více látek s antibiotickou aktivitou. V některých případech se tyto látky produkované mikroorganismy ukázaly být zvláště účinné při potlačení původců onemocnění rostlin (Thomashow *et al.* 2002). Mezi významné druhy s antagonistickým působením můžeme zařadit houbu *Trichoderma virens* (= *Gliocladium virens*) nebo *Trichoderma harzianum* (Baker, Cook 1974). Antagonistická houba vylučuje do zevního prostředí účinné látky, které působí na cílový fytopatogenní mikroorganismus a tím tlumí jeho růst a rozvoj v půdě. Antagonistické mikroorganismy všeobecně vytvářejí s citlivými mikroorganismy tzv. ochranné zóny, různě rozsáhlé při různě silném antagonistickém efektu. Velké ochranné zóny značí vysoký antagonistický efekt. Ve fytopatologii se setkáváme s

antagonismem zejména mezi bakteriemi a mikroskopickými houbami (Hýsek *et al.* 2008). Chceme-li být efektivní, musí být látky produkovány v dostatečném množství poblíž cílového patogena, abychom docílili efektu biologické ochrany (Thomashow *et al.* 2002). Howell *et al.* (1993) zjistili, že jednotlivé kmeny mykoparazitické houby *T. virens* produkují různá antibiotika. Podle tohoto zjištění rozdělili kmeny na do dvou skupin, skupina kmenů „P“ a kmenů „Q“. Kmeny skupiny „P“ produkují antibiotikum gliovirin, které je aktivní a usmrcuje fytopatogenní houbu *P. ultimum*. Tyto kmeny nejsou však schopny inhibovat a ovlivňovat vývoj kmenů fytopatogenní houby *R. solani* anastomózní skupiny AG-4 (Howell 1999). Naopak, kmeny skupiny „Q“ produkují antibiotikum gliotoxin, které potlačuje růst kmene *Rhizoctonia solani* AG-4, avšak neovlivňuje růst houby *Pythium ultimum* (Howell *et al.* 1993). Je známo, že některé kmeny hub nebo bakterií mohou produkovat více antibiotik, které mohou potlačit i více patogenů. Příkladem bakterie jde o *Bacillus cereus* kmen UW85, který produkuje zwittermycin a kanosamine (Milner *et al.* 1996).

Kompetice je stav, ve kterém je jeden organismus nadřazený druhému ve smyslu získávání a využívání nutričních zdrojů nebo ve smyslu omezení přístupu k těmto zdrojům (Chet *et al.* 1997). Z mikrobiálního hlediska jsou půdy a povrchy živých rostlin často na živiny omezená prostředí. Chceme-li úspěšně kolonizovat nadzemní části rostliny, musí mít mikroorganismus možnost účinně soutěžit o dostupné živiny. Na povrchu rostlin poskytuje hostitel živiny, mezi které patří výpotky, výluhy, nebo (zastaralé tkáně) biomasa mycelia. Kromě toho mohou mikroorganismy získat živiny z odpadních produktů z jiných organismů, jako od hmyzu (např. medovice mšic na povrchu listů) a z půdy. Kompetici je těžké dokázat přímo, nicméně nepřímé důkazy naznačují, že soutěž mezi patogenními a nepatogenními mikroorganismy, kdy si mezi sebou konkurují o živiny, je důležitá pro omezení výskytu a závažnosti chorob. Zároveň každý mikroorganismus má své požadavky na prostředí. Pokud se v daném prostředí vyskytuje více mikroorganismů se stejnými nebo podobnými nároky, může dojít k tzv. překrytí ekologických nik, a tím k uplatnění principu kompetičního vyloučení jednoho z mikroorganismů. Obecně platí, že v půdním prostředí je prostorová konkurence vysoká, neboť v půdním prostředí se vyskytuje velká škála různých druhů mikroorganismů. Velmi citlivé na tento jev jsou například půdní fytopatogenní houby rodu *Fusarium* a rodu *Pythium*. Naopak menší prostorová konkurence je zaznamenána mezi mikroorganismy vyskytujícími se na nadzemních částech rostlin (Tari, Anderson 1988).

Tabulka č.1: Přehled některých antibiotik produkovaných mikroorganismy.

Antibiotikum	Zdroj	Cílový patogen	Choroba/patogen	Reference
2,4-diacetyl phloroglucinol	<i>Pseudomonas fluorescens</i> F113	<i>Pythium spp.</i>	padání klíčnicích rostlin	Shanahan <i>et al.</i> (1992)
Agrocin 84	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	bakteriální boulovitost kořenů	Kerr (1980)
Bacillomycin D	<i>Bacillus subtilis</i> AU195	<i>Aspergillus flavus</i>	aflatoxin	Moyne <i>et al.</i> (2004)
Bacillomycin, fengycin	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Fusarium oxysporum</i>	ucpávání cévních svazků	Koumoutsi <i>et al.</i> (2004)
Xanthobaccin A	<i>Lysobacter sp.</i> strain SB-K88	<i>Aphanomyces cochlioides</i>	padání klíčnicích rostlin	Islam <i>et al.</i> (2005)
Gliotoxin	<i>Trichoderma virens</i> „Q“	<i>Rhizoctonia solani</i>	kořenová hniloba	Wilhite <i>et al.</i> (2001)
Gliovirin	<i>Trichoderma virens</i> „P“	<i>Pythium ultimum</i>	padání klíčnicích rostlin	Howell, Puckhaber (2005)
Herbicolin	<i>Pantoea agglomerans</i> C9-1	<i>Erwinia amylovora</i>	spála růžokvětých	Sandra <i>et al.</i> (2001)
Iturin A	<i>B. subtilis</i> QST713	<i>Botrytis cinerea</i> and <i>R. solani</i>	padání klíčnicích rostlin	Paulitz, Belanger (2001), Kloepper <i>et al.</i> (2004)
Mycosubtilin	<i>B. subtilis</i> BBG100	<i>Pythium aphanidermatum</i>	padání klíčnicích rostlin	Leclere <i>et al.</i> (2005)
Phenazines	<i>P. fluorescens</i> 2-79 and 30-84	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	černání pat stébel	Thomashow <i>et al.</i> (1990)
Pyoluteorin, pyrrolnitrin	<i>P. fluorescens</i> Pf-5	<i>Pythium ultimum</i> , <i>R. solani</i>	padání klíčnicích rostlin	Howell and Stipanovic (1980)
Pyrrolnitrin, pseudane	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>R. solani</i> , <i>Pyricularia oryzae</i>	padání klíčnicích rostlin	Homma <i>et al.</i> (1989)
Zwittermicin A	<i>Bacillus cereus</i> UW85	<i>Phytophthora medicaginis</i> , <i>P. aphanidermatum</i>	padání klíčnicích rostlin	Smith <i>et al.</i> (1993)

Mykoparazitické houby jsou výrazně vitálnější, rychleji rostou a velmi snadno se přizpůsobují podmínkám prostředí. Z tohoto důvodu, na rozdíl od ostatních druhů, rychleji kolonizují ekologickou niku, čímž zabraňují přemnožení fytopatogenních mikroorganismů. Fytopatogenní organizmy nejsou poté schopny odolat tlaku

mykoparazitické houby (Barnett, Binder 1973). Sivan, Chet (1989) zjistili, že houba *T. harzianum* (T-35) efektivně kolonizoval půdu v blízkosti kořenů rostlin melounu a bavlny, a tím zabránila kolonizaci kořenů fytopatogenní houbou *Fusarium oxysporum*.

Mykoparazitismus můžeme chápat jako nutriční závislost jednoho druhu houby na jiném druhu. Jedná se o přímé napadení houby parazitem, na které navazuje využití živin. Často je používán také termín hyperparazitismus k popsání houby parazitující na jiné parazitické patogenní houbě. Mykoparazitismus byl zaznamenán u všech oddělení hub počínaje od Chytridiomycota až po Basidiomycota (Jeffries 1997). Tento fenomén mykoparazitismu byl poprvé popsán Weindlingem (1932), který zaznamenal mykoparazitismus houby *Trichoderma lignorum* na několika fytopatogenních houbách (*Rhizoctonia solani*, *Phytophthora parasitova*, *Pythium* spp., *Sclerotinia rolfsii*). Barnett, Binder (1973) rozčlenili mykoparazity podle způsobu jejich mechanismu účinku na fakultativní saprotrofy (destruktivní) a biotrofní mykoparazity. Biotrofní mykoparazité parazitují na živých hostitelských buňkách, zatímco fakultativní saprotrofové před proniknutím do hostitelských buněk tyto buňky nejdříve usmrtí.

Tabulka č.2: Typy nekrotrofních a biotrofních mykoparazitů

Nekrotrof	kontaktní	mykoparazit rostoucí v úzkém kontaktu s hostitelskými hyfami, aniž by do nich penetroval
	invazivní	hyfy mykoparazita penetrují do hyf hostitele, rostou v nich a způsobují jejich nekrózu a rozklad
Biotrof	haustoriální	proniká do hyfy hostitele pomocí krátkých hyfálních větví (haustorií)
	vnitrobuněčný	penetruje do hyfy hostitele a obnažený protoplast ze stélky mykoparazita proniká do napadené cytoplazmy
	fúzijící	stěny hyf hostitele a parazita se v místě dotyku těsně spojují, hyfa hostitele není hyfou parazita zjevně penetrována, ale vytvářejí se mezibuněčné kanálky propojující protoplasty hostitele a parazita

2.3. Navození hostitelské rezistence

Rostliny aktivně reagují na různé podněty prostředí, včetně gravitace, světla, teploty, fyzické zátěži a dostupnosti vody a živin. Rostliny také reagují na řadu chemických podnětů vyvolaných půdními a rostlinnými mikroby. Takové podněty mohou vyvolat různé biochemické změny uvnitř hostitelské rostliny, které zvyšují odolnost proti následné chorobě vyvolané patogeny. Navození hostitelské obrany může být lokální nebo systémové povahy, v závislosti na typu, zdroji a množství podnětů. Nedávno fytopatologové začali charakterizovat faktory a cesty vyvolané rezistence stimulované biologickou ochranou a jinými nepatogenními mikroby. První z těchto cest, nazvaná systémová získaná rezistence - SAR (z anglického slova systemic acquired resistance), je zprostředkována kyselinou salicylovou - SA (salicylic acid), sloučeninou, která je často produkovaná infekčními patogeny a obvykle vede k vyjádření proteinů souvisejících s patogenezi – PR_{proteiny} (z anglického slova pathogenesis-related proteins). Tyto PR proteiny obsahují řadu enzymů, z nichž některé mohou působit přímo na štěpení invazních buněk, posilují hranice buněčných stěn, aby odolávaly infekcím, nebo vyvolávají lokální buněčnou smrt. Druhý fenotyp, nejprve uvedených jako indukovaná systémová rezistence (ISR), je zprostředkován kyselinou jasmonovou – JA (jasmonic acid) nebo ethylenem, které jsou produkovány následující aplikací některých nepatogenních rhizobakterií. Zajímavé ale je, že kyseliny salicylová a jasmonová mohou působit antagonisticky proti sobě, toho můžou využít některé bakteriální patogeny a překonat tak SAR (He *et al.* 2004).

2.4. Mykoparazitické houby

Významnou skupinu v biologické ochraně proti původcům onemocnění představují tzv. mykoparazitické houby. Mykoparazitické houby jsou definovány jako houby napadající jiné houby a jsou přirozenými nepřáteli fytopatogenních hub, původců onemocnění rostlin. Poprvé byly popsány v roce 1800 mykology, kteří se zajímali o choroby rostlin (Veselá 1986).

Antagonistické vztahy mezi různými mikroorganismy a patogeny rostlin byly známy již v minulém století a o praktickém využití těchto znalostí se začalo uvažovat již počátkem třicátých let. Další rozvoj přerušila vlna úspěchu chemických pesticidů a jejich masové nasazení po celém světě. Poznání ekologických důsledků jejich mnohdy neuváženého používání vedlo k postupné renesanci zájmu o využití biologických způsobů

ochrany rostlin a intenzita výzkumu na tomto úseku se koncem sedmdesátých a na počátku osmdesátých let nebývale zvýšila (Nesrsta 1991).

2.5. Přehled vybraných druhů mykoparazitických hub

Coniothyrium minitans W.A. Campb. 1947

Taxonomické zařazení: *Coniothyrium minitans*, Oddělení: *Ascomycota* Třída: *Dothideomycetes*, Čeleď: *Leptosphaeriaceae*

Houba *C. minitans* je úzce specializovaný mykoparazit, který infikuje a degraduje sklerocia hub z oddělení *Ascomycota*, rodu *Sclerotinia*. *C. minitans* má schopnost parazitovat sklerocia fytopatogenních druhů hub *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, *S. minor* a *S. cepivorum*, není však schopna infikovat sklerocia hub náležejících do oddělení *Basidiomycota* (Whips, Gerlagh 1992). Gerlagh *et al.* (1996) prokázal, že houba *C. minitans* je schopna infikovat i sklerocia houby *Botrytis cinerea*. Do sklerocií *S. sclerotiorum* proniká mykoparazitická houba buď přímo pigmentovou vrstvou, nebo nepřímou v místě poškození sklerocia. Následně *C. minitans* proniká ve sklerociu i do nepigmentované kůry a dřene sklerocia. Na penetraci se podílí jak lytické enzymy, tak mechanický tlak penetračního hrotu. Po kolonizaci kůry i dřene houbou *C. minitans* dochází k úplné degradaci sklerocia. Svrchní pigmentová vrstva buněk sklerocia je odolnější vůči působení *C. minitans*, proto si degradované sklerocium zachovává tvar. Uvnitř takto degradovaného mycelia je masa pykno spor. Na povrchu infikovaných sklerocií se tvoří pyknidy, z kterých dochází k výronu pykno spor v mucilagenní hmotě (Bennett *et al.* 2006).

Mykoparazitická houba *C. minitans* vytváří na ovesné živné půdě (oat meat agar) variabilní kultury. Zpočátku se tvoří chomáčkovité, slabé mycelium, které se postupně stává hustější a zrnitější díky začátku tvorby pyknid. Barva kultury je zpočátku světle žlutá a přechází přes světle hnědou barvu až do barvy olivové. Na konci sporulace kultura mění barvu na tmavě hnědou až černou. V myceliu se tvoří velký počet pyknid, které jsou uspořádány v řetězcích nebo jsou volně rozmístěny mezi hyfami. Konidiomata pyknidy jsou také tmavě hnědé až černé a jsou kulovité i oválné, v průměru 150-600 µm. Pyknidy se buď vnořují do živné půdy, nebo se vyvíjí na povrchu mycelia, oba typy pyknid mají otvor ostiolum. Pykno spory jsou tmavé, vejčité až elipsoidní nebo mohou být i krátce cylindrické až téměř kulovité s hladkým povrchem. Velikost pykno spor je 4-7 x 3-4 µm.

Na trhu jsou dostupné dva produkty obsahující BCA *Coniothyrium minitans*. V Německu a ve Švýcarsku je to produkt Contans WG a v Maďarsku produkt KONI. Oba přípravky jsou ve formě granulované formulace. Contans WG je nastříkán a vpraven do půdy až po rozptýlení ve vodě, zatímco KONI je včleněn do půdy přímo. Aplikaci je nutné provádět několik týdnů před výsadbou plodiny na poskytnutí času pro zničení sklerocií. Princip působení Contans WG je takový, že spory houby *Coniothyrium minitans* po aplikaci do půdy infikují a parazitují na přítomných sklerociích patogenů *Sclerotinia* spp. a poměrně rychle je rozkládají. K jejich rozvoji dochází zejména v provzdušněné povrchové vrstvě půdy do hloubky cca 10 cm při teplotách nad 1 °C. Při zamrznutí půdy *C. minitans* pozastavuje svůj růst, ale nedochází k odumření. Po zvýšení teploty začíná houba opět parazitovat sklerocia a proto je možné použití přípravku jak na podzim, tak i v jarních měsících. Účinnost odstranění zdrojů infekce z povrchové vrstvy půdy se pohybuje od 95-100 % (Whipps, Lumsden 2001).

Houby rodu *Trichoderma* spp.

Houby rodu *Trichoderma* jsou polyfágní, volně žijící houby, jež se běžně vyskytují u kořenů i volně v půdních ekosystémech. Současné objevy ukazují, že jsou to oportunní, avirulentní symbionti rostlin a stejně tak parazitují i na jiných houbách. Přinejmenším některé kmeny vytvářejí robustní a dlouhotrvající kolonizace povrchu kořenů a pronikají do epidermis a dokonce i několik buněk pod její úroveň. Dále produkují nebo uvolňují řadu látek, které indukují lokalizované nebo systemické rezistentní reakce, a to vysvětluje jejich malou patogenitu vůči rostlinám. Spojení s těmito kořenovými mikroorganismy mají za následek podstatné změny v metabolismu rostlin. Rostliny jsou chráněny před řadou patogenů procesy, které jsou podobné systémově získané rezistenci a rhizobakteriemi indukované systémové rezistenci. Kolonizace kořenů druhů rodu *Trichoderma* rovněž často zvyšuje růst a rozvoj kořenové soustavy, produkci rostliny, rezistenci vůči abiotickým stresům a příjem a využití živin (Harman *et al.* 2004) S houbami tohoto rodu se nejčastěji setkáváme v lesních půdách, kompostech, ve skleníkových substrátech, v půdách s dostatečnou zásobou humusu apod. (Okrouhlá, 1993). Dále se *Trichoderma* spp. vyskytují na odumřelém dřevě a na rostlinných zbytcích. Rozpoznání hub *Trichoderma* spp. je relativně snadné, ovšem identifikace druhů je mnohem obtížnější (Dubos 1987).

Houby todu *Trichoderma* vytvářejí 2 stádia: perfektní a imperfektní. Přičemž telemorfni stádium náleží do třídy *Ascomycetes*, řádu *Hypocreales* a rodu *Hypocrea*.

Anamorfní stádium je řazeno do pomocného oddělení *Deuteromycota*, třídy *Hyphomycetes*, řádu *Moniliales* (Nesrsta 1991). Zástupce z rodu *Trichoderma* můžeme snadno odizolovat z půdy pomocí všech dostupných konvenčních metod např. metoda prekolonizace za využití patogena *S. sclerotiorum* nebo *R. solani*, metoda živých pastí, kdy se jako návnada využívají sklerocia *S. sclerotiorum*. Vzhledem k tomu, že tvoří také chlamydospory a kolonizují organické substráty, jsou druhy hub rodu *Trichoderma* také získávány metodami založenými na promývání půdy (Gams, Bisset 1998).

Kolonie hub rodu *Trichoderma* rostou v kultuře většinou velmi rychle, zpočátku jsou na povrchu zcela hladké a téměř průsvitné nebo vodově bílé. Později začínají být chomáčkovitě nebo kompaktně vatovité v různých odstínech zelené nebo jsou čistě bílé. Do média může vylučovat různé pigmenty (Nesrsta 1991). Zápach je většinou zřetelný nebo slabý, charakteristický pro houbu připomínající kokosový ořech. Struktura konidií je rozprostřená nebo chomáčkovitá. Konidiofory u většiny druhů jdou se širokou hlavní osou větvenou v pravidelných intervalech, obvykle s následnými větveními postupně se zkracujícími a zužujícími. (Kubicek, Harman 1998).

Nejen, že houby rodu *Trichoderma spp.* ovlivňují patogeny v půdě, ale zároveň mohou ovlivňovat rostliny tím, že vylučují tzv. regulační hormon, který může zpětně zvyšovat rychlost růstu nebo i využitelnost přijatelných živin (Okrouhlá 1993; Kolombet *et al.* 2001; Caron *et al.* 2002). Kromě využití některých druhů rodu *Trichoderma* v biologické ochraně rostlin proti patogenním houbám, je řada z nich schopna rozkládat celulózové materiály tím, že produkují enzymy celulózy (Kubicek *et al.* 1990).

Úspěšnost hub *Trichoderma spp.* jako bioagens je dán jejich vysokou schopností reprodukce, schopností přežít nepříznivé podmínky, efektivním příjmem živin, schopností přizpůsobovat si rhizosféru a také vysokou agresivitou proti fytopatogenním houbám a efektivní podporou růstu rostlin včetně jejich obranných mechanismů (Benitez *et al.* 2004). Kmeny *Trichoderma spp.* mají i velkou odolnost a toleranci vůči fungicidům (Okrouhlá 1993).

Trichoderma virens (J. H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx 1987 (= *Gliocladium virens*)

Taxonomické zařazení: *Trichoderma virens* = syn. *Gliocladium virens*, Oddělení: *Ascomycota*, Třída: *Sordariomycetes*, Čeleď: *Hypocreaceae*

Trichoderma virens je mykoparazitická houba, přirozeně se vyskytující ve všech typech půdy. Tato běžná půdní houba potlačuje různé původce chorob rostlin, včetně rodu

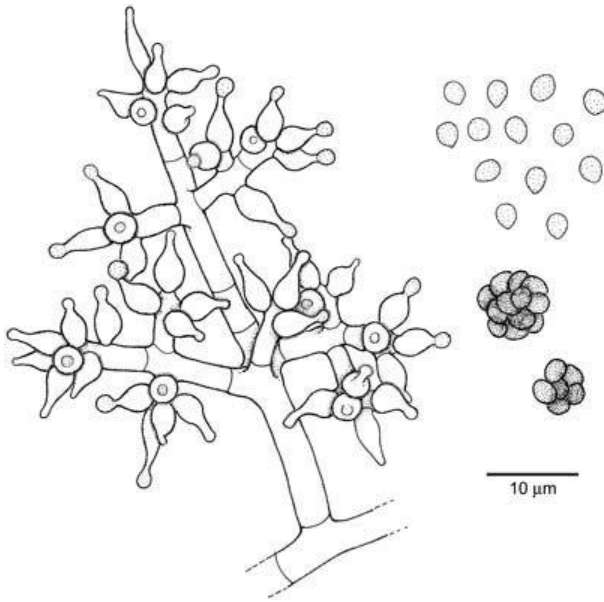
Pythium., *Rhizoctonia solani* a *Sclerotium rolfsii*. *T. virens* se množí pouze nepohlavně. Pohlavní forma není známa. Houba *T. virens* byla jedna z prvních, která byla použita v biologické ochraně rostlin. Kmen GL-21 byl první registrovaný biologický pesticid v roce 1990 společností Certis (Columbia, MD). *Trichoderma virens* vytváří vláknité mycelium, hyfy jsou hojně větvené, přehrádkované, většinou tvořené jednojadernými buňkami. Na myceliu se tvoří septické konidiofory, jež se větví v horní části. Na konci konidioforů se vytvářejí masy hyalinních nebo jasně zbarvených jednobuněčných konidií kulovitěho tvaru, které se tvoří ve vrcholové části postupně za sebou. Všechny konidie se drží pohromadě, neboť jejich soudržnost jim zabezpečují kapénky mucilagenního sekretu (Váňa 1996).

Houba *Trichoderma virens* se objevila na trhu ve dvou různých formulacích: GlioSard™, ve formulaci alginátových pelet a SoilSard™ ve formě granulí. Tyto produkty jsou určeny proti kořenomorce bramborové *R. solani* a *Pythium spp* napadající zeleninu a okrasné rostliny. Aplikace byla omezena pouze na skleníky nebo na ošetření květináčů (Lumsden *et al.* 1996).

Trichoderma harzianum (Rifai) 1969

Taxonomické zařazení: *Trichoderma harzianum* (Rifai) 1969, Oddělení: *Ascomycota*, Třída: *Sordariomycetes*, Čeleď: *Hypocreaceae*

Komerční přípravek houby *Trichoderma harzianum* kmen 1295-22 (T-22) je vyráběn společností Bioworks a následně prodáván přes několik distributorů pod názvem T-22 Planter Box™. Tato formulace na bázi konidií je určena pro aplikace na velké plochy plodin jako je kukuřice, fazole, bavlna a sojové boby a ve většině případů mohou být aplikovány na osivo již ošetřené fungicidy (Harman, Björkman 1998). Ošetřování osiva houbou *T. harzianum* na rostoucí sazenice, kde kolonizuje rhizosféru, ovlivňuje rozvoj kořenového systému a chrání zemědělské plodiny proti kořenomorce bramborové (Whipps, Lumsden 2001).



Obr. č.1: Konidie a konidiofor houby *Trichoderma harzianum* (Hoog 2000)

Další produkt založený na kmenu *T. harzianum* Supresivit je registrován v ČR, ale bohužel v dnešní době je v registru přípravků na ochranu rostlin uveden pouze do spotřebování zásob. Supresivit je biologický fungicidní přípravek ve formě lehce dispergovatelného prášku, k aplikaci zapravením nebo zálivkou výsevních, množárenských i pěstebních substrátů před výsevem nebo na počátku vegetace a k množení a inkrustaci osiva proti komplexu půdních patogenů způsobujících padání klíčících rostlin. Účinnou látkou jsou vzdušné konidie patentovaného kmene *T.harzianum* Rifai aggr. (Patent č.: 281537) v inertním plnidle.

Clonostachys rosea f. *catenulata* (J.C. Gilman & E.V. Abbott) Schroers 2001

Taxonomické zařazení: *Clonostachys rosea* f. *catenulata*, Oddělení: *Ascomycota*, Třída: *Sordariomycetes*, Čeleď: *Bionectriaceae*.

Tato vláknitá houba se vyskytuje v půdě a na rostlinných zbytcích. Parazituje i na jiných houbách. Produkuje gliotoxin. Rozmnožuje se nepohlavně konidiemi, pohlavní stádium není známo. Kolonie této houby nerostou příliš rychle, na MEA (Agar se sladovým extraktem) po 7 dnech při 25 °C jsou velké cca 25-30 mm v průměru, jemně vlnaté, bělavé, růžové, později zelené. Spodní strana nažloutlá nebo bělavá. Na živné půdě OA tvoří *Clonostachys rosea* f. *catenulata* po 7 dnech kultivace při 24° C kultury v průměru 40-50 mm. Kolonie jsou zpočátku čistě bílé, vatovité, později barva přechází do

olivově zelené později i do sytě zelené, zejména ve středu. Barva koreluje se sporulací. *Clonostachys rosea f. catenulata* sporuluje nejprve ve středu kultury, následně se sporuluje v koncentrických kruzích, kdy tyto kruhy jsou odděleny sterilním myceliem. Optimální teplota pro růst houby je 25-28 °C, minimum 4-8 °C, maximum pro sporulaci je 29 °C. Konidiofory jsou jamkovité nebo zvrásněné, 50 až 125 µm dlouhé. Konidiogenní buňky jsou umístěny v přeslenech 25-45 µm dlouhé a na bázi 1,6-3 µm široké, na vrcholové části konidiogenní buňky je 1 -2 µm široký. Konidie se vytváří v řetězcích tvořící úzké a dlouhé sloupce, zabalené v mucilagenu a jsou 150 µm dlouhé. Konidie jsou hyalinní, elipsovité, měkké, světle zelené, 4,0 – 7,5 µm x 3 - 4 µm (Anonym 2).

Tabulka č.3: Přehled nejvýznamnějších biopreparátů na bázi mykoparazitických hub v biologické ochraně rostlin

Název přípravku	Druh mykoparazitické houby a Oomycota	Producent, distributor
AQ 10 WG	<i>Ampelomyces quisqualis M10</i>	Bio Intrachem Italia
Binab T	<i>Trichoderma harzianum</i> (ATTC 20476) a <i>Trichoderma polysporum</i> (ATTC 20475)	Binab USA, Inc.
Contans WG	<i>Coniothyrium minitans</i>	Prophyta Biologischer Pflanzenschutz
Intercept	<i>Coniothyrium minitans</i>	Prophyta Biologischer Pflanzenschutz
Polyversum	<i>Pythium oligandrum*</i>	Biopreparaty s.r.o.
Primastop	<i>Clonostachys rosea f. catenulata J1446</i>	Venera Oy, Finsko
Prestop Mix	<i>Clonostachys rosea f. catenulata J1446</i>	Venera Oy, Finsko
RootShield	<i>Trichoderma harzianum strain KRL-AG2</i>	BioWorks, Inc.
SoilGard	<i>Trichoderma (Gliocladium) virens GL-21</i>	Certis USA LLC
Supresivit®	<i>Trichoderma harzianum</i>	Fytovita s.r.o.
T-22TM HC	<i>Trichoderma harzianum KRL-AG2</i>	BioWorks, Inc.
Trianum-G	<i>Trichoderma harzianum T-22</i>	Koppert B.V. The Netherlands
Trianum-P	<i>Trichoderma harzianum T-22</i>	Koppert B.V. The Netherlands
Trichostar	<i>Trichoderma harzianum T58</i>	Gerlach Natürliche Düngemittel GmbH & Co.KG

Pythium oligandrum Drechsler 1930

Taxonomické zařazení: *Pythium oligandrum* (Drechsler), Říše: *Chromista*, Třída: *Peronosporomycetes*, Čeleď: *Pythiaceae*.

Pythium oligandrum je významný houbě podobný organismus, jež parazituje na celé řadě významných půdních patogenů. Tento organismus je velmi agresivní parazit, který má široké spektrum působení. Parazituje na různých druzích fytopatogenních hub, hlavně na druzích napadající klíčící semena a semenáčky (Lewis *et al.* 1989).

Pythium oligandrum tvoří na kukuřičném agaru vnořené kolonie, které jsou kožovité. Hlavní hyfy jsou až 7 µm široké. Nepohlavní způsob rozmnožování se uskutečňuje pomocí zoospor nebo sporangií, které vyrůstají na sporangioforech (Zvára, Táborský 1985). Sporangia jsou kulovitá nebo vejčitá v průměru okolo 25-45 µm velká, umístěná obvykle interkalárně, někde i laterálně a příležitostně i terminálně. Tvoří se jednotlivě nebo se vyskytují ve skupinkách po 2 až po 5. Sporangia jsou spojena krátkými někdy zduřelými hyfami. Zoospory se tvoří při 18-20 °C. Otvor, kterým se uvolňují zoospory, je 15 - 35 (někdy až 200) µm dlouhý. Encystovaná zoospora má v průměru 9-10 µm. Při pohlavním rozmnožování, po splynutí samčího útvaru anteridia a samičího útvaru oogonia, vzniká oospóra. Oogonia jsou uspořádány terminálně nebo interkalárně, často se vyskytují i na boku hyf. Průměr oogonia je 17 - 35 µm. Anteridia často chybí, někdy se vyskytují 1 nebo 2 anteridia za oogoniem (Cliquet, Tirilly 2002).

V České republice je již dlouhou dobu - od roku 1992 na bázi *Pythium oligandrum* registrován přípravek Polyversum. Obsahuje oospory této houby (1 x 10⁶ spor v 1 g). Tento přípravek má velmi široké spektrum využití (Kopřiva 1997).

Tabulka č.4: Přehled méně používaných biopreparátů na bázi mykoparazitických hub

Název preparátu	Druh bioagens	Původ/výrobce
Trichomil	<i>Trichoderma harzianum</i> RK1	SR
Trieco	<i>Trichoderma viride</i>	India
Trichodex	<i>Trichoderma harzianum</i> T-39	Izrael
Root Pro	<i>Trichoderma harzianum</i>	Izrael
Trichopel	<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma viride</i>	Nový Zéland
Harzan	<i>Trichoderma harzianum</i>	Francie
Trifender	<i>Trichoderma asperellum</i>	Maďarsko
Trichomic	<i>Trichoderma</i> spp.	Španělsko
Trichosan	<i>Trichoderma</i> spp.	Španělsko
Trichodermin	<i>Trichoderma lignorum</i>	Rusko/Bulharsko
Promot WP	<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma koningii</i>	Německo
Rotstop	<i>Phlebia gigantea</i>	Finsko
Pg-IBL	<i>Phlebia gigantea</i>	Polsko
KONI	<i>Coniothyrium minitans</i>	Maďarsko
Biofox C	<i>Fusarium oxysporum</i> Fo47	Itálie
Fusaclean	<i>Fusarium oxysporum</i> Fo47	Francie
Flavus	<i>Aspergillus flavus</i> AF-36	USA
Protus WG	<i>Talaromyces flavus</i> V117b	Německo

2.6. Přehled vybraných půdních původců onemocnění rostlin

Sclerotinia sclerotiorum

Taxonomické zařazení: *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary 1884, Oddělení: *Ascomycota*, Třída: *Leotiomycetes*, Čeleď: *Sclerotiniaceae*.

Hostitelské spektrum: Velmi polyfágní patogen, může napadat téměř prakticky všechny rostliny s výjimkou čeledi *Poaceae*. Z polních plodin je napadána především řepka, hořčice a slunečnice. K významným hostitelským rostlinám patří dále mák, hrách, luskoviny a

zelenina – především salát. Na jetelovinách vyvolává obdobné příznaky *Sclerotinia trifoliorum* (Kazda *et al.* 2010).

Příznaky na řepce: K infekci dochází v období květu nebo odkvétání. Nejčastěji dochází k infekci v místě, kde se vlivem vlhkosti přilepí opadávající květní lístek ke stonku. Ve stejnou dobu se projevují i první příznaky. Houba napadá všechny části rostliny. První známkou napadení jsou protáhlé, vodnaté skvrny na hlavním stonku. Skvrny rychle šednou, často mívají stříbřitý nádech, dochází k trhání a loupání pokožky rostlin. V místě napadení je uvnitř stonku bílé vatovité mycelium houby, ve kterém se tvoří černá, tvrdá nepravidelná tělíska - sklerocia, která mohou být velká i okolo 1 cm. Ve vlhkém prostředí se bílé vatovité mycelium a později sklerocia mohou tvořit i na povrchu rostliny. Silně napadené stonky se lámou. Obdobné příznaky bývají i na postranních větvích. Pokud jsou napadeny šešule, žloutnou a zasychají. Uvnitř šešulí může být mycelium houby i sklerocia. Postupně dojde k odumření stonku nebo i kořene a rostliny zasychají nebo později nouzově dozrávají. Příznaky choroby na stonku se podobají příznakům způsobenými houbami *Botryotinia fuckeliana* a *Leptosphaeria maculans*. Spolehlivým rozpoznávacím znakem v pozdějších fázích infekce je šedobílé zbarvení napadených stonků a přítomnost sklerocií, které jiné houby nevytvářejí (Kazda *et al.* 2010; Vašák *et al.* 1997).

Bionomie: Houba může přežít až 10 let volně v půdě ve formě sklerocií na pozemku. *S.sclerotiorum* je typickým původcem předčasného dozrávání šešulí. Ze sklerocií vyrůstají apothecia, ze kterých se uvolňují spory, které jsou roznášeny větrem, ulpívají i na květních plátcích a při opadu infikují stonky a větve řepky. Infekce se šíří v podobě charakteristického bílého mycelia. (Vašák *et al.* 1997).

Rhizoctonia solani J.G. Kühn 1858

Taxonomické zařazení: Taxonomie dosud nevyřešena. Pozornost věnována hlavně její teleomorní formě: *Thanatephorus cucumeris*. Oddělení: *Basidiomycota*, Třída: *Agaricomycetes*, Čeleď: *Ceratobasidiaceae*

Hostitelské rostliny: *R. solani* patří mezi široce rozšířené rostlinné patogeny, které kromě brambor napadají více než 500 druhů rostlin náležejících do různých botanických čeledí (Čača 1981).

Příznaky: Symptomy závisejí na ruhu a vývojové fázi hostitelské rostliny a na podmínkách prostředí. Pravděpodobně nejčastějším symptomem vyvolaným *Rhizoctonia*

sp. je padání klíčnicích a vzházejících rostlin, vyskytující se zejména na chladných mokřých půdách. Klíčnicí rostliny mohou uhynout ještě dříve, než dosáhnou povrchu půdy. U rostlin se silnými dužnatými klíčky se na nich objevují nápadné hnědé léze a zčernalé odumřelé vrcholky. Pokud rostliny vzejdou nad povrch půdy, napadení se projeví vodnatými měkkými lézemi na stonku, ztrátou pevnosti pletiv a padáním rostlin na povrch půdy. U starších rostlin je napadení omezováno tvorbou vnějších korových pletiv. Rezavě hnědé skvrny na rozhraní půdy a vzduchu se podélně i příčně zvětšují, až obepnou celý stonek, který se svrašťuje, černá a rostliny padají a hynou. Patogen se ve výsevech šíří velmi rychle, výpadky rostlin se vyskytují hnízdovitě. Napadení kořenů mladých, starších a dospělých rostlin *R. solani* je charakterizováno jednotlivými rezavě hnědými až tmavě hnědými, mírně vkleslými lézemi a hnilobou korových pletiv. Zpočátku mělké léze se objevují na stonku těsně pod povrchem půdy, u mladých rostlin mohou zasahovat i do hlubších vrstev. V chladném vlhkém prostředí se hniloba může rozšířit na téměř všechny kořeny a jednotlivé léze již nemusí být zřetelně viditelné. Tvorba nových kořenů je výrazně potlačena. Někdy jsou na povrchu lézí viditelné (pod lupou) hnědé hyfy. Následkem je vadnutí, žloutnutí nadzemních částí a odumírání rostlin. *R. solani* je mnohem častěji původcem hnilob kořenového krčku a řízků než kořenů Mycelium je světle hnědé, difúzní a rychle rostoucí. Vytváří dva typy hyf: přímé dlouhé a postranní kratší, které jsou na konci rozdělené častými přehrádkami na soudečkovité buňky, jež se později ulamují a slouží k vegetativnímu rozmnožování. Hyfy jsou poměrně široké, větví se v téměř pravých úhlech. Sklerocia jsou zprvu bílá, později hnědnou až černají. Sklerocia vznikají z hyf, které mezi sebou mnohonásobně anastomozují a vytvářejí klubíčka. Stadium basidiomyceta se vyvíjí saprotrofně v podobě bělošedého myceliálního povlaku, na němž se tvoří hymenium s basidiemi a basidiosporami (Fassatiová 1979; Smith, Wehner 1986).

Bionomie: Houba přežívá ve formě mycelia a sklerocií v půdě a na napadených zbytcích rostlin. Patogen je běžnou součástí půdní mikroflóry. Vzniku a rozvoji chorob napomáhá i nízké pH půdy, malý obsah organické hmoty v půdě, utužení půdy (Kazda *et al.* 2010).

2.7. Biologická ochrana proti fytopatogenním houbám

Biologická ochrana rostlin nabízí další způsob snižování zátěže životního prostředí na základě použití biologických antagonistických druhů, které potlačují fytopatogenní houby obilnin. Jde zvláště o biopreparáty: Supresivit (na bázi houby *Trichoderma harzianum*),

Polyversum (na bázi hoube blízkému organismu *Pythium oligandrum*), Ibefungin (na bázi bakterie *Bacillus subtilis*) a Trianum P (na bázi houby *Trichoderma harzianum*). Uvedené biopreparáty potlačují zvláště mikromycety rodů *Fusarium*, *Gaeumannomyces*, *Pseudocercospora* (syn. *Oculimacula*), *Drechslera* a další. Využitím těchto přípravků dochází k redukci výskytu fytopatogenních hub v půdě i v rostlinách. Zlepšení zdravotního stavu porostů obilnin je předpokladem pro vyšší a kvalitnější hospodářskou produkci (Hýsek *et al.* 2008).

2.8. Agrotechnická ochrana proti fytopatogenní houbě *S. sclerotiorum*

Prokázalo se, že agrotechnická opatření jako zavlažování (Moore 1949), hluboké zaorání plodin do půdy na zelené hnojení (Merriman *et al.* 1979), snížení frekvence zavlažování (Steadman 1983; Ferraz *et al.* 1999), ochrana rostlin proti plevelům (Dillard, Hunter 1986), půdní solarizace (Ben-Yephet 1988; Phillips 1990) a travní mulčování půdy (Ferraz *et al.* 1990) mají vliv na snížení počtu životaschopných sklerocií v půdě, zabraňují karpogennímu klíčení. Podpovrchové zavlažování místo povrchového zavlažování může regulovat tvorbu apotecií, což je způsobenou suchou půdou do hloubky 5 - 8 cm, kde se sklerocia vyskytují (Subbarao 2002; Davis 2004).

Vysoká teplota propařování půdy (více jak 100°C) před výsevem může podstatně snížit počet životaschopných sklerocií, zvláště když jsou sklerocia částečně hydratovaná a nachází se v blízkosti povrchu půdy (Couper 2001). Propařování půdy po dobu 15 minut při potenciálu půdy více než -145 kPa byly doporučeny jako efektivní krok k potlačení tvorby apotecií u sklerocií do hloubky 6 cm půdy. Nicméně, laboratorní studie ukázaly, že propařování půdy při nižších teplotách a kratším trvání (asi 60 ° C po dobu 3 min) dojde k zahubení patogena *S. sclerotiorum* (Van Loenen *et al.* 2003). Půdy doplněné fermentovanými zemědělskými odpady také účinně potlačují rozvoj a vývoj patogena *S. sclerotiorum* v půdě (Huang *et al.* 1997).

Patogen *S. sclerotiorum* je polyfágní houba, která napadá velké množství plodin. Obilniny tímto patogenem napadány nejsou, proto je důležité zařazovat je do osevních postupů mezi pěstované plodiny, které jsou náchylné k tomuto patogenu. Obilniny působí jako tzv. přerušovači kontinuální infekce plodin fytopatogenní houbou *S. sclerotiorum* (Steadman 1979). Rotace plodin více než 3 nebo 4 roky nebyla vždy úspěšná při regulaci počtu sklerocií v půdě (Schwartz, Steadman 1978; Williams, Stelfox 1980) nebo výskytu patogena *S. sclerotiorum* (Morrall, Dueck 1982). Zařazení brokolice (*Brassica oleracea* L.)

do osevniho postupu nebo zapravení posklizňových zbytků brokolice do půdy může snížit tvorbu sklerocií a tím snížit závažnost chorob způsobených houbami rodu *Sclerotinia spp* (Subbarao 1998; Subbarao 2002). Brukvovité plodiny s vysokým obsahem glukosinolátů s mykoparazitickými vlastnostmi nabízí biologickou alternativu využití (např. biofumigace), místo chemická fumigace půd (Warton *et al.* 2001). Osevní postup se zastoupením brukvovitých rostlin může být obzvláště užitečný pro pěstování mrkve, protože mrkev je velmi náchylná k patogenu *S. minor* (Melzer *et al.* 1997). Souběžné infekce rostlin mrkve patogeny *S. sclerotiorum* a *S. minor* nebyly hlášeny (Kora *et al.* 2002).

Správná agrotechnika a důkladní zapravování rostlinných zbytků je velmi důležitý krok v boji proti patogenu *S. sclerotiorum* (Grazia-Garza *et al.* 2002). Například přímý výsev lupiny do strniště obilnin snižuje výskyt a závažnost sclerotiniových stonkových hnilob a tím zvyšuje množství biomasy při sklizni lupiny (Simpfendorfer *et al.* 2004). Kromě toho může vyšší množství mikroorganismů v horních vrstvách půdy, kde nebyla dělána orba nebo bez mulčování ve srovnání s konvenčním způsobem zpracování půdy přispívat k vyšší rychlosti rozkladu sklerocií (Doran 1980).

3. Materiál a metodika

3.1. Matečné kultury kmenů z komerčních biopreparátů

Kmeny z komerčních biopreparátů byly získány tak, že 0,5 g každého biopreparátu bylo rozsypano na povrch 2% vodního agaru. Petriho misky byly vloženy do plastických sáčků a inkubovány po dobu 7 dní v termostatu $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Po inkubaci byl na každé misce zaznamenán růst sporulujícího mycelia mykoparazitické houby resp. garantovaného kmene. Kmen byl přenesen pomocí inokulační kličky na povrch umělé živné půdy PDA („Potato Dextrose Agar“). Takto získaná čistá kultura kmene byla dále používána k pokusům.

Tabulka č.1: Biopreparáty na bázi mykoparazitických použitých v pokusech.

Název přípravku	Druh houby	Označení kmene	Kmen
BINAB GOLF	<i>Trichoderma harzianum</i> a <i>T. polysporum</i>	ATTC 20476 ATTC 20475	BINAB Bio-Innovation AB, Švédsko
PRESTOP MIX	<i>Clonostachys rosea</i> <i>f. catenulata</i>	J1446	Verdera, Finsko
SOILGARD 12G	<i>Trichoderma virens</i>	GL-21	Certis USA LLC
SUPRESIVIT	<i>Trichoderma harzianum</i>	GVS GL-21	Fytovita s.r.o., ČR
TRIANUM	<i>Trichoderma harzianum</i>	T-22	Koppert B.V., Holandsko
CONTANS WG	<i>Coniothyrium minitans</i>	CON/M/91-08	Prophyta Biologisher Pflanzenschutz GmbH

3.2. Matečné kultury kmenů odizolovaných v rámci monitoringu Jižních Čech a kmenů *C. minitans*.

Nativní kmeny byly odizolovány v rámci monitoringu Jižní Čechy pomocí standardních metodických postupů. Kmeny 2 KZ, 5 KZ, 10 KZ, 11 EZ a 13 EZ byly odizolovány z půdního vzorku pomocí metody výluhu (Dilution plate technique), která spočívá v získání výluhu půdního vzorku (20 g půdy na 100 ml destilované vody) a inokulací výluhu o objemu 0,5 ml na živnou půdu PDA. Nativní kmen 2 KZ SBT byl získán pomocí metody živé pasti, kdy se používají jako návnada sklerocia fytopatogenní

houby *Sclerotinia sclerotiorum*. Kmeny Pěnčín, 1 A – 3 B mykoparazitické houby *C. minitans* byly získány metodou prekolonizace, kdy se využívá jako návnada plně porostlá kultura *S. sclerotiorum* na živné půdě PDA.

Každá technika umožňuje izolaci mykoparazitických hub, kdy po době inkubace jsou jednotlivé kmeny izolovány a čištěny přes živnou půdu PDA. Čisté kultury kmenů byly využity v pokusech.

Tabulka č.2: Kmeny mykoparazitických hub použitých v pokusech.

Označení kmene	Lokalita	Zdroj	Izolace
2 KZ	Lomnice nad Lužnicí	půda	Metoda výluhu
2 KZ SBT	Lomnice nad Lužnicí	půda	Metoda živé návnady
5 KZ	Nová Bystřice	půda	Metoda výluhu
10 KZ	Laziště	půda	Metoda výluhu
11 EZ	Strunkovice nad Blanicí	půda	Metoda výluhu
13 EZ	Novosedly nad Nežárkou	půda	Metoda výluhu
Pěnčín	Pěnčín	půda	Metoda prekolonizace
1A – 3B	ČR	mrkev	Metoda prekolonizace
CCMF-540	ČR	Sbírka (CCM)	Lyofilizát
HOL CBS 111750	Holandsko	Sbírka (CBS)	Lyofilizát

3.3. *Sclerotinia sclerotiorum*

V pokusech byl použit kmen fytopatogenní houby *S. sclerotiorum*, který byl odizolován z infikovaných rostlin řepky ozimé na poli v lokalitě Lomnice nad Lužnicí. Tento kmen tvoří sklerocia na okrajích Petriho misky. Odebraná sklerocia byla povrchově sterilována 3% roztokem Savo a následně 3x omyta sterilní destilovanou vodou. Pro získání mycelia *S. sclerotiorum* bylo sklerocium umístěno do středu Petriho misky na 2% vodní agar. Získaný izolát *S. sclerotiorum* byl následně udržován přenosem mycelia vždy na čerstvou živnou půdu PDA. Kmen tvoří sklerocia na okrajích Petriho misky.

3.4. *Rhizoctonia solani*

V pokusech byl použit kmen RH 23 fytopatogenní houby *R. solani*, který byl ve formě čisté matečné kultury poskytnut americkou firmou Certis USA LLC, která tento kmen používá jako standardní referenční kmen při hodnocení kvality jednotlivých šarží biopreparátu na bázi houby *Trichoderma (Gliocladium) virens*.

3.5. Kultivace matečných kultur

Kmeny mykoparazitických hub byly kultivovány na povrchu agarizované živné půdy PDA formou separačních čar. Masa spor byla přenesena z matečných kultur roztěrem (3 čáry na 1 misce) na povrch PDA pomocí sterilní inokulační kličky.

Fytopatogenní houby *S. sclerotiorum* a *R. solani* byly na střed agarových ploten inokulovány přenosem výřezu agarového bločku o průměru 10 mm z matečné kultury. Kultivace všech kmenů mykoparazitických i fytopatogenních hub probíhaly za stejných podmínek (25 ± 1 °C, fotoperioda 0/24). Fytopatogenní houby *S. sclerotiorum* a *R. solani* byly inkubovány pouze po dobu 4 - 5 dní, zatímco kmeny mykoarazitických hub byly inkubovány po dobu 10 dní. Plně porostlá kultura *S. sclerotiorum* a *R. solani* byly následně použity pro párové pokusy. Z kultury byly korkovrtem o průměru 10 mm vyříznuty bločky, které se následně přenášely na experimentální PDA plotny.

3.6. Příprava sporových suspenzí

Sporové suspenze mykoparazitických hub byly získávány smytím sterilním roztokem destilované vody s přídavkem 0,05% Tween[®] 80 z plně sporulujících kultur. Získané suspenze byly filtrovány přes sterilní gázu a v suspenzi byla pomocí počítací komůrky (Neubauer Improved Chamber, Fisher) stanovena koncentrace spor. Pro většinu pokusů byla základní suspenze spor následně adjustována ředěním (sterilní 0,05% Tween[®] 80) na titer $1,00 \times 10^6$ v 1 ml. Konečná koncentrace spor v adjustovaných suspenzích byla opětovně ověřována odpočtem partikulí pomocí počítací komůrky.

3.7. Interakční „*in vitro*“ testy na agarových plotnách

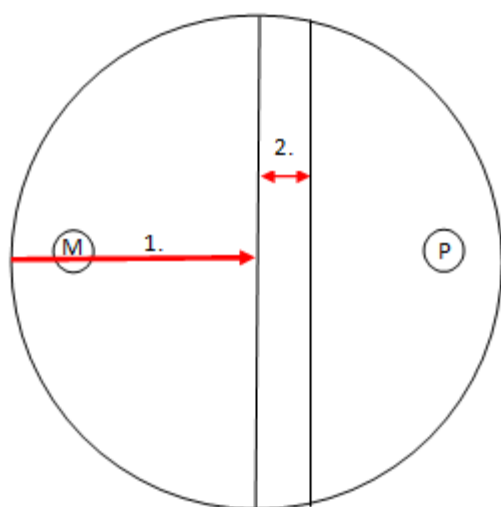
Cílem párových interakčních testů na PDA plotnách je zaznamenat schopnost mykoparazitických hub ovlivnit růst a vývoj původců onemocnění rostlin. V případě fytopatogenní houby *S. sclerotiorum* jde zejména o supresi tvorby sklerocií. Model preventivní aplikace byl simulován párovým testem, při kterém byla suspenze jednotlivých

kmenů mykoparazitických hub inokulována na plotnu živné půdy PDA současně s vyříznutým bločkem z kultury fytopatogenní houby. Adjustovaná suspenze (standardní titr 1×10^6 spor v 1ml) každého kmene hub rodu *Trichoderma* byla inokulována ve formě kapky na okraj Petriho misky s živnou půdou PDA. Na protilehlou stranu byl umístěn terčík o průměru 10 mm, který byl vyříznutý z plně porostlé kultury fytopatogenní houby *S. sclerotiorum* nebo *R. solani*. Model kurativní aplikace byl simulován párovým testem, při kterém byla pyknosporová suspenze jednotlivých kmenů *C. minitans* aplikována ve formě kapky pomocí laboratorní kličky (10 μ l) na okraj Petriho misky s předstihem 3 dnů před umístěním patogena *S. sclerotiorum*. Po 3 dnech byl na protilehlý okraj Petriho misky inokulované kmenem *C. minitans* umístěn bloček houby *S. sclerotiorum* (průměr 10 mm) vyříznutý z 5 denní kultury. Kontrolní verzi pro oba modely představovala varianta, ve které byl jak patogen, tak jednotlivé kmeny hub rodu *Trichoderma* nebo *C. minitans* inokulovány zvlášť na okraje Petriho misky. Petriho misky byly vloženy v plastických sáčcích do termostatu (20 ± 1 °C) a inkubovány. Hodnocení interakcí bylo provedeno 7. den po dodání patogena *S. sclerotiorum* na PDA pomocí fotodokumentace resp. 10 den od inokulace pyknosporové suspenze kmenů *C. minitans*. V každém pokusu byla hodnocena jiná kritéria. Hodnocené parametry jsou uvedeny v následující části.

3.7.1. Zóna dotyku a zóna mykoparazitismu

Po 7 dnech byla ze spodní strany měřena zóna dotyku fytopatogenní houby s mykoparazitickou houbou. Zóna dotyku je délka v mm od okraje misky v místě inokulace mykoparazita do místa střetu fytopatogenní houby s mykoparazitem (viz Obr.č.1).

Obr. č.1: Měření zóny dotyku a zóny mykoparazitismu.



M = kmen mykoparazitické houby
P = patogen (fytopatogenní houba *S. sclerotiorum* nebo *R. solani*)
1. = zóna dotyku – měřena od okraje misky k místu střetu mykoparazita s patogenem
2. = zóna mykoparazitismu – zóna přerůstání kultury patogena mykoparazitickou houbou

3.7.2. Počet a váha sklerocií

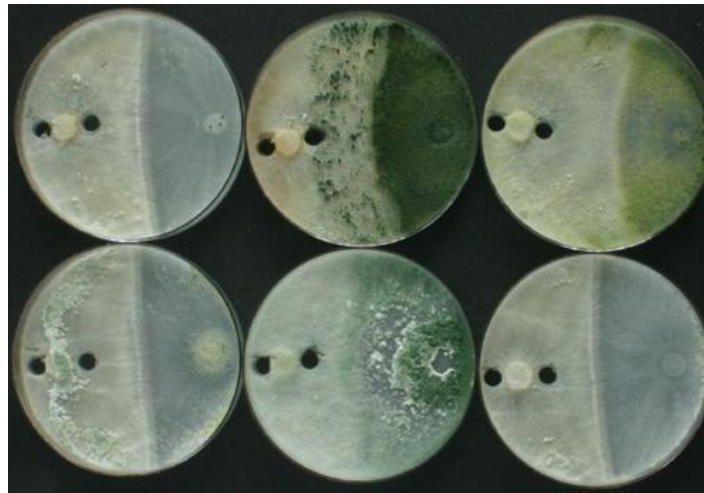
V každém opakování byla spočítáno vyvinutí sklerocia a následně byl spočítán průměr počtu sklerocií na jednu Petriho misku a variantu. Sklerocia byla následně vyjmuta z kultury fytopatogenní houby *S. sclerotiorum* a byla stanovena jejich hmotnost. Z naměřených hodnot byla vypočtena průměrná hmotnost jednoho sklerocia.

3.7.3. Ověření parazitace sklerocií *S. sclerotiorum* nebo terčičků vyříznutých z kultury *R. solani*

Vytvořená sklerocia *S. sclerotiorum* z každé varianty byla přenesena na střed živné půdy PDA v malých Petriho miskách (60 mm). Sklerocia se tvořila na obou stranách Petriho misky, do pokusu byla vzata sklerocia jen z jedné strany (viz obr. 2). V interakčních testech mykoparazitických hub s *R. solani*, byly vyříznuty 2 terčičky, které byly také umístěny doprostřed Petriho misky (viz obr. 3.). Petriho misky byly vloženy do plastického sáčku a sklerocia resp. terčičky byly inkubovány při 20 ± 1 °C. Po 7 dnech bylo hodnoceno, zda ze sklerocia resp. terčičku odrůstala mykoparazitická houba (prokázání parazitce) nebo zda se z terčičků vyvinula nová generace patogena *R. solani* nebo zda se ze sklerocia vytvořila zdravá kultura *S. sclerotiorum* včetně nové generace sklerocií. Ve variantě, kde nedošlo k prokázání mykoparazitismu, byla sklerocia nové generace opět spočítána a zvážena.



Obr. č.2: Z interakčních testů mykoparazitických hub rodu *Trichoderma* s patogenem *S. sclerotiorum* byla vyjmuta sklerocia, která byla testována na parazitaci mykoparazitem



Obr. č.3: Z interakčních testů mykoparazitických hub rodu *Trichoderma* s patogenem *R. solani* byly vyříznuy bločky, které byly následně testovány na jejich parazitaci mykoparazitem.

3.7.4. Výtěžnost spor mykoparazitické houby

Cílem testu je stanovit množství vyprodukovaných spor při kultivaci mykoparazitických hub na umělé živné půdě PDA a přirozeném živném substrátu. Produkce spor se stanovovala jak z kontrolních kultur mykoparazitických hub, tak i z kultur mykoparazitických hub v interakci s patogeny *S. sclerotiorum* a *R. solani*. Kulturní mykoparazitické houby v Petriho miskách spolu s živnou půdou PDA byly homogenizovány v mixéru s adekvátním množstvím vody (100 ml na jednu Petriho misku). Pomocí počítací komůrky - hematocymetru (Neubauerova vylepšená komůrka) byla stanovena produkce spor, která se vyjádřila na jednu Petriho misku nebo na mm² plochy středové kultury.

V případě výtěžnosti na přirozeném substrátu bylo naváženo 50 g sterilních ječných krup do 500 ml Erlenmeyerovy baňky (2 opakování pro každý kmen). Sterilní kroupy byly inokulovány suspenzí konidií získanou ze 7 denní matečné kultury kultivované na PDA, adjustované na titer $1,0 \times 10^6$ spor v 1 ml suspenze. Po 4 denní kultivaci (klimabox, 20 ± 1 °C, fotoperioda 16/8) byla produkce spor spočítána tak, že se plně porostlé kroupy mykoparazitickou houbou důkladně vymyly se známým množstvím vody. Získaná suspenze se důkladně promíchala. V takto vzniklé sporové suspenzi bylo spočítáno množství spor pomocí počítací komůrky - hematocymetru (Neubauerova vylepšená komůrka). Produkce byla vyjádřena na 1 g přirozeného substrátu.

3.7.5. Radiální růst

Radiální růst středových kultur slouží k parametrickému hodnocení. Na umělých živných půdách, kde jsou rovnoměrně rozloženy živiny, vytváří mykoparazitické houby pravidelné kruhové kultury. Cílem testu bylo u jednotlivých kmenů zaznamenat nárůst středové kultury v průběhu 24 hodinového intervalu. Kultury byly zakládány tak, že na střed PDA byla ve formě kapky neinokulována suspenze kmenů mykoparazitických hub. Po zaschnutí, byly Petriho misky vloženy do plastických sáčků a kultivovány při teplotě 20 ± 1 °C. V 24 hodinových intervalech byl měřen průměr středové kultury pomocí měřítka. Rozměr kultury byl stanoven měřením dvou na sebe kolmých průměrů, z nichž byla spočítána celková plocha kultury. Z naměřených hodnot byl spočítán průměrný průměr středové kultury za jednotku času a na jednu variantu. U mykoparazitické houby *C. minitans* byla stanovena i produkce na mm^2 .

4. Experimentální část a výsledky

Pokus č.1: Hodnocení účinnosti hub rodu *Trichoderma* na vybrané houbové původce onemocnění rostlin - antagonistický test pomocí standardního laboratorního testu v laboratorních podmínkách

4.1. Hodnocení účinnosti hub rodu *Trichoderma* a *Clonostachys* inkorporovaných do biopreparátů využívaných v biologické ochraně rostlin v EU a USA

4.1.1. Interakce s fytopatogenní houbou *Sclerotinia sclerotiorum*

Základní údaje o pokusu:

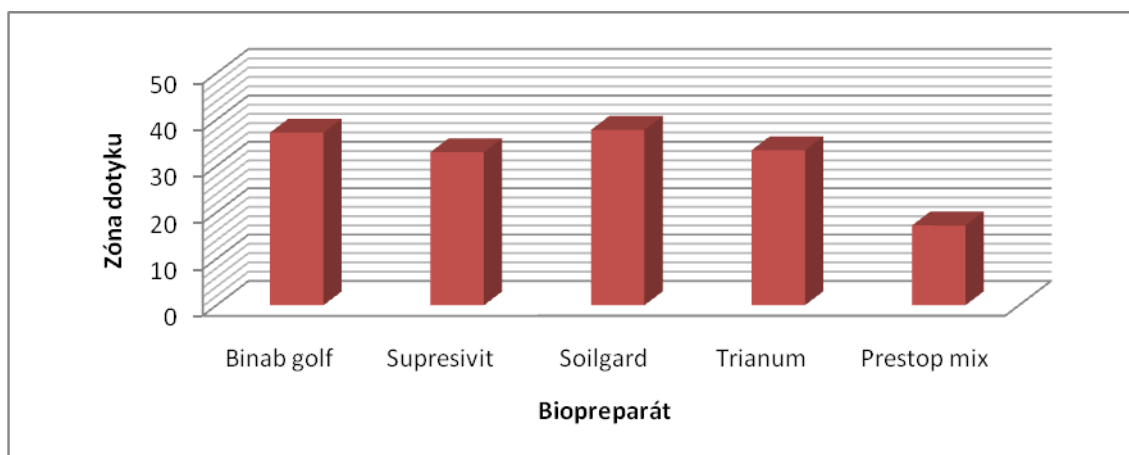
- Suspenze konidií kmenů izolovaných z biopreparátů o standardním titru $1,00 \times 10^6$ spor v 1ml.
- Inokulace mykoparazita na okraj Petriho misky a umístění bločku patogena *S. Sclerotiorum* na protější stranu (6 opakování) + kontrolní varianta.
- Inkubace testů v termostatu při 20 °C.
- Hodnocení provedeno po 7 dnech, hodnocena byla zóna dotyku, zóna mykoparazitismu, produkce sklerocií včetně zaznamenání jejich hmotnosti, ověřování parazitace vyvinutých sklerocií v interakci s mykoparazity a stanovení produkce spor spor mykoparazitů.

A) Zóna dotyku a zóna mykoparazitismu

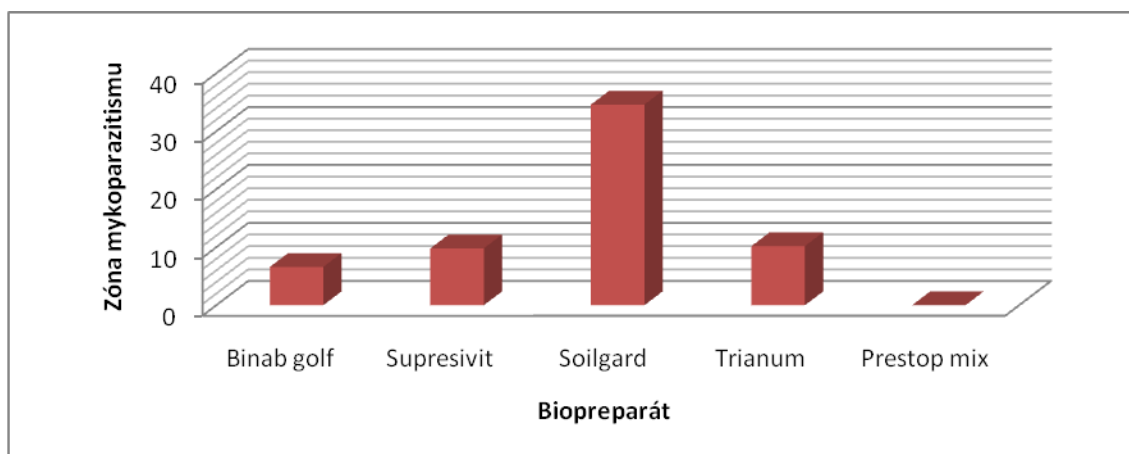
Tabulka č.1: Průměrná zóna dotyku a zóna mykoparazitismu všech biopreparátů se *S.sclerotiorum* [mm].

Biopreparát	Zóna dotyku	Zóna mykoparazitismu
<i>S. sclerotiorum</i>	41,50 ± 0,00	-
Binab Golf	37,20 ± 1,72	6,60 ± 0,80
Supresivit	33,00 ± 7,92	9,80 ± 3,06
SoilGard	37,80 ± 1,17	34,60 ± 4,03
Trianium	33,40 ± 1,02	10,2 ± 2,79
Prestop mix	17,20 ± 1,47	0

Graf č.1: Průměrná zóna dotyku všech biopreparátů se *S. sclerotiorum* [mm].



Graf č.2: Průměrná zóna mykoparazitismu všech biopreparátů se *S. sclerotiorum* [mm].



Závěr: V kontrolní variantě, kde byly na protilehlých okrajích Petriho misky umístěny bločky fytopatogenní houby *S. sclerotiorum*, došlo k dotyku obou kultury *S. sclerotiorum* uprostřed Petriho misky, tj. ve vzdálenosti 41,50 mm od jejího okraje. Houby rodu *Trichoderma* z přípravků SoilGard a Binab Golf rostly nejrychleji ze všech variant. Zóna dotyku v interakci s fytopatogenní houbou *S. sclerotiorum* byla vytvořena ve vzdálenosti 37,80 mm (SoilGard) resp. 37,20 mm (Binab Golf) od okraje misky. Pomalejší kolonizace misky vykazovala houba *Trichoderma harzianum* z přípravků Trianum a Supresivit. Zóna dotyku u obou variant byla zaznamenána ve vzdálenosti pouhých 33 mm.

U všech variant byla měřena i zóna mykoparazitismu. Nejlepší mykoparazitickou schopnost prokázala mykoparazitická houba *T. virens* z přípravku SoilGard. Zóna mykoparazitismu byla 34,60 mm široká. Hyfy *T. harzianum* z biopreparátu Trianum přerůstaly kulturu *S. sclerotiorum* do vzdálenosti 10,20 mm. Mykoparazitická houba

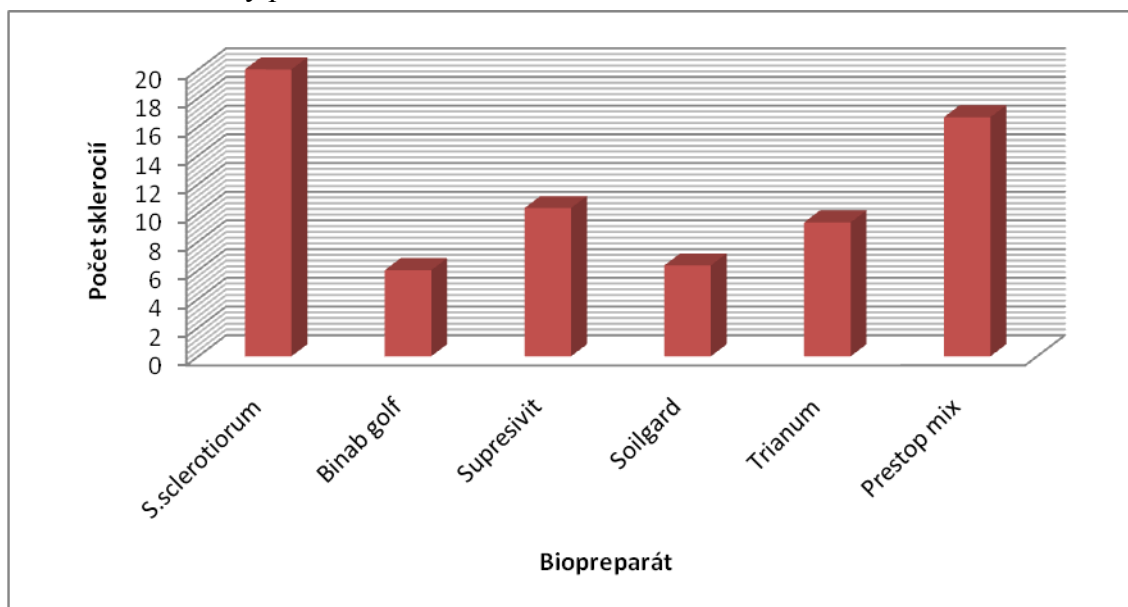
Clonostachys rosea f. catenulata z přípravku Prestop Mix je pomale rostoucí houba. Zóna dotyku se *S. sclerotiorum* byla ve vzdálenosti 17,20 mm. U tohoto druhu nebyla zaznamenána mykoparazitická zóna.

B) Počet a hmotnost sklerocií *S. sclerotiorum*

Tabulka č.2: Průměrný počet sklerocií a průměrná hmotnost 1 sklerocia [mg] v 1 Petriho misce.

Biopreparát	Počet sklerocií	Hmotnost
<i>S.sclerotiorum</i>	20,00 ± 2,24	15,30 ± 1,00
Binab Golf	6,00 ± 1,53	16,50 ± 0,30
Supresivit	10,33 ± 3,25	11,80 ± 0,30
SoilGard	6,33 ± 2,05	10,65 ± 4,05
Trianum	9,33 ± 2,21	15,75 ± 4,75
Prestop mix	16,67 ± 1,80	13,40 ± 1,00

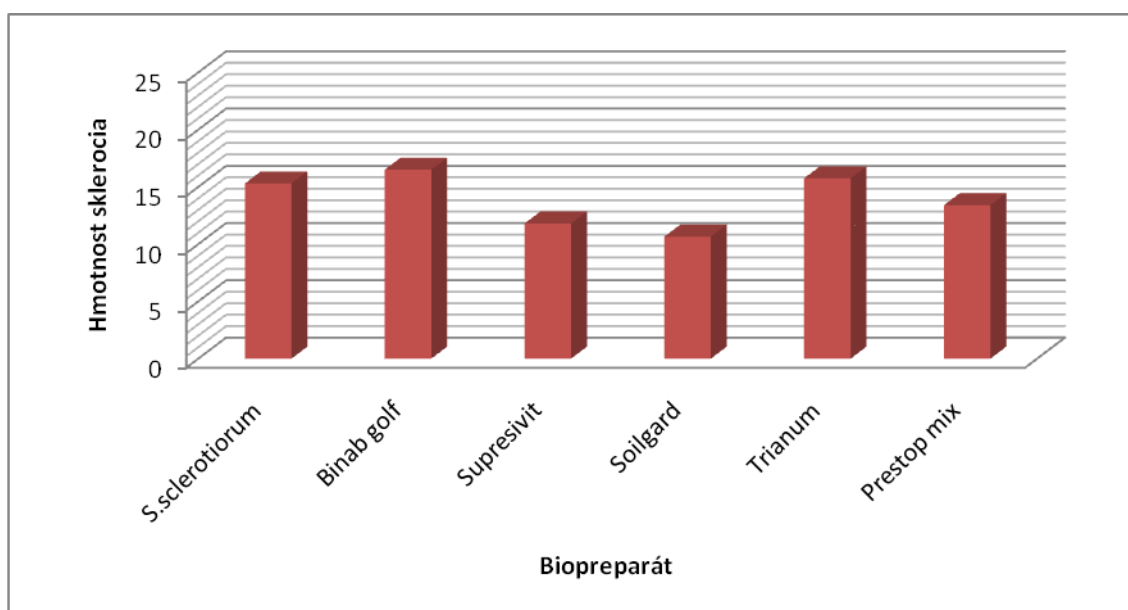
Graf č.3: Průměrný počet sklerocií v 1 Petriho misce.



Závěr: V kontrolní variantě bylo na kultuře *S. sclerotiorum* vytvořeno 20 sklerocií. Tvorba sklerocií byla inhibována v interakci s houbami rodu *Trichoderma* z biopraprátů Binab Golf a SoilGard. U obou variant bylo vytvořeno v průměru 6 sklerocií. *T. virens* z přípravku SoilGard ovlivnila nejen tvorbu sklerocií, ale i jejich váhu. Váha vytvořených

sklerocií byla v této variantě jen 10,65 mg. Sklerocia vytvořená ve variantě Binab Golf byla naopak největší, váha sklerocií byla 16,50 mg. Nejvíce sklerocií bylo vytvořeno v interakci *Clonostachys rosea f. catenulata* se *S. sclerotiorum* (17 sklerocií), nicméně i v této variantě došlo v porovnání s kontrolní variantou k jejich redukci. *T. harzianum* také inhibovala tvorbu sklerocií. U přípravku Trianum bylo vytvořeno jen 9 sklerocií a u Supresivitu 10 sklerocií.

Graf č.4: Průměrná hmotnost 1 sklerocia v 1 Petriho misce [mg].



C) Ověření parazitace sklerocií *S. sclerotiorum*

Tabulka č.3: Parazitace, průměrný počet sklerocií a průměrné hmotnosti [mg] v malých Petriho miskách se *S. sclerotiorum*.

Biopreparát	Počet sklerocií	Počet parazit. sklerocií	Počet nové generace sklerocií	Průměrná hmotnost
<i>S. sclerotiorum</i>	-	-	23,67 ± 3,77	7,43 ± 1,23
Binab Golf	5	0	26,40 ± 1,85	6,54 ± 1,47
Supresivit	5	0	22,40 ± 1,62	6,98 ± 1,09
SoilGard	5	5	0	0
Trianum	4	1	25,33 ± 1,70	6,23 ± 0,78
Prestop mix	8	0	22,25 ± 3,38	7,10 ± 1,35

Závěr: Po interakčních testech byla z jednotlivých variant odebrána sklerocia a jednotlivě umístěna na povrch živné půdy PDA v malých Petriho miskách. Po 7 dnech byla sledována parazitace. Nejlepší účinnosti byla zaznamenána u přípravku SoilGard, kde byla všechna sklerocia parazitována mykoparazitickou houbou *T. virens*. U přípravku Binab Golf, PrestopMix a Supresivit nebylo zaznamenáno ani jedno parazitované sklerocium. Pouze 1 parazitované sklerocium bylo zaznamenáno u přípravku Trianum.

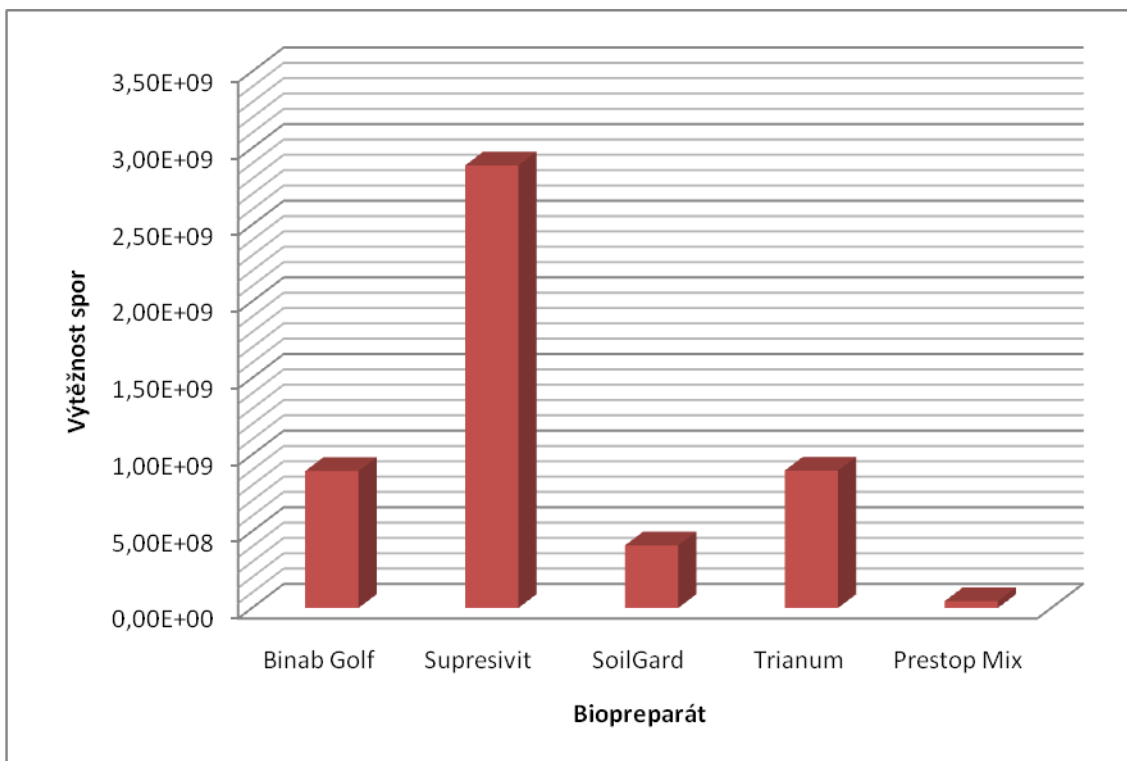
D) Výtěžnost spor mykoparazitických hub

Tabulka č.4: Produkce spor na 1 kulturu mykoparazitických hub izolovaných z komerčních biopreparátů po vzájemné interakci s fytopatogenní houbou *S.sclerotiorum*.

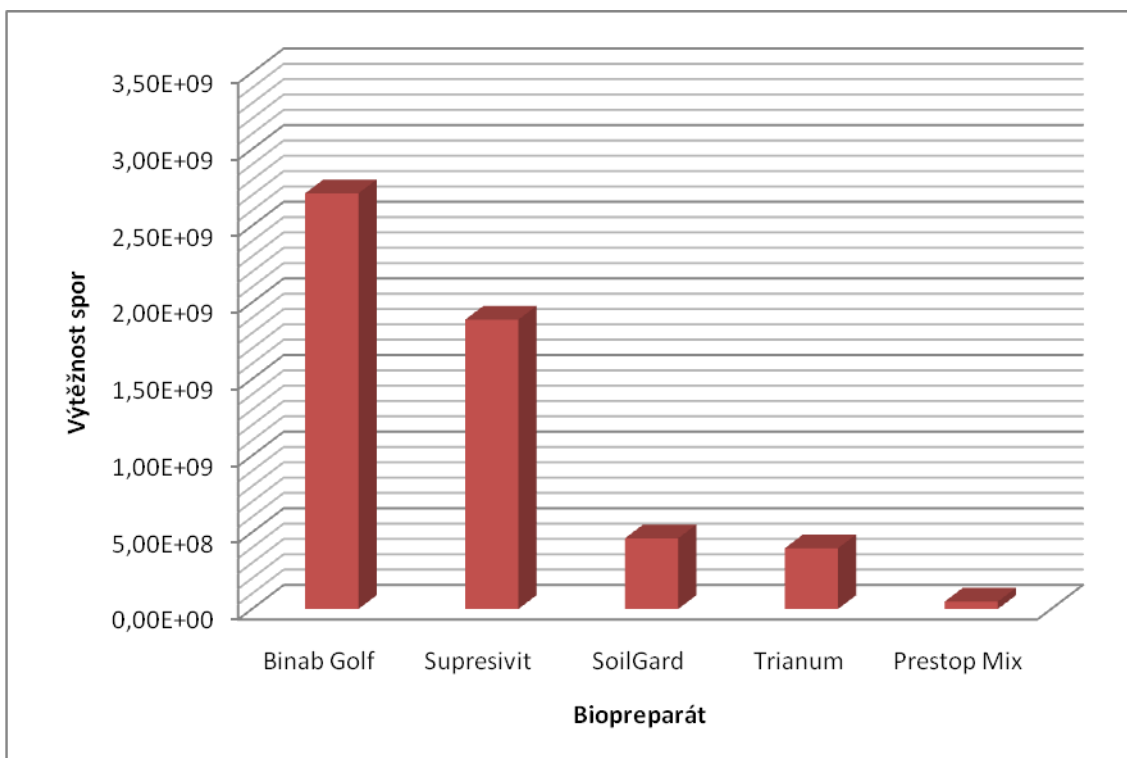
Biopreparát	Kontrola	<i>S. sclerotiorum</i>
Binab Golf	8,94E+08	2,71E+09
Supresivit	2,89E+09	1,89E+09
SoilGard	4,08E+08	4,61E+08
Trianum	8,97E+08	3,96E+08
Prestop mix	4,42E+07	4,82E+07

Závěr: Největší produkci spor 2,89E+09 vykazovala mykoparazitická houba *T. harzianum* přípravku Supresivit. Houby rodu *Trichoderma* u přípravků Trianum a Binab Golf vykazovaly produkci nižší (8,97E+08 Trianum resp. 8,94E+08 Binab Golf). Přibližně o řád nižší produkci spor vykazovala houba *T. virens* přípravku SoilGard v porovnání s přípravkem Supresivit. *Clonostachys rosea f. catenulata* produkovala jen 4,42E+07 spor na jednu středovou kulturu.

Graf č.5: Produkce spor mykoparazitických hub izolovaných z vybraných komerčních biopreparátů (kontrolní varianty)



Graf č.6: Vliv fytopatogenní houby *S. sclerotiorum* na produkci spor mykoparazitických hub z vybraných komerčních biopreparátů.



Závěr: Po vzájemné interakci se *S. sclerotiorum* byla zaznamenána nejvyšší produkce spor hub rodu *Trichoderma* u biopreparátu Binab Golf (2,71E+09) a Supresivit (1,89E+09). Houba *T. virens* přípravku SoilGard a houba *T. harzianum* přípravku Trianum dosáhla výtěžnosti 4,61E+08 resp. 3,96E+08. Prestop Mix vykázal výtěžnosti pouze 4,82E+07 spor na 1 středovou kulturu.

4.1.2. Interakce s fytopatogenní houbou *Rhizoctonia solani*

Základní údaje o pokusu:

- Suspenze konidií kmenů izolovaných z biopreparátů o standartním titru $1,00 \times 10^6$ spor v 1ml.
- Inokulace mykoparazita na okraj Petriho misky a umístění bločku patogena *R. solani* na protější stranu (6 opakování) + kontrolní varianta.
- Inkubace testů v termostatu při 20 °C.
- Hodnocení provedeno po 7 dnech, hodnocena byla zóna dotyku, zóna mykoparazitismu, ověřování parazitace mycelia houby *R. solani* v interakci s mykoparazity a stanovení produkce spor mykoparazitů.

A) Zóna dotyku a zóna mykoparazitismu

Tabulka č.5: Průměrná zóna dotyku a zóna mykoparazitismu všech biopreparátů s *R. solani* [mm].

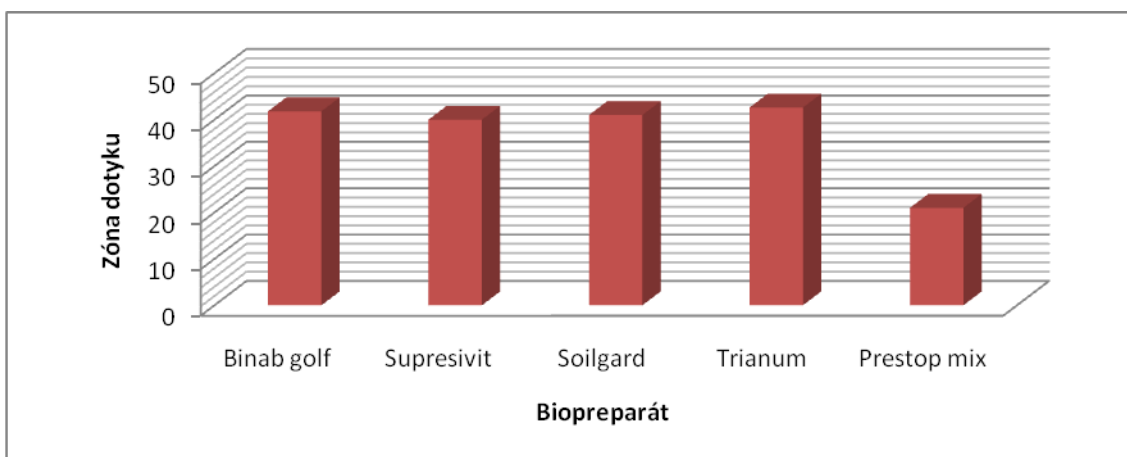
Biopreparát	Zóna dotyku	Zóna mykoparazitismu
<i>R. solani</i>	41,50 ± 0,00	-
Binab Golf	41,80 ± 1,94	35,6 ± 1,02
Supresivit	40,00 ± 0,63	16,6 ± 2,14
SoilGard	41,00 ± 1,10	22,4 ± 1,96
Trianum	42,60 ± 0,49	13,8 ± 2,79
Prestop mix	21,00 ± 0,63	0

Závěr: V kontrolní variantě došlo k dotyku obou kultur *R. solani* uprostřed Petriho misky. U všech variant byla zaznamenána téměř stejná zóna dotyku. Houby rodu *Trichoderma*

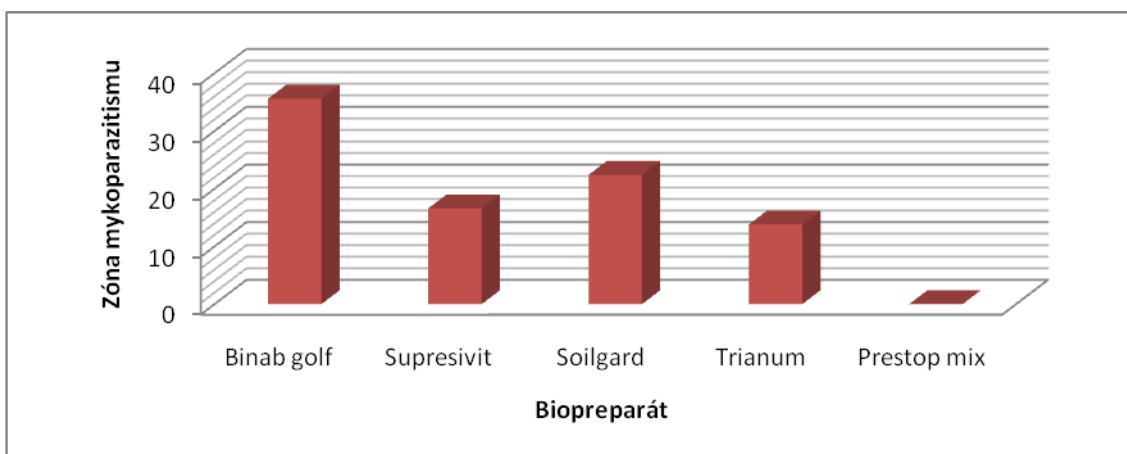
všech přípravků se střetly s fytopatogenní houbou *R. solani* ve vzdálenosti 40 až 42,60 mm od okraje Petriho misky. Houba *C. rosea f. catenulata* vytvořila kulturu o průměru 21 mm, tento průměr je roven zóně dotyku s *R. solani*.

Nejširší mykoparazitická zóna 35,60 mm byla zaznamenána v interakci s *R. solani* u biopreparátu Binab Golf. Houba *T. virens* biopreparátu SoilGard vytvořila mykoparazitickou zónu o 13 mm užší. Kmen *T. harzianum* biopreparátu Supresivit přerůstala kulturu *R. solani* v délce 16,60 mm a kmen *T. harzianum* biopreparátu Trianum pouze 13,80 mm. Prestop Mix vykázal zcela nulovou schopnost mykoparazitace patogena *R. solani*.

Graf č.7: Průměrná zóna dotyku všech biopreparátů s *R. solani* [mm].



Graf č.8: Průměrná zóna mykoparazitismu všech biopreparátů s *R. solani* [mm].



B) Ověřování parazitace mycelia houby *R. solani*

Tabulka č.6: Parazitace v malých Petriho miskách s *R. solani*.

Biopreparát	Počet vyříznutých terčků	Počet parazit. terčků
<i>R. solani</i>	2	0
Binab Golf	1	1
Supresivit	2	1
SoilGard	2	2
Trianium	2	1
Prestop mix	2	0

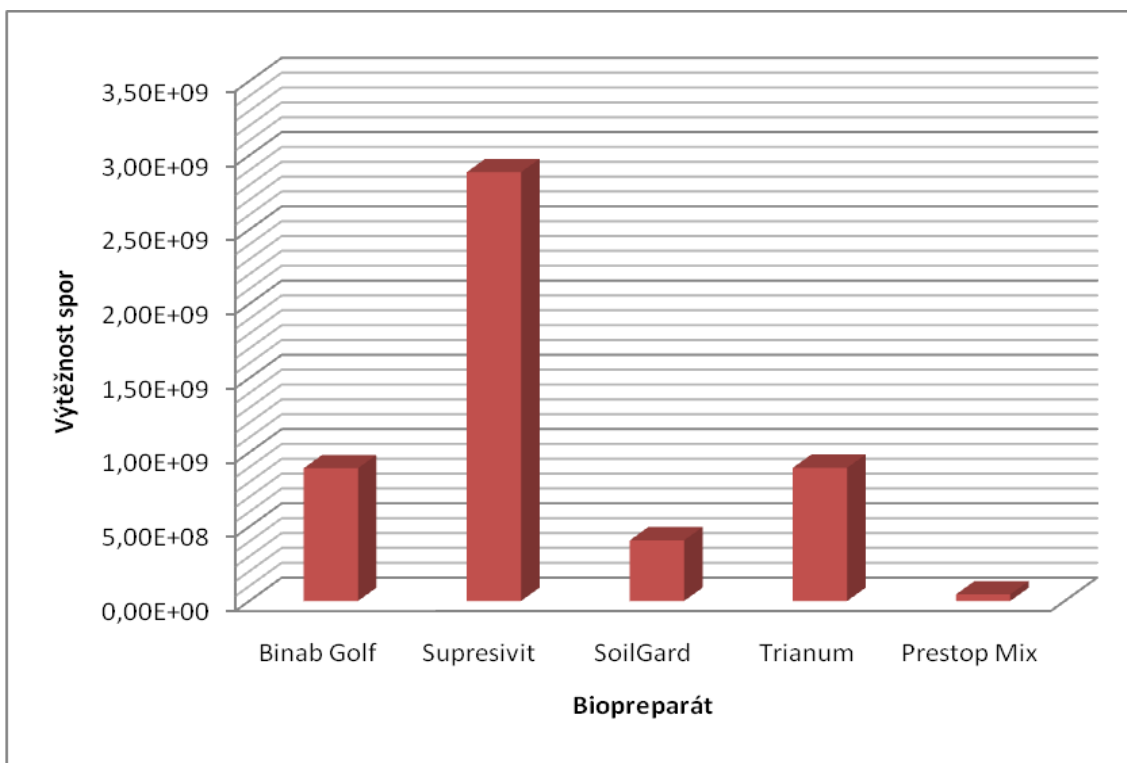
Závěr: Po interakčních testech byly z jednotlivých variant vyříznuty terčky, které byly umístěny na povrch živné půdy PDA v malých Petriho miskách. Z každé varianty byly vyříznuty 2 terčky, jeden před a druhý za terčkem patogena *R. solani*. Po 7 dnech byla sledována parazitace terčků. Nejlepší účinnosti byla zaznamenána u přípravku SoilGard, kde byly oba terčky parazitovány houbou *T. virens*. U ostatních variant byl vždy parazitován první terčík. Houba *C. rosea f. catenulata* nebyla zaznamenána na terčku *R. solani*, proto nedošlo k vytvoření čisté kultury mykoparazita.

C) Výtěžnost spor mykoparazitických hub

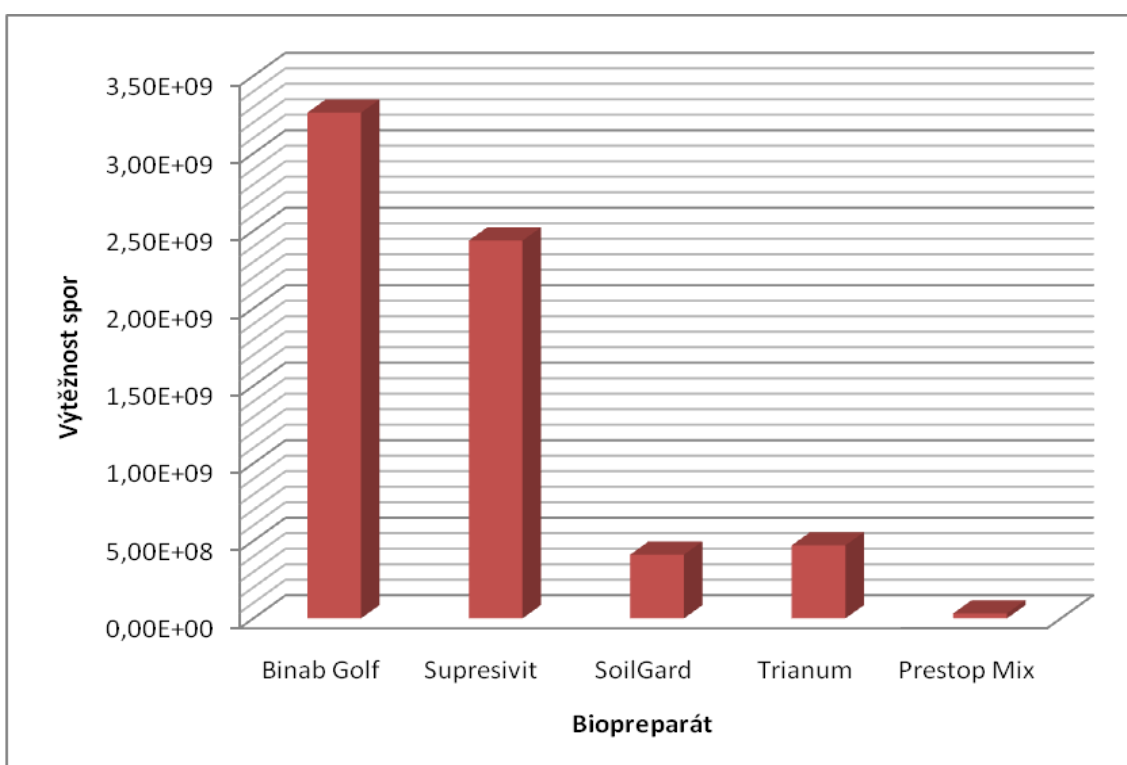
Tabulka č.7: Produkce spor na 1 kulturu mykoparazitických hub izolovaných z komerčních biopreparátů po vzájemné interakci s fytopatogenními houbami *R. solani* a *S. sclerotiorum*.

Biopreparát	Kontrola	<i>R. solani</i>
Binab Golf	8,94E+08	3,26E+09
Supresivit	2,89E+09	2,44E+09
SoilGard	4,08E+08	4,11E+08
Trianium	8,97E+08	4,71E+08
Prestop mix	4,42E+07	3,22E+07

Graf č.9: Produkce spor mykoparazitických hub izolovaných z vybraných komerčních biopreparátů (kontrolní varianty)



Graf č.10: Vliv fytopatogenní houby *R. solani* na produkci spor mykoparazitických hub z vybraných komerčních biopreparátů.

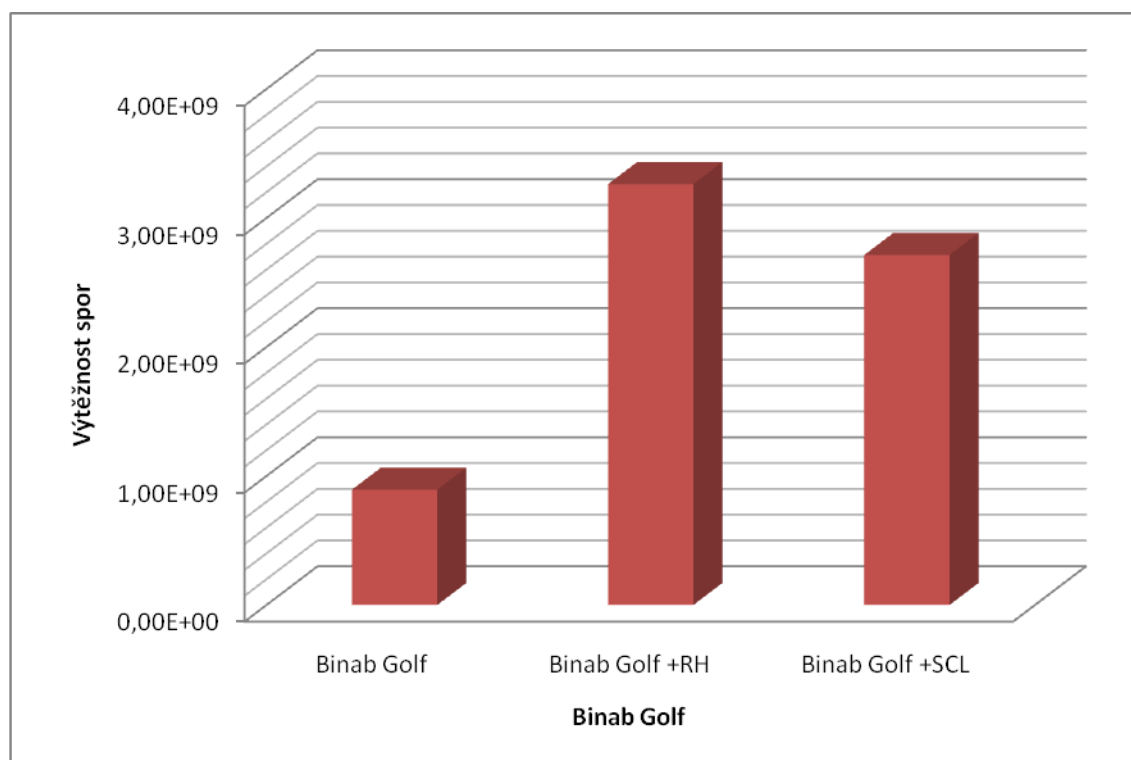


Závěr: (kontrolní varianta je shodná s pokusem se *S. sclerotiorum*) Největší produkci spor 2,89E+09 vykazovala mykoparazitická houba *T. harzianum* přípravku Supresivit. Houby rodu *Trichoderma* u přípravků Trianum a Binab Golf vykazovaly produkci nižší (8,97E+08 Trianum resp. 8,94E+08 Binab Golf). Přibližně o řád nižší produkci spor vykazovala houba *T. virens* přípravku SoilGard v porovnání s přípravkem Supresivit. *Clonostachys rosea f. catenulata* produkovala jen 4,42E+07 spor na jednu středovou kulturu.

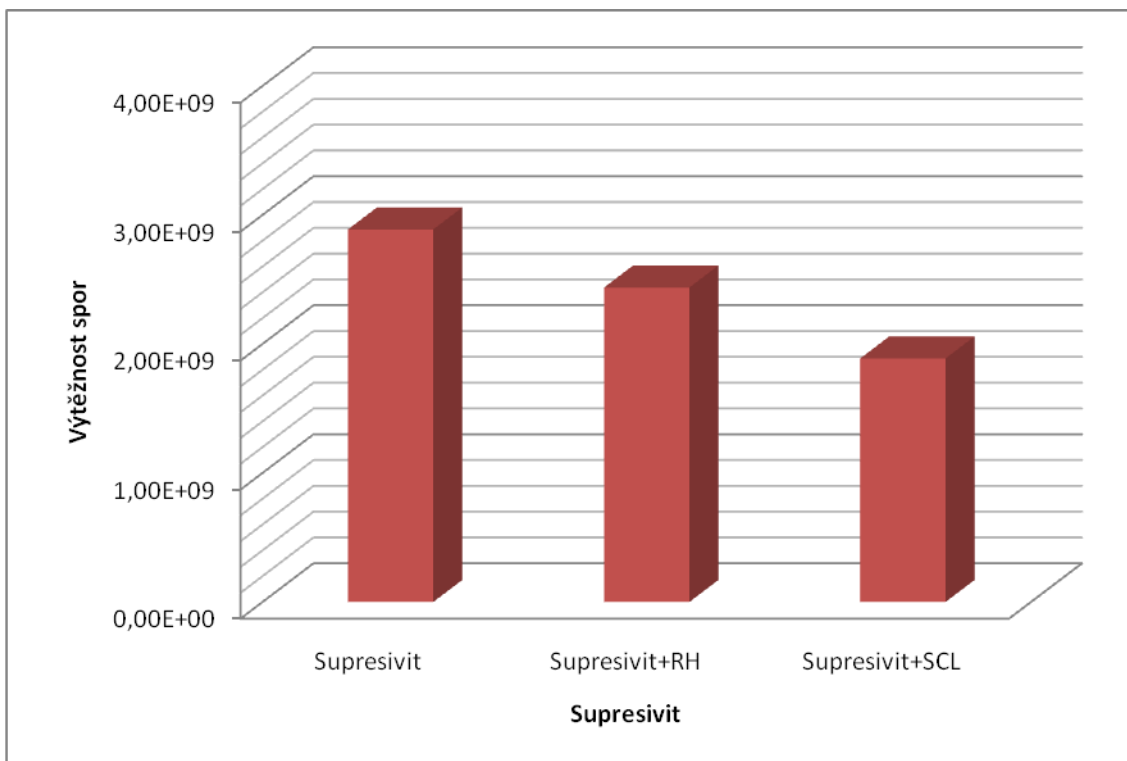
Po vzájemné interakci s *R. solani* vykázaly nejvyšší produkci spor houby rodu *Trichoderma* u biopreparátu Binab Golf (3,26E+09) a biopreparátu Supresivit (2,44E+09). Mnohem menší produkce spor na jednu kulturu byla zaznamenána u houby *T. virens* (SoilGard) a *T. harzianum* (Trianum). Varianta Prestop Mix opět vykázala nejhorší produkci spor.

4.1.3. Porovnání výtěžností spor mykoparazitických hub po vzájemné interakci s fytopatogenní houbou *S. sclerotiorum* a *R. solani*

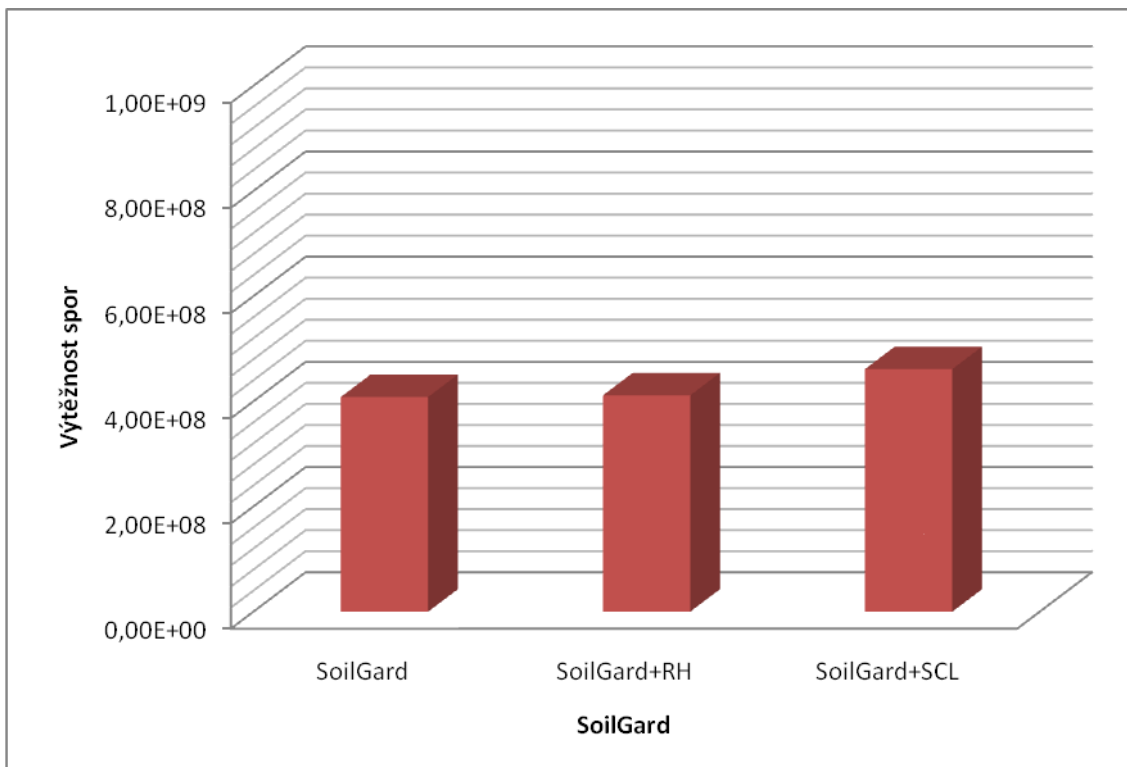
Graf č.11: Vliv patogena *R. solani* a *S. sclerotiorum* na produkci spor mykoparazitické houby *Trichoderma harzianum* kmen ATTC 20476 a *Trichoderma polysporum* kmen ATTC 20475 inkorporovaného do biopreparátu Binab Golf.



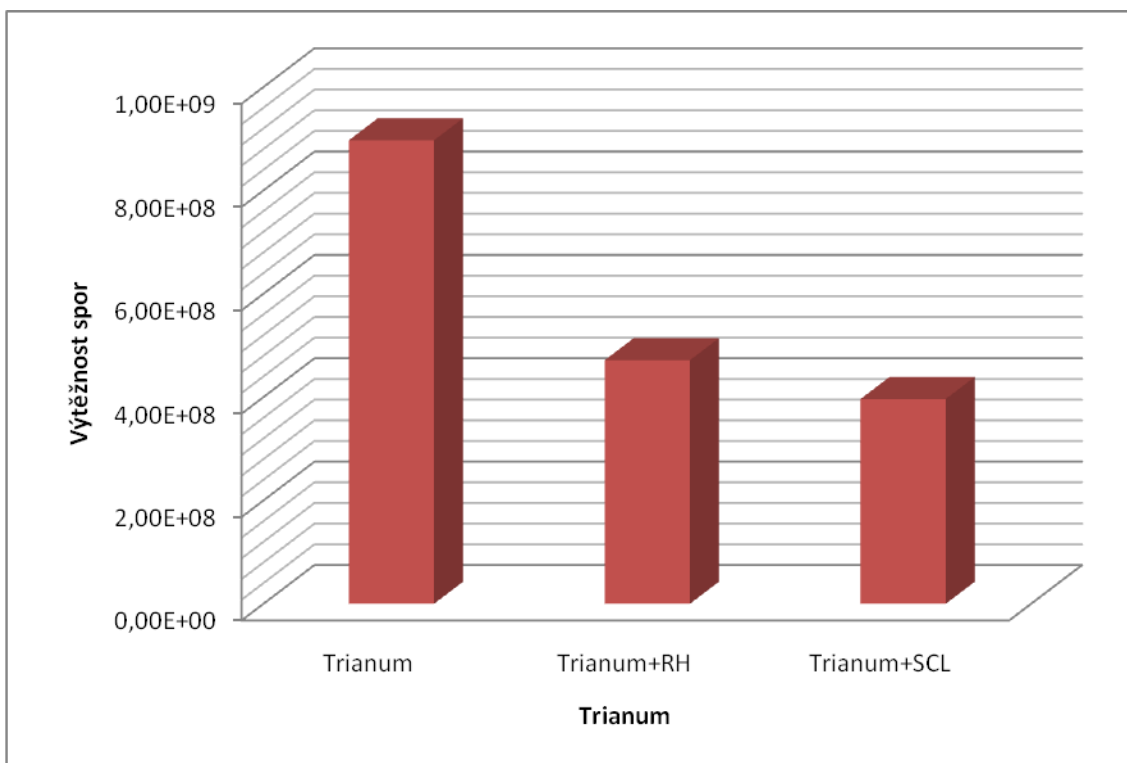
Graf č.12: Vliv patogena *R. solani* a *S. sclerotiorum* na produkci spor mykoparazitické houby *Trichoderma harzianum* kmen PV 5736-89 inkorporovaného do biopreparátu Supresivit.



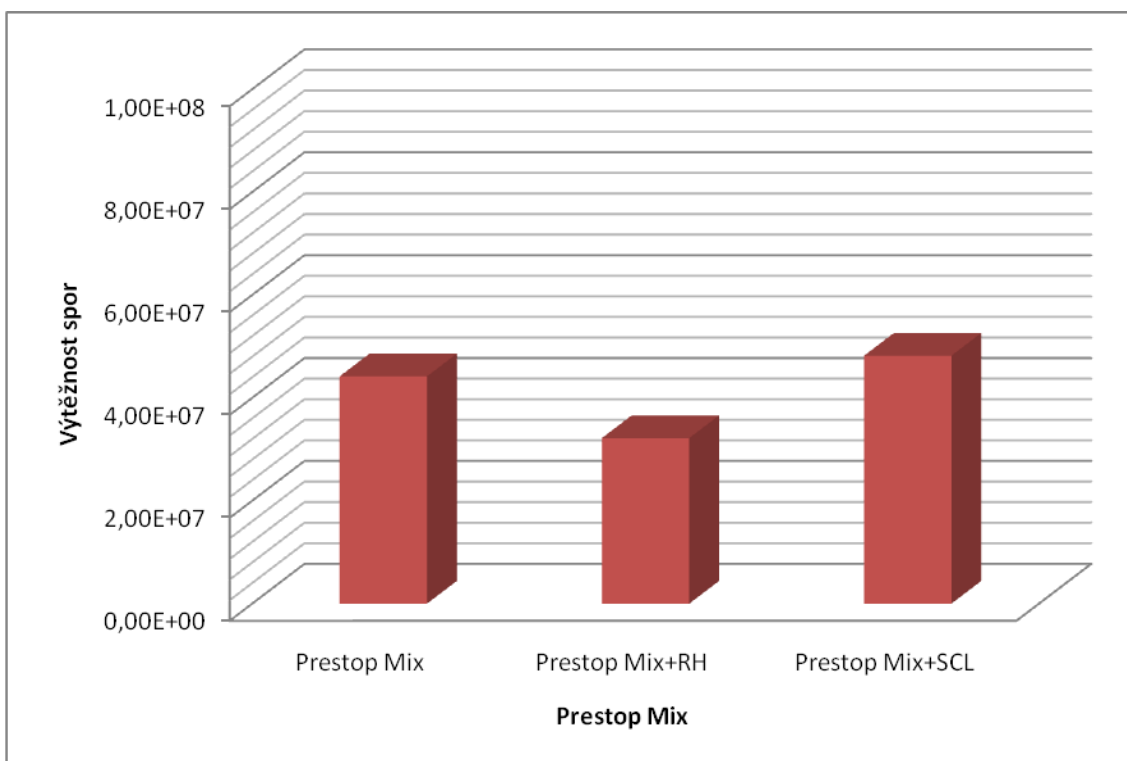
Graf č.13: Vliv patogena *R. solani* a *S. sclerotiorum* na produkci spor mykoparazitické houby *Trichoderma virens* kmen GL-21 inkorporovaného do biopreparátu SoilGard.



Graf č.14: Vliv patogena *R. solani* a *S. sclerotiorum* na produkci spor mykoparazitické houby *Trichoderma harzianum* kmen T-22 inkorporovaného do biopreparátu Trianum.



Graf č.15: Vliv patogena *R. solani* a *S. sclerotiorum* na produkci spor mykoparazitické houby *Clonostachys rosea f. catenulata* kmen J1446 inkorporovaného do biopreparátu Prestop Mix.



Závěr: U některých biopreparátů byla zaznamenána vyšší produkce spor ve variantě, kde byly jednotlivé kmeny v interakci s patogenem se *S. sclerotiorum* resp. s *R. solani*. Příkladem můžeme uvést přípravek Prestop Mix, kde nejvyšší produkci spor prokázal kmen houby *C. rosea* f. *catenulata* v kombinaci se *S. sclerotiorum*. U přípravku Binab Golf byla zaznamenána nejvyšší produkce spor hub rodu *Trichoderma* v interakci s fytopatogenní houbou *R. solani*. U přípravku Trianum a Supresivit byla nejvyšší produkce spor kmenů *T. harzianum* u kontrolní varianty. Houba *T. virens* v přípravku SoilGard produkovala skoro téměř stejné množství spor ve všech variantách.

4.2. Hodnocení účinnosti kmenů hub rodu *Trichoderma* a izolovaných z půd Jihočeského regionu

4.2.1. Interakce s fytopatogenní houbou *Sclerotinia sclerotiorum*

Základní údaje o pokusu:

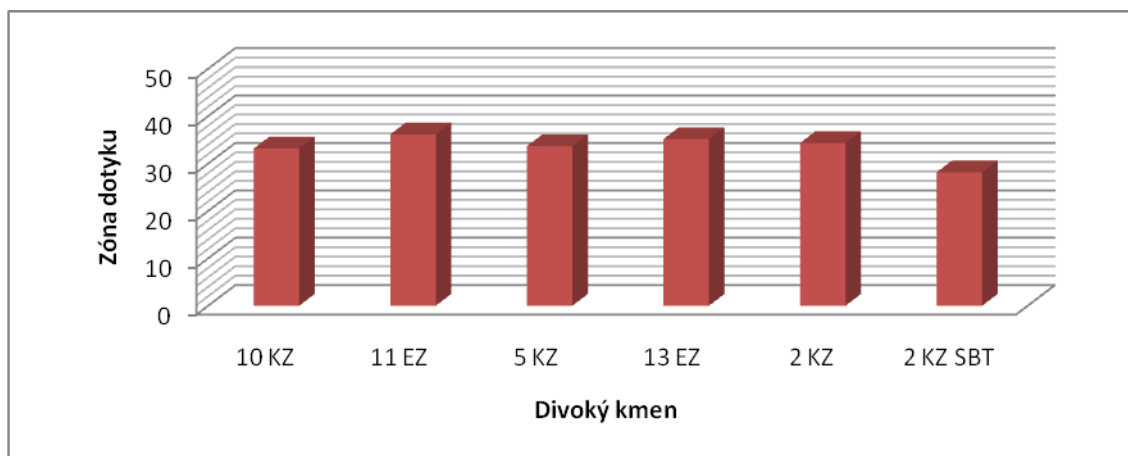
- Suspenze konidií divokých kmenů izolovaných z půdy Jihočeského regionu o standardním titru $1,00 \times 10^6$ spor v 1 ml.
- Inokulace mykoparazita na okraj Petriho misky a umístění bločku patogena *S. Sclerotiorum* na protější stranu (6 opakování) + kontrolní varianta.
- Inkubace testů v termostatu při 20 °C.
- Hodnocení provedeno po 7 dnech, hodnocena byla zóna dotyku, zóna mykoparazitismu, produkce sklerocií včetně zaznamenání jejich hmotnosti, ověřování parazitace vyvinutých sklerocií v interakci s mykoparazity a stanovení produkce spor spor mykoparazitů.

A) Zóna dotyku a zóna mykoparazitismu

Tabulka č.8: Průměrná zóna dotyku a zóna mykoparazitismu všech divokých kmenů se *S. sclerotiorum* [mm].

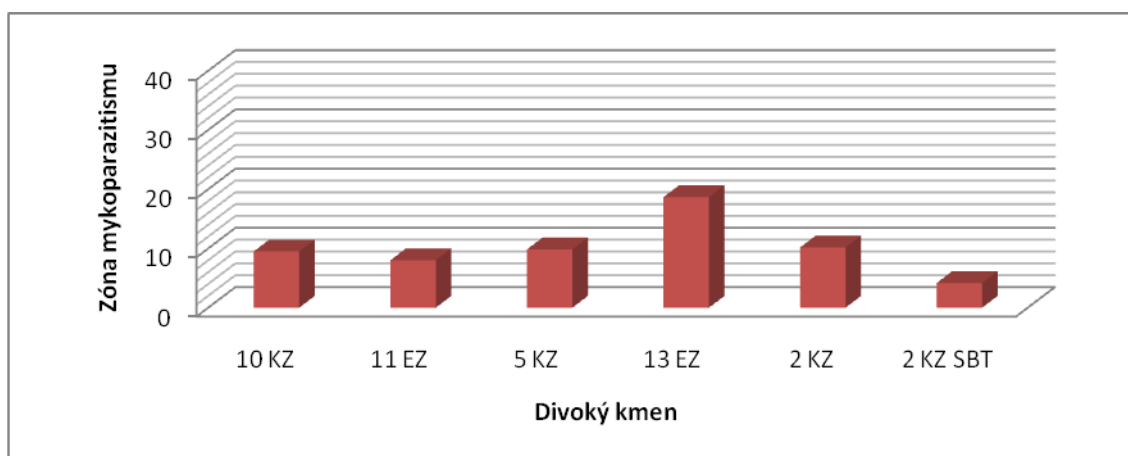
Divoký kmen	Zóna dotyku	Zóna mykoparazitismu
<i>S. sclerotiorum</i>	41,50 ± 0,00	-
10 KZ	33,17 ± 2,19	9,50 ± 0,96
11 EZ	36,17 ± 1,46	8,00 ± 1,00
5 KZ	33,67 ± 3,04	9,83 ± 1,95
13 EZ	35,17 ± 1,77	18,67 ± 3,68
2 KZ	34,33 ± 1,25	10,17 ± 2,11
2 KZ SBT	28,17 ± 2,19	4,17 ± 0,90

Graf č.16: Průměrná zóna dotyku všech divokých kmenů se *S. sclerotiorum* [mm].



Závěr: Zóna dotyku u divokých kmenů ve vztahu k *S. sclerotiorum* se příliš nelišila. Zóna dotyku patogenní houby *S. sclerotiorum* s divokým kmenem 2 KZ SBT byla zaznamenána ve vzdálenosti 28,17 mm od kraje Petriho misky (měřeno od kraje misky, kde byla aplikována mykoparazitická houba). Ostatní kmeny vykazovaly ve srovnání s kmenem 2 KZ SBT rychlejší růst, kdy ke střetu mykoparazita a patogena docházelo ve vzdálenosti v rozmezí od 33,17 od 36,17 mm okraje misky.

Graf č.17: Průměrná zóna mykoparazitismu všech divokých kmenů se *S. sclerotiorum* [mm].



Závěr: Velmi slušná schopnost parazitovat mycelium *S. sclerotiorum* byla zjištěna u kmene 13 EZ, kde mykoparazitická zóna dosahovala 18,67 mm. Kmeny 10 KZ, 11 EZ, 5 KZ, 2 KZ měly mykoparazitickou zónu kolem 10,00 mm. Nejmenší schopnost parazitovat mycelium *S. sclerotiorum* vykazoval kmen 2 KZ SBT, kde byla utvořena zóna pouze 4,17 mm.

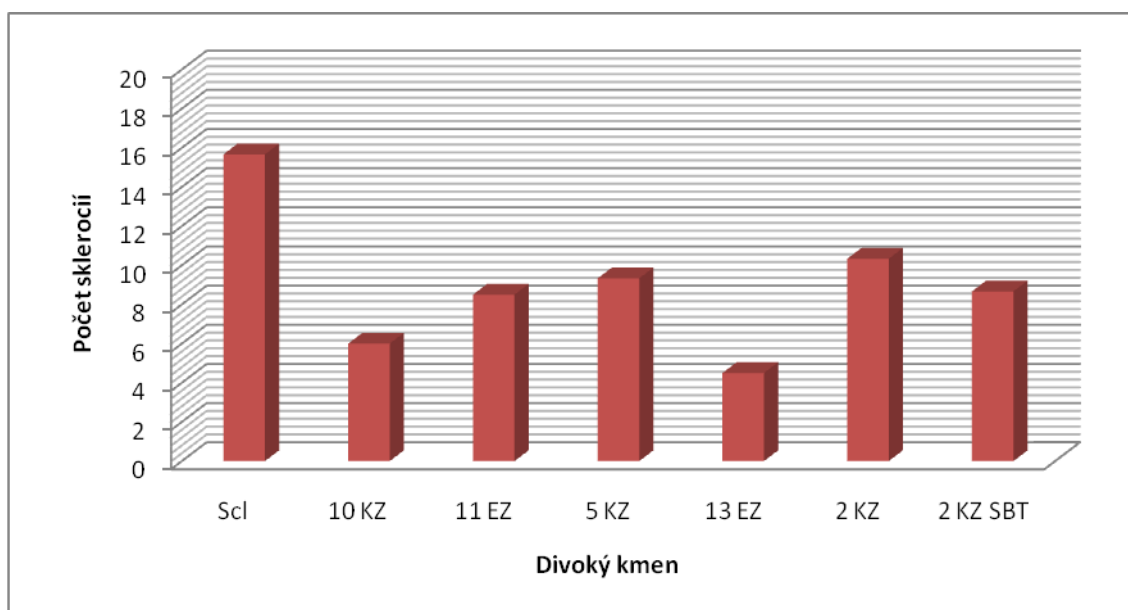
B) Počet a hmotnost sklerocií

Tabulka č.9: Průměrný počet sklerocií a průměrná hmotnost 1 sklerocia [mg] v 1 Petriho misce.

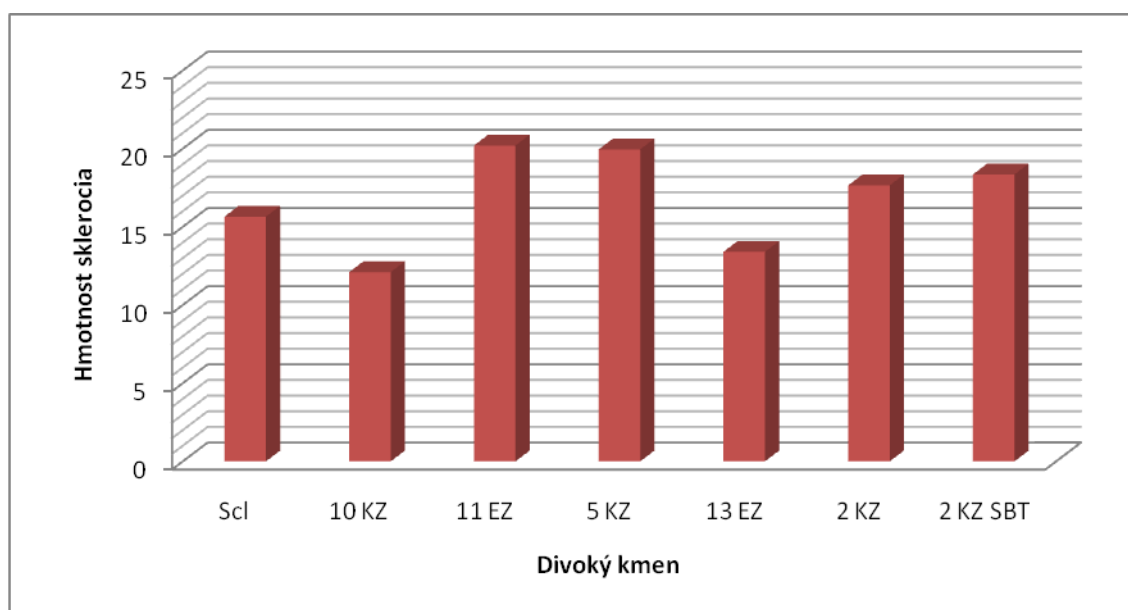
Divoký kmen	Počet	Hmotnost
<i>S. sclerotiorum</i>	15,67 ± 2,13	15,65 ± 0,85
10 KZ	6,00 ± 1,53	12,10 ± 2,00
11 EZ	8,50 ± 1,61	20,20 ± 0,80
5 KZ	9,33 ± 2,43	19,95 ± 2,05
13 EZ	4,50 ± 0,76	13,40 ± 1,50
2 KZ	10,33 ± 2,13	17,65 ± 6,45
2 KZ SBT	8,67 ± 1,37	18,35 ± 0,65

Závěr: V kontrolní variantě vytvořila houba *S. sclerotiorum* v průměru 16 sklerocií. Nejlepším divokým kmenem byl kmen 13 EZ, který z velké části potlačil vývoj sklerocií. V této variantě bylo vytvořeno v průměru pouze 4,5 sklerocií na 1 Petriho misku. Obdobný výsledek byl zaznamenán u kmene 10 KZ, kde v interakci mykoparazit-patogen byla zaznamenána opět nízká tvorba sklerocií (6,00 sklerocií v 1 Petriho misce). Tyto 2 kmeny nejen potlačily tvorbu sklerocií, ale i sklerocia, která byla vytvořena, byla v porovnání s ostatními variantami menší (váha sklerocia 12,10 mg u 10 KZ a 13,40 mg u 13 EZ). Ostatní testované kmeny inhibovaly tvorbu sklerocií méně. Počet vyvinutých sklerocií se pohyboval v rozmezí v průměru od 8,50 do 10,33 kusů. Největší sklerocia byla vytvořena v interakci *S. sclerotiorum* s kmenem 11 EZ (průměrná váha 1 sklerocia byla přibližně 20 mg).

Graf č.18: Průměrný počet sklerocií v 1 Petriho misce.



Graf č.19: Průměrná hmotnost 1 sklerocia v 1 Petriho misce [mg].



C) Ověření parazitace sklerocií *S. sclerotiorum*

Tabulka č.10: Parazitace, průměrný počet sklerocií a průměrné hmotnosti [mg] v malých Petriho miskách se *S. sclerotiorum*.

Divoký kmen	Počet sklerocií	Počet parazit. Sklerocií	Počet nové generace sklerocií	Průměrná hmotnost
<i>S. sclerotiorum</i>	-		15,00 ± 2,16	11,17 ± 0,90
10 KZ	4	2	17,00 ± 2,00	9,80 ± 2,30
11 EZ	4	2	18,00 ± 2,00	7,30 ± 0,40
5 KZ	5	1	15,50 ± 3,20	9,33 ± 1,60
13 EZ	2	2	0	0
2 KZ	4	4	0	0
2 KZ SBT	3	3	0	0

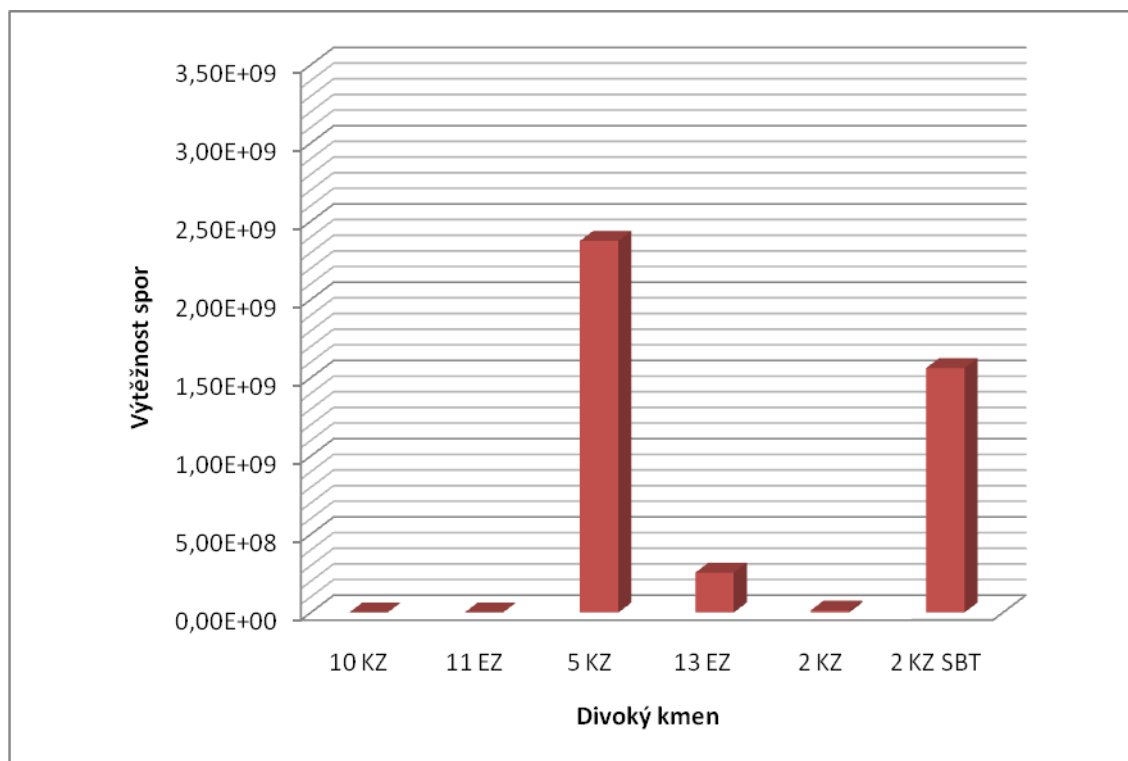
Závěr: Po interakčních testech byla z jednotlivých variant odebrána sklerocia a jednotlivě umístěna na povrch živné půdy PDA v malých Petriho miskách. Po 7 dnech byla sledována parazitace. Nejlepší účinnosti byla zaznamenána u kmene 2 KZ, 13 EZ a kmene 2 KZ SBT, kde byla všechna odebraná sklerocia parazitována a na všech Petriho miskách se vytvořily čisté kultury kmenů. Nejmenší schopnost parazitace sklerocií *S. sclerotiorum* byla zaznamenána u kmene 5 KZ.

D) Výtěžnost spor mykoparazitických hub rodu *Trichoderma*

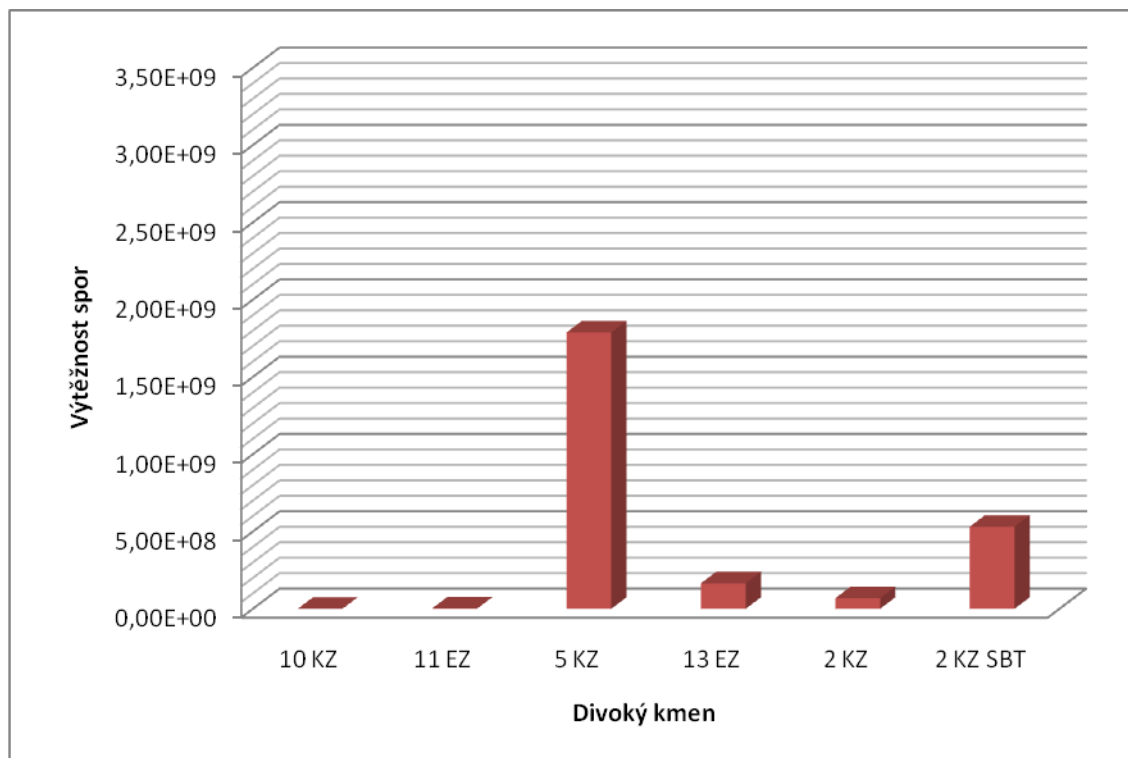
Tabulka č.11: Produkce spor na 1 kulturu mykoparazitických hub z divokých kmenů po vzájemné interakci s fytopatogenní houbou *S. sclerotiorum*.

Divoký kmen	Kontrola	<i>S. sclerotiorum</i>
10 KZ	0,00E+00	0,00E+00
11 EZ	0,00E+00	2,00E+06
5 KZ	2,38E+09	1,79E+09
13 EZ	2,55E+08	1,65E+08
2 KZ	1,38E+07	6,88E+07
2 KZ SBT	1,56E+09	5,31E+08

Graf č.20: Produkce spor mykoparazitických hub z divokých kmenů (kontrola).



Graf č.21: Vliv fytopatogenní houby *S. sclerotiorum* na produkci spor mykoparazitických hub z vybraných divokých kmenů.



Závěr: V kontrolní variantě vykázal největší produkci spor kmen 5 KZ (2,38E+09) a kmen 2 KZ SBT (1,56E+09). Kmen 13 EZ vykázal téměř o jeden řád nižší produkci spor na jednu kulturu (2,55E+08). Kmen 2 KZ vykázal nejnižší produkci spor (1,38E+07). U kmenů 10 KZ a 11 EZ nemohla být výtěžnost stanovena z důvodu velmi nízké produkce.

V interakci s fytopatogenní houbou *S.sclerotiorum* dosáhl nejvyšší výtěžnosti spor opět kmen 5 KZ (1,79E+09) a druhý nejproduktivnější kmen byl opět kmen 2 KZ SBT (5,31E+08). Kmen 13 EZ produkoval také řádově 10^8 spor na jednu kulturu. Divoké kmeny 2 KZ a 11 EZ produkovaly velmi nízký počet spor. U kmene 10 KZ nebylo možné opět spočítat množství vyprodukovaných spor.

4.2.2. Interakce s fytopatogenní houbou *Rhizoctonia solani*

Základní údaje o pokusu:

- Suspenze konidií divokých kmenů izolovaných z půdy Jihočeského regionu o standardním titru $1,00 \times 10^6$ spor v 1 ml
- Inokulace mykoparazita na okraj Petriho misky a umístění bločku patogena *R. solani* na protější stranu (6 opakování) + kontrolní varianta.

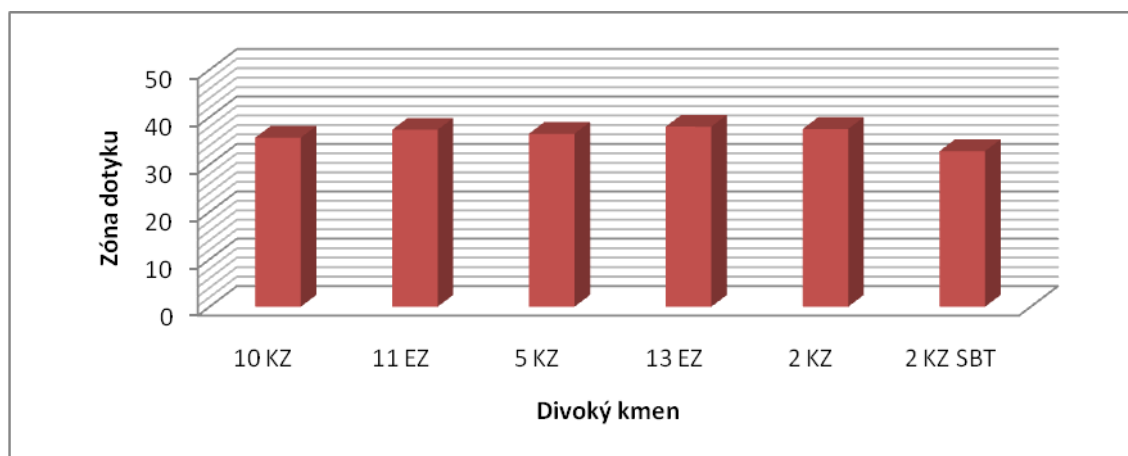
- Inkubace testů v termostatu při 20 °C.
- Hodnocení provedeno po 7 dnech, hodnocena byla zóna dotyku, zóna mykoparazitismu, ověřování parazitace mycelia houby *R. solani* v interakci s mykoparazity a stanovení produkce spor spor mykoparazitů.

A) Zóna dotyku a zóna mykoparazitismu

Tabulka č.12: Průměrná zóna dotyku a zóna mykoparazitismu všech divokých kmenů s *R.solani* [mm].

Divoký kmen	Zóna dotyku	Zóna mykoparazitismu
<i>R. solani</i>	41,50 ± 0,00	-
10 KZ	35,67 ± 0,94	38,17 ± 1,34
11 EZ	37,33 ± 1,49	35,00 ± 2,38
5 KZ	36,50 ± 1,50	32,33 ± 1,60
13 EZ	38,00 ± 1,29	27,50 ± 2,43
2 KZ	37,50 ± 1,61	38,33 ± 2,75
2 KZ SBT	32,83 ± 1,57	49,50 ± 1,89

Graf č.22: Průměrná zóna dotyku všech divokých kmenů s *R.solani* [mm].



Závěr: V kontrolní variantě došlo k dotyku obou kultur *R. solani* uprostřed Petriho misky (41,50 mm). U všech variant byla zaznamenána téměř stejná zóna dotyku. Divoké kmeny hub rodu *Trichoderma* vytvořily zónu dotyku přibližně ve stejné vzdálenosti od okraje Petriho misky. Zóna dotyku u divokých kmenů byla zaznamenána ve vzdálenosti od 32 mm do 38

mm. Ve srovnání s kontrolní variantou byla zóna dotyku u všech divokých kmenů kratší.

B) Ověření parazitace terčků *R. solani*

Tabulka č.13: Parazitace v malých Petriho miskách s *R. solani*.

Divoký kmen	Celkový počet vyříznutých terčků	Počet infikovaných ze všech vyříznutých
<i>R. solani</i>	2	2
10 KZ	2	1
11 EZ	2	2
5 KZ	2	2
13 EZ	2	2
2 KZ	2	2
2 KZ SBT	2	2

Závěr: Po interakčních testech byly z jednotlivých variant vyříznuty terčíky, které byly umístěny na povrch živné půdy PDA v malých Petriho miskách. Z každé varianty byly vyříznuty 2 terčíky, jeden před a druhý za terčíkem původně umístěného patogena *R. solani*. Po 7 dnech byla sledována parazitace terčků. U všech divokých kmenů byla zaznamenána parazitace mycelia na terčcích *R. solani*. Pouze u kmene 10 KZ byla zaznamenána parazitace jen jednoho z terčků.

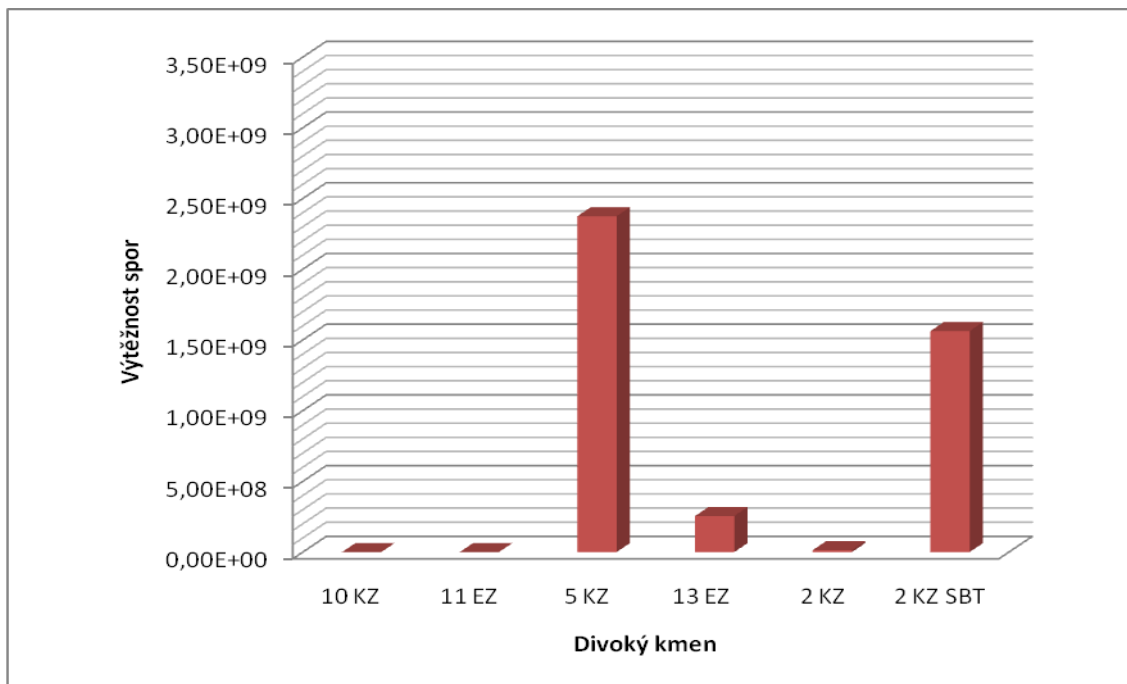
C) Výtěžnost spor mykoparazitických hub rodu *Trichoderma*

Tabulka č.14: Produkce spor na 1 kulturu mykoparazitických hub z divokých kmenů po vzájemné interakci s fytopatogenními houbami *R. solani*.

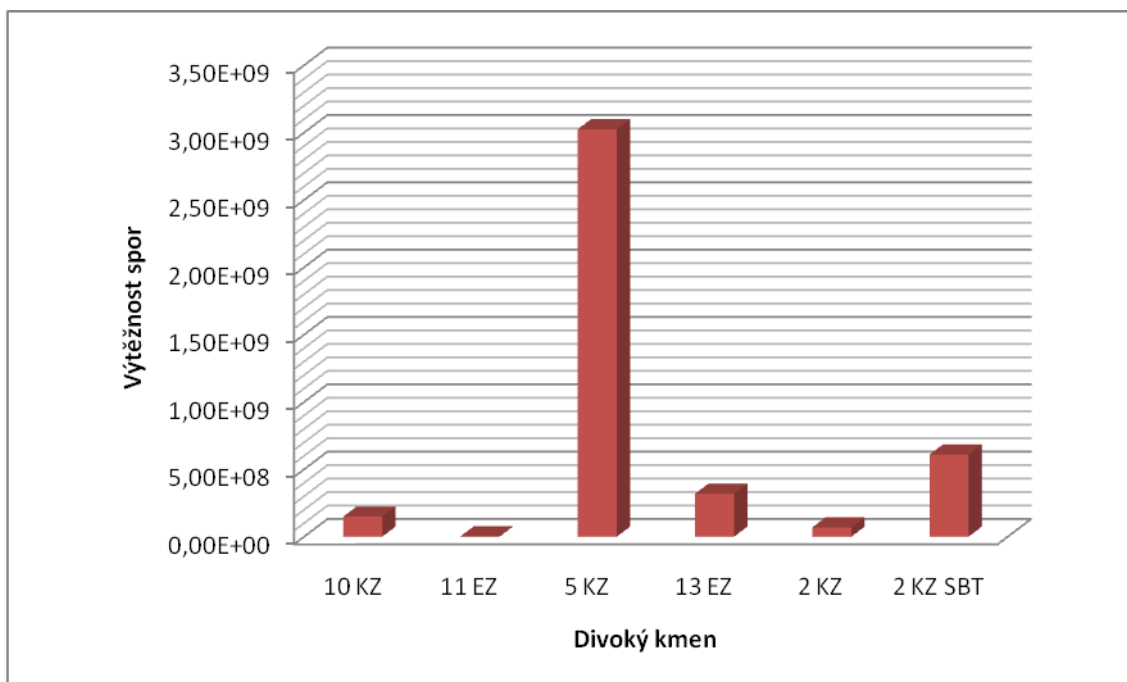
Divoký kmen	Kontrola	<i>R. solani</i>
10 KZ	0,00E+00	1,49E+08
11 EZ	0,00E+00	2,25E+06
5 KZ	2,38E+09	3,03E+09
13 EZ	2,55E+08	3,19E+08
2 KZ	1,38E+07	6,88E+07
2 KZ SBT	1,56E+09	6,10E+08

Závěr: V kontrole měly nejvyšší výtěžnost spor kmeny 5 KZ a 2 KZ SBT (2,38E+09 a 1,56E+09). Kmen 13 EZ vykazoal pouze 2,55E+08 spor na 1 kulturu. Ostatní kmeny produkovaly výrazně nižší počet spor. U kmenů 10 KZ a 11 EZ nemohla být produkce spor zaznamenána.

Graf č.23: Produkce spor mykoparazitických hub z divokých kmenů (kontrola).



Graf č.24: Vliv fytopatogenní houby *R.solani* na produkci spor mykoparazitických hub z vybraných divokých kmenů.



Závěr: V kombinaci *R.solani* s kmenem 5 KZ dosáhla výtěžnost hodnotu 3,03E+09 spor na 1 kulturu. Menší produkci spor vykazovaly kmene 2 KZ SBT (6,10E+08), 13 EZ (3,19E+08) a 10 EZ (1,49E+08). Nejmenší produkce byla zjištěna u kmene 11EZ.

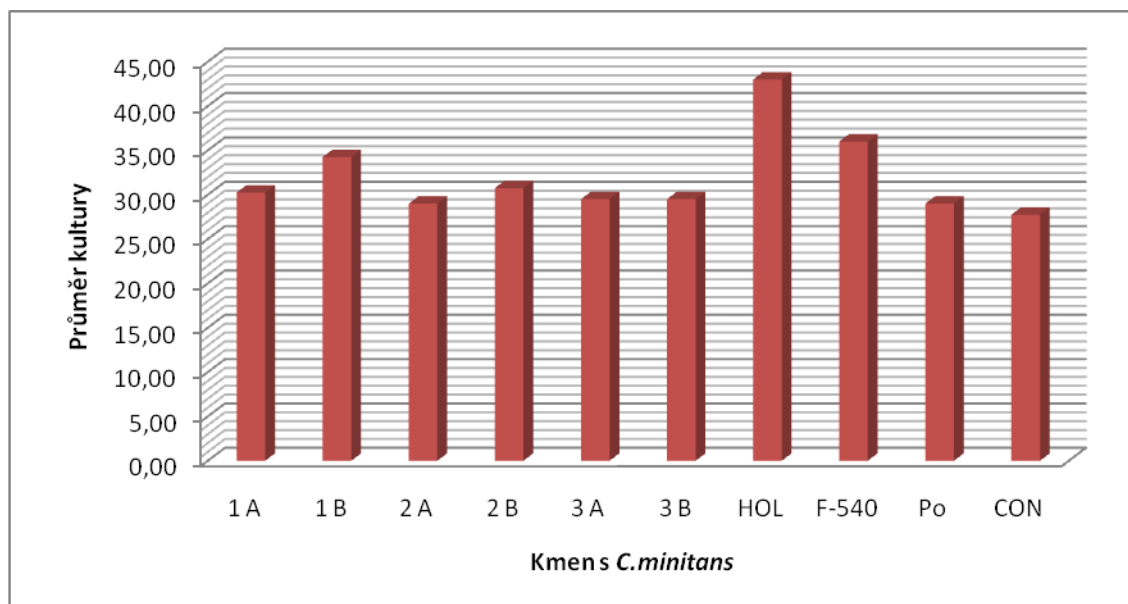
4.3. Hodnocení účinnosti kmenů houby *Coniothyrium minitans*

Základní údaje o pokusu:

- Suspenze pykno spor kmenů *C. minitans* o standartním titru $1,00 \times 10^6$ spor v 1ml.
- Inokulace kmene *C. minitans* na okraj Petriho misky 3 dny před umístěním bločku patogena *S. Sclerotiorum* na protější stranu (6 opakování) + kontrolní varianta.
- Inkubace testů v termostatu při 20°C.
- Hodnocení provedeno po 7 dnech od dodání fytopatogenní houby *S. sclerotiorum* na PDA tj. 10 dní od inokulace kmenů *C. minitans* na PDA, hodnocen byl radiální růst kultur, produkce sklerocií včetně zaznamenání jejich hmotnosti a stanovení produkce pykno spor *C. minitans*.

A) Průměr kultury kmenů *C. minitans*

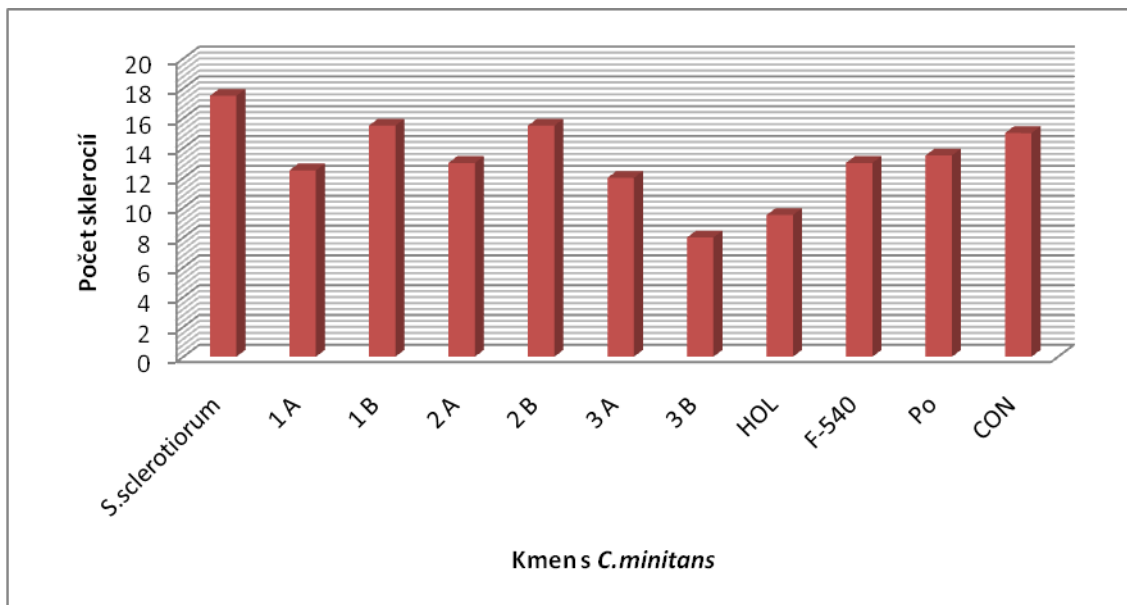
Graf č.25: Radiální růst kmenů s *Coniothyrium minitans* [mm].



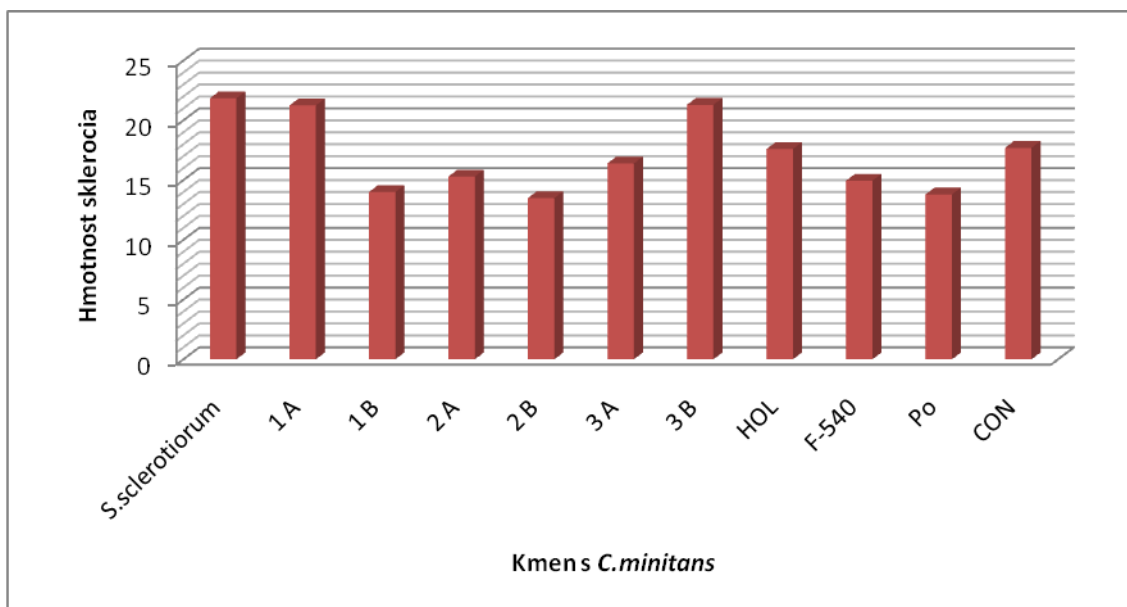
Závěr: Největší průměr kultury houby *C. minitans* vytvořil kmen Hol, kde kultura dosahovala průměru kolem 44 mm. Kmen F-540 vytvořil kulturu o průměru 36 mm. Ostatní kmeny tvořily kultury přibližně stejné. Průměr kultur u těchto kmenů se pohyboval od 23 do 34 mm.

B) Počet a hmotnost sklerocií

Graf č.26: Průměrný počet sklerocií v 1 Petriho misce.



Graf č.27: Průměrná hmotnost 1 sklerocia v 1 Petriho misce [mg].



Tabulka č.15: Průměrný počet sklerocií a průměrná hmotnost 1 sklerocia [mg] v 1

Petriho misce.

Kmen s <i>C.minitans</i>	Počet	Hmotnost
<i>S.sclerotiorum</i>	17,50 ± 0,50	21,85 ± 0,75
1 A	12,50 ± 0,50	21,25 ± 2,55
1 B	15,50 ± 0,50	14,00 ± 2,30
2 A	13,00 ± 0,00	15,30 ± 0,00
2 B	15,50 ± 1,50	13,50 ± 0,70
3 A	12,00 ± 2,00	16,40 ± 3,30
3 B	8,00 ± 0,00	21,30 ± 0,00
HOL	9,50 ± 0,50	17,60 ± 2,30
F-540	13,00 ± 0,00	14,95 ± 0,85
Po	13,50 ± 0,50	13,80 ± 0,10
Contans	15,00 ± 1,00	17,70 ± 0,80

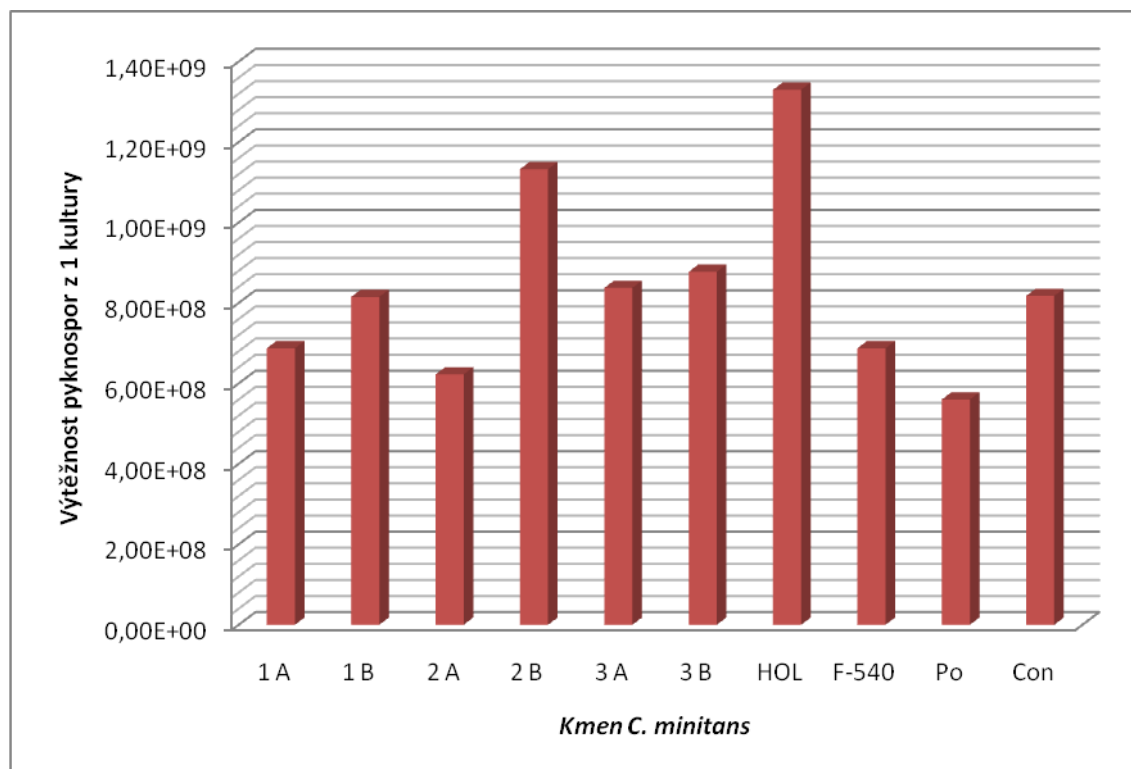
Závěr: Ze studie je patrné, že byl zaznamenán rozdíl ve tvorbě sklerocií fytopatogenní houby *S. sclerotiorum*. Největší supresi tvorby sklerocií vykazoval kmen 3 B izolovaný z mrkve a kmen Holandsko získaný ze sbírky CBS, Holandsko. Kmen 3 B snížil tvorbu sklerocií o 10 kusů a kmen Holandsko o 8 kusů v porovnání s kontrolní variantou, kde fytopatogenní houba *S. sclerotiorum* vytvořila v průměru 17,5 sklerocií na 1 Petriho misku. V interakci s ostatními kmeny vytvořila fytopatogenní houba v rozmezí od 13 do 16 sklerocií. Největší sklerocia byla zaznamenána v interakci s kmenem 3 B a 1 A. Sklerocia, která byla vytvořena v blízkosti kultury *C. minitans* byla tímto mykoparazitem parazitována. Na povrchu sklerocií byla zaznamenána tvorba pyknid.

C) Výťažnosť pyknošpor houby *C. minitans*

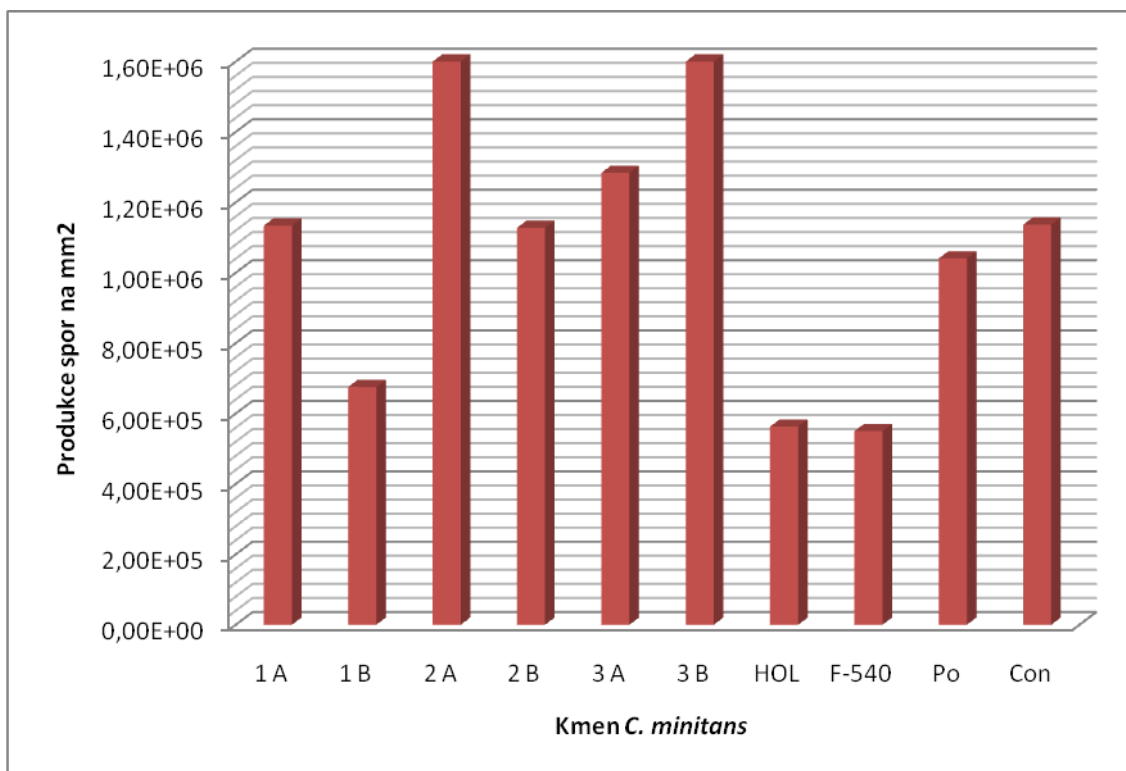
Tabulka č.16: Výtěžnost pykno spor vybraných kmenů mykoparazitické houby *C. minitans*

Kmen s <i>C. minitans</i>	Výtěžnost
1 A	6,88E+08
1 B	8,15E+08
2 A	6,23E+08
2 B	1,13E+09
3 A	8,38E+08
3 B	8,78E+08
HOL	1,33E+09
F-540	6,88E+08
Po	5,60E+08
Con	8,18E+08

Graf č.28: Hodnocení produkce spor na 1 kulturu.



Graf č.29: Hodnocení produkce spor na 1 mm² kultury.



Závěr: Z výsledků je patrné, že největší produkce pyknospor na 1 mm² byl zaznamenán opět u kmene 3B a u kmene 1A. Produkované množství dosahovalo hodnotu 1,60E+06 spor. Nejnižší produkce spor na 1mm² byl zaznamenán u kmene ze sbírky z Holandska a u českého sbírkového kmene F-540. Z ostatních kmenů vykazoval nejnižší produkci pyknospor kmen 1A.

4.4. Hodnocení produkce spor vybraných kmenů hub rodu *Trichoderma* kultivovaných na umělé živné půdě PDA a na přirozeném substrátu

Základní údaje o pokusu:

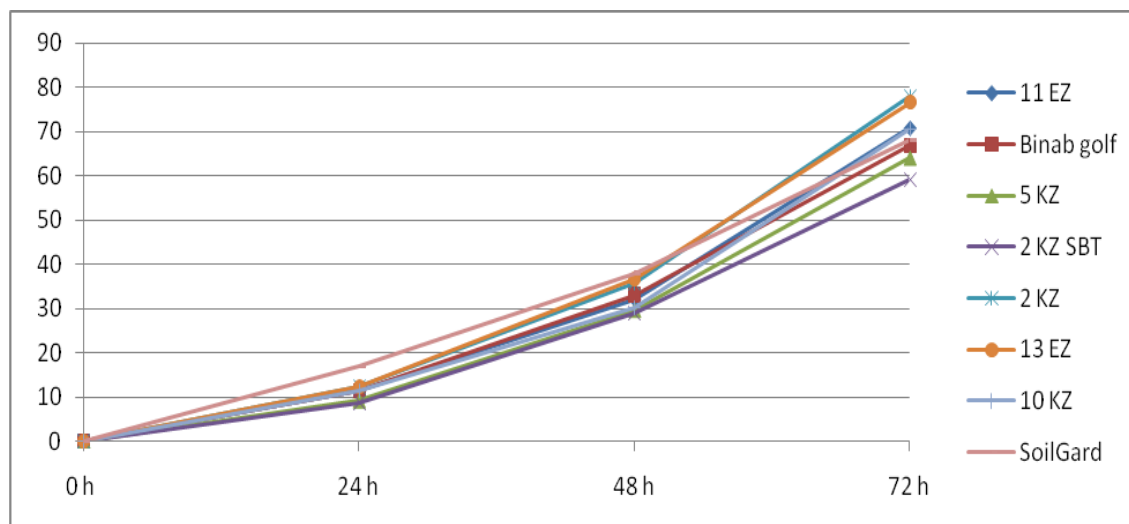
- Suspenze konidií kmenů hub rodu *Trichoderma* o standardním titru $1,00 \times 10^6$ v 1ml.
- Inokulace mykoparazita na střed Petriho misky
- Inkubace kmenů na PDA v termostatu při 20°C, kultivace kmenů na přirozeném substrátě po dobu 4 dnů při 25°C.
- Hodnocení středových kultur při ve 24 hodinových intervalech, produkce spor po 7 a 16 dnech. Produkce spor na přirozeném substrátu hodnocena po 4 dnech.

A) Radiální růst a výtěžnost hub rodu *Trichoderma* na živné půdě PDA

Tabulka č.17: Radiální růst hub rodu *Trichoderma* na umělé živné půdě PDA (kontinuální měření kultur kmenů po 24 hodinách [cm]).

Kmen	24 hod	48 hod	72 hod	96 hod
11 EZ	1,15 ± 0,07	3,20 ± 0,08	7,07 ± 0,13	8,3
Binab Golf	1,14 ± 0,12	3,31 ± 0,10	6,69 ± 0,19	8,3
5 KZ	0,91 ± 0,07	2,96 ± 0,10	6,41 ± 0,03	8,3
2 KZ SBT	0,87 ± 0,09	2,90 ± 0,17	5,92 ± 0,12	8,3
2 KZ	1,22 ± 0,06	3,56 ± 0,17	7,78 ± 0,09	8,3
13 EZ	1,22 ± 0,06	3,66 ± 0,13	7,65 ± 0,16	8,3
10 KZ	1,13 ± 0,05	3,03 ± 0,14	7,06 ± 0,09	8,3
SoilGard	1,69 ± 0,08	3,80 ± 0,09	6,80 ± 0,11	8,3

Graf č.30: Radiální růst vybraných kmenů hub rodu *Trichoderma*



Závěr: Největší rychlost růstu středových kultur po 24 i 48 hodinách byly zaznamenány u kmene z biopreparátu SoilGard. Po 72 hodinách tento kmen výrazně zpomalil růst v porovnání s ostatními kmeny hub rodu *Trichoderma*. Kmen 2 KZ byl ve srovnání s kmene GL-21 biopreparátu SoilGard pomaleji rostoucí (24 a 48 hodin), nicméně po 72 hodinách tento kmen vykázal výrazně rychlejší růst, kolonie dosahovala po 72 hodinách

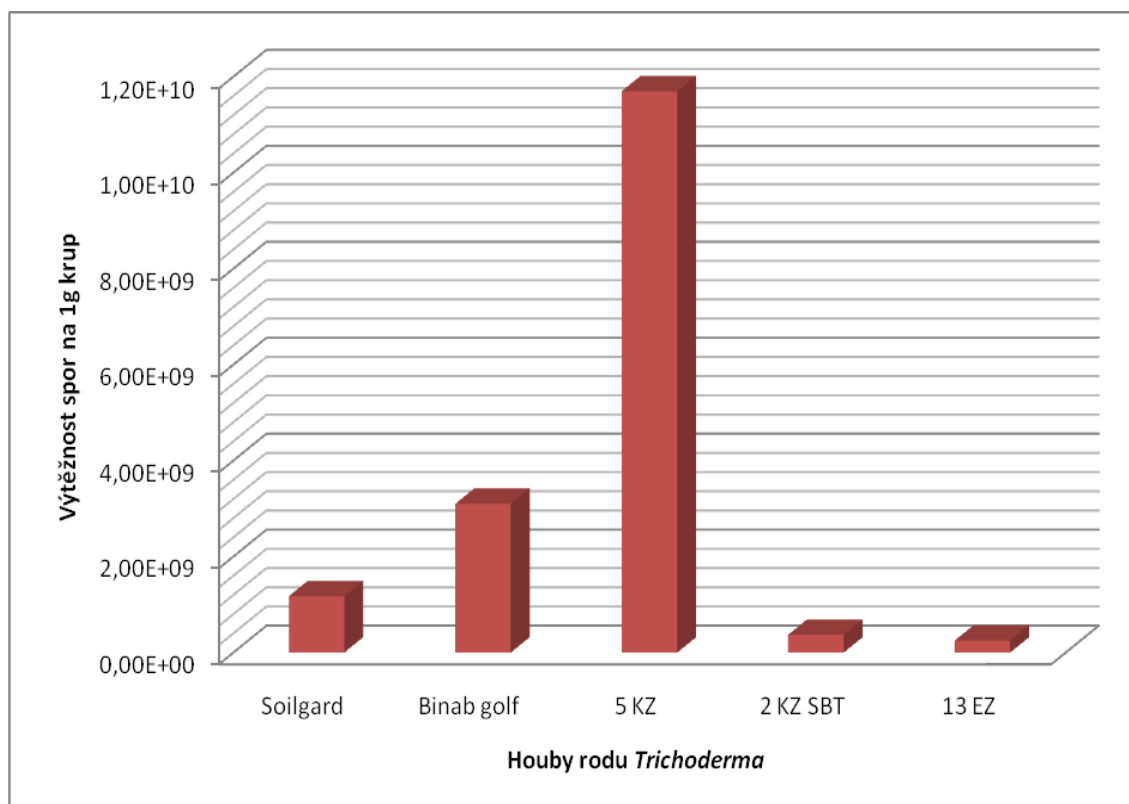
v průměru 7,78 cm.

B) Výtěžnost hub rodu *Trichoderma* na přirozeném substrátu

Tabulka č.18: Produkce spor vybraných kmenů mykoparazitických hub rodu *Trichoderma* na přirozeném substrátu (kroupy 100 g; kultivace 4 dny; 25 ± 1 °C).

Biopreparát/kmen	Výtěžnost spor na 1 kg krup
SoilGard	1,18E+09
Binab Golf	3,10E+09
5 KZ	1,17E+10
2 KZ SBT	3,73E+08
13 EZ	2,50E+08

Graf č.31: Hodnocení produkce spor vybraných kmenů hub rodu *Trichoderma* na 1g přirozeného substrátu.



Závěr: Největší produkci spor na 1 g přirozeného substrátu vykázal divoký kmen 5 KZ

(1,17E+10). Kmeny z komerčních biopreparátů produkovaly daleko menší množství spor. Houba *T. virens* biopreparátu SoilGard vyprodukovala 1,18E+09 v 1 g krup, houby rodu *Trichoderma* v přípravku Binab Golf vyprodukovaly celkem 3,10E+09 spor na 1g substrátu.

5. Diskuze a závěry

Cílem této diplomové práce bylo poznání a získání co největšího množství informací o vzájemné interakci mykoparazitických hub v interakci s vybranými původci onemocnění rostlin, včetně využití hub v biologické ochraně rostlin. V provedených pokusech byly sledovány parametry jednotlivých kmenů mykoparazitických hub:

- rychlost růstu a osidlování prostoru na umělé živné půdě v interakci s patogeny rostlin (zóna dotyku)
- schopnost parazitovat kolonii fytopatogenní houby na umělé živné půdě (zóna mykoparazitismu)
- schopnost inhibovat tvorbu a vývoj sklerocií na umělé živné půdě
- schopnost sporulace na umělé živné půdě
- ověření parazitace sklerocií resp. terčíků patogena na umělé živné půdě
- hodnocení radiálního růstu ve 24 hodinových intervalech středových kultur
- výtěžnosti spor na 1 g přirozeného substrátu

Celkové zhodnocení biopreparátů:

Základním a obecným předpokladem pro praktické využití hub v biologické ochraně proti fytopatogenním houbám je schopnost mykoparazita se rychle rozrůstat v prostředí po aplikaci a zároveň mít co nejvyšší mykoparazitickou účinnost. Na základě výsledků z diplomové práce lze konstatovat, že komerční biopreparáty vykazovaly o něco málo rychlejší kolonizaci Petriho misky ve vzájemné interakci s *R. solani* než v interakci se *S. sclerotiorum*. Všechny testované kmeny komerčních biopreparátů nevytvořily antagonistickou zónu s původci onemocnění rostlin. Ve všech variantách interakčních testů došlo ke střetu mycelií obou druhů hub, a tím bylo možné zaznamenat rozdílné zóny dotyku mezi testovanými kmeny. Ve všech variantách byla sledována i zóna mykoparazitismu, která je z hlediska účinnosti biopreparátů důležitým kritériem. Nejlepší mykoparazitickou schopnost v kombinaci se *S. sclerotiorum* prokázala houba *T. virens* biopreparátu SoilGard. V interakci s patogenem *R. solani* vykázal nejlepší účinnost v potlačení tohoto patogena přípravek Binab Golf.

Dalším významným ukazatelem z hlediska praktického využití v biologické ochraně rostlin je schopnost kmenů komerčních biopreparátů co nejvíce potlačit vývoj sklerocií u *S. sclerotiorum*. Mykoparazitické houby parazitují sklerocia a jsou schopny napadená sklerocia degradovat. Pokud je sklerocium parazitované na jaře nemůže docházet k tvorbě pohlavních plodnic apotecii na sklerociu nebo nemůže docházet k regeneraci mycelia ze sklerocií *S. sclerotiorum*. Houby rodu *Trichoderma* z komerčních biopreparátů Binab Golf a SoilGard inhibovaly tvorbu a vývoj sklerocií na kultuře *S. sclerotiorum*. Vyvinutá sklerocia na kultuře *S. sclerotiorum* v interkci s houbou *T. virens* biopreparátu SoilGard byla již parazitována. V této variantě se vyvinula nejmenší sklerocia. Ve srovnání s variantou SoilGard byla ve variantě Binab Golf vytvořena větší sklerocia, nicméně tato sklerocia nebyla ještě dostatečně parazitována.

Velmi důležité kritérium, které rovněž nesmí být opomíjeno, je i celková výtěžnost spor. Nejvyšší produkci spor vykazovaly houby rodu *Trichoderma* v přípravku Binab Golf. V porovnání biopreparátů vykazoval vedle varianty Binab Golf největší výtěžnost v interakci s patogenem *S. sclerotiorum* a *R. solani* i přípravek Supresivit. Ostatní přípravky vykazovaly výrazně nižší produkci spor. Za zajímavé lze považovat i to, houby rodu *Trichoderma* biopreparátu Binab Golf vykazovaly daleko větší produkci spor v interakci s patogenem *S. sclerotiorum* i s *R. solani*, než kontrolní variantě, kde byl směsný kmen kultivován samostatně. Kmeny houby *T. harzianum* z přípravku Supresivit a SoilGard produkovaly naopak mnohem větší množství spor v kontrolní variantě, než v interakci se *S. sclerotiorum* a s *R. solani*. Houba *C. rosea f. catenulata* přípravku PrestopMix a *T. virens* ze SoilGard produkovaly v interakci se *S. sclerotiorum* a *R. solani* přibližně stejné množství spor.

Z hlediska významnosti jsou všechny tři kritéria důležitá. Pokud je brán ohled na všechna výše uvedená kritéria, nejlépe vychází varianty Binab Golf a SoilGard. Tyto 2 komerční biopreparáty lze doporučit používat i v praxi v rámci biologické ochrany proti fytopatogenním houbám *S. sclerotiorum* a *R. solani*. Přípravky Supresivit a Trianum vykazaly o něco horší výsledky, nicméně i tyto přípravky lze využít v biologické ochraně rostlin. Biopreparát Prestop Mix vykázal nejhorší výsledky v rámci komerčních biopreparátů. Houba *C. rosea f. catenulata* nevykázala schopnost parazitovat sklerocia resp. mycelium fytopatogenních hub a zároveň nebyla schopna potlačit vývoj sklerocií. Na základě testů lze upřednostnit využívání komerčních biopreparátů založených na kmenech

hub rodu *Trichoderma* vedle tohoto biopreparátu, který je koncipován na úplně odlišném druhu mykoparazitické houby.

Celkové zhodnocení divokých kmenů:

Nejlepší schopnost parazitovat *S. sclerotiorum* byla zjištěna u kmene 13 EZ. Ve vztahu k *R. solani* se zóna mykoparazismu vytvořila pouze v horní části Petriho misky, zatímco v dolní části misky, ve které jsme i mykoparazitickou zónu měřili, se nevytvořila vůbec. Z tohoto ohledu se mykoparazitická schopnost velmi těžko hodnotí.

Divoký kmen 13 EZ byl nejlepší i inhibicí tvorby sklerocií. Kmeny 10 EZ vykazoval také vysokou schopnost eliminovat tvorbu a vývoj sklerocií na kultuře *S. sclerotiorum*. Oba kmeny ovlivnily nejen vývoj a tvorbu sklerocií, ale měly i vliv na velikost vytvořených sklerocií. Sklerocia vytvořená v těchto variantách byla nejmenší na což je vyjádřeno v přepočtu hmotnosti na 1 sklerociu. Ostatní divoké kmeny 2 KZ, 2 KZ SBT, 5 KZ a 11 EZ vytvořily o něco málo sklerocií, než byl dosažen počet sklerocií v kontrolní variantě.

Ve výtěžnosti spor v interakci s *R. solani* dosáhl mimořádných hodnot kmen 5 KZ. Kmen produkoval i největší množství spor v interakci se *S. sclerotiorum*, kde počet spor na 1 kulturu byl přibližně stejný jako v interakci s *R. solani*. Velice dobrou produkční schopnost vykázal i kmen 2 KZ SBT. Ostatní kmeny produkovaly velmi malé množství spor. Kmeny 10 KZ a 11 EZ produkovaly v kontrolní variantě velmi malé množství spor, které nebylo možné pomocí počítačící komůrky vůbec zaznamenat. V interakci se *S. sclerotiorum* a *R. solani* byla schopnost produkovat spóry daleko větší.

Pokud vezmeme v úvahu všechna 3 kritéria, lze říci, že kmen 13 EZ má vysoký potenciál v praktickém využití v biologické ochraně rostlin. V některých parametrech dosáhl daleko lepší výsledky než kmeny z komerčních biopreparátů.

Celkové zhodnocení kmenů s *Coniothyrium minitans*:

Kmen 3B mykoparazitické houby *C. minitans* nejvíce inhiboval tvorbu sklerocií houby *S. sclerotiorum*. I kmen z holandské sbírky mikroorganismů CBS vykazoval schopnost redukovat množství vytvořených sklerocií na kultuře *S. sclerotiorum*. Vytvořená sklerocia v interakci s těmito kmeny byla poměrně velká. Mezi jednotlivými testovanými

kmeny *C. minitans* nebyly velké rozdíly. Platí, že ve variantách, kde bylo vytvořeno méně sklerocií, byla sklerocia největší a naopak, kde bylo vytvořeno více sklerocií, sklerocia byla malá. Ve všech variantách docházelo k parazitaci těch sklerocií, která byla vytvořena v blízkosti kultur kmenů *C. minintas* (tyto data nejsou v diplomové práci uvedena).

Celkové zhodnocení středových kultur:

Největší schopnost kolonizovat povrch PDA v Petriho misce měla kmen GL-21 mykoparazitické houby *T. virens* (SoilGard). Po 24 a 48 hodinách byla rychlost růstu mycelia ve srovnání s ostatními kmeny největší, nicméně po 72 hodinách byl nárůst mycelia pomalejší ve srovnání s dalšími kmeny *Trichoderma*. Naopak u kmene 2 KZ byla zaznamenána nejlepší kolonizace Petriho misky po 72 hodinách. Na přirozeném substrátu vyprodukoval kmen 5 KZ nejvíce spor. Ve srovnání s kmeny komerčních biopreparátů vyprodukoval o řád vyšší množství spor. Z produkčního hlediska lze předpokládat, že tento kmen by měl využití v maloobjemových i velkoobjemových produkcích biopreparátů na bázi vláknitých hub.

6. Seznam literatury

- Alabouvette C., Lemanceau P. (1999): Joint Action of Microbials for Disease Control. *In*: Hall F. R., Menn J. J. (Eds.): Biopesticides – Use and Delivery. *Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, 117-135.*
- Altieri M. A. (1994): Sustainable agriculture. *Encycl. Agric. Sci.*, 4:239–247.
- Arneson P. A. (2001): Plant disease epidemiology. *In*: The Plant Health Instructor: APS, St. Paul, Minnesota.
- Anonym 1 (2009): <http://rl.zf.jcu.cz/vyukove-prezentace/ior> - Evropská směrnice 2009 (on-line 12.10.2010)
- Anonym 2: <http://www.mycobank.org/MycoTaxo.aspx?Link=T&Rec=485118> (on-line 14.4.2011)
- Baker K. F., Cook R. J. (1974): Biological control of plant pathogens. W. H. Freeman, San Francisco. *In*: Howell C. R., Stipanovic R. D. (Eds.), (1995): Mechanism in the biocontrol of *Rhizoctonia solani* – induced cotton seedling disease by *Gliocladium virens*: antibiosis. *Phytopathology*, 85, 469 – 472.
- Bale J. S., van Lenteren J. C., Bigler F. (2008): Biological control and Sustainable Food Production. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 363: 761- 776.
- Barnett H. L., Binder F. L (1973): The fungal host-parasite relationship. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 11:273.
- Benitez T., Rincon A. M., Limon M. C. (2004): Mecanismos de biocontrol de cepas de *Trichoderma*. *Int. Microbiology*, 17(4): 249-260, ISSN 1139-6709.
- Bennett A. J., Leifert C., Whipps J. M. (2003): Survival of the biocontrol agents *Coniothyrium minitans* and *Bacillus subtilis* MBI 600 introduced into pasteurised, sterilised and non-sterile soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 35: 1565-1573.
- Bennett A. J., Leifert C., Whipps J. M. (2006): Survival of *Coniothyrium minitans* associated with sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(1): 164-172.
- Ben-Yephet Y. (1988): Control of sclerotia and apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* by metham-sodium, methyl bromide and soil solarization. *Crop protection*, 7: 25-27.
- Bohatá (2005): Využití entomopatogenních a mykoparazitických hub v ochraně sazenic rychlené zeleniny a okrasných květin. Dizertační práce. *Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita*, 173.
- Boughey A. S. (1982): Fundamental Ecology. Intext Educational Publishers: New York. *In*: Van den Bosch R., Messenger P. S., Gutierrez A. P.: An Introduction to Biological control. *Division of biological control University of California*, 247.

- Budge S. P., McQuilken M. P., Fenlon J. S., Whipps J. M. (1995): Use of *Coniothyrium minitans* and *Gliocladium virens* for biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* in glasshouse lettuce. *Biological control*, 5: 513-522.
- Caron J., Laverdiere L., Thibodeau P. O., Belanger R. R. (2002): Use of an indigenous strain of *Trichoderma harzianum* against five plant pathogens on greenhouse cucumber and tomato in Quebec. *Phytoprotection*, 83 (2): 73-87.
- Cliquet S., Tirilly Y. (2002): Development of a defined medium for *Pythium oligandrum* oospore production. *Biocontrol Science and Technology*, 12 (4): 455-467.
- Couper G. (2001): The biology, epidemiology and control of *Sclerotinia sclerotiorum* on carrots in North East Scotland. *Ph.D. Thesis, University of Aberdeen, Aberdeen, Scotland, UK*.
- Davis R. M. (2004): Carrot diseases and their management. In: Naqvi S. A. M. H. (Ed.): Diseases of Fruits and Vegetables. *Kluwer Academic publishers, The Netherlands, 1: 397-439*.
- Dillard H. R., Hunter J. E. (1986): Association of common ragweed with *Sclerotinia* rot of cabbage in New York state. *Plant disease*, 79: 411-415.
- Doran J. W. (1980): Microbial changes associated with residue management and reduced tillage. *Soil Science Society of America Journal*, 44: 518-524.
- Dubos B. (1987): Fungal antagonism in cereal agrobiocenoses, In Chet I.: Innovative approaches to plant disease control. *The Hebrew university of Jerusalem, Rehovot, Izrael, ISBN 0 471-80962-4*.
- Čača Z. (1990): Ochrana polních a zahradních plodin. *Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 361*.
- Gams W., Bisset J. (1998): Morphology and identification of *Trichoderma*. In: Kubicek Ch. P., Harman E. G. (Eds.) *Trichoderma and Gliocladium basic biology, taxonomy and genetics*. London. 1: 3-33.
- Gerlagh M., Whipps J. M., Budge S. P., Goossen van de Geijn H. M. (1996): Efficiency of isolates of *Coniothyrium minitans* as mycoparasites of *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum* and *Botrytis cinerea* on tomato stem pieces. *European Journal of Plant Pathology*, 10, 787-793.
- Fassatiová O. (1979): Plísňe a vláknité houby v technické mikrobiologii. *SNTL – nakladatelství technické literatury, Praha, 211*.
- Ferraz L. C. L., Café Filho A. C., Nasser L. C. B., Azevedo J. (1999): Effects of soil moisture, organic matter and grass mulching on the carpogenic germination of sclerotia and infection of bean by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant pathology*, 48: 77-82.

- Grazia-Garza J. A., Neumann S., Vyn T. J., Boland G. J. (2002): Influence of crop rotation and tillage on production of apothecia by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24: 137-143.
- Harman G. E., Howell C. R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. (2004): *Nature Reviews Mikrobiology*, 2 (1): 43-56
- He P., Chintamanani, S., Chen Z., Zhu L., Kunkel B. N., Alfano J. R., Tang X., and Zhou J. M. (2004): Activation of a COI1-dependent pathway in *Arabidopsis* by *Pseudomonas syringae* type III effectors and coronatine. *Plant J.*, 37: 589-602.
- Hoog G. S. (2000): <http://www.mycobank.org/MycoTaxo.aspx?Link=T&Rec=485118> (online 28.4.2011)
- Homma Y., Kato Z., Hirayama F., Konno K., Shirahama H., Suzui T. (1989): Production of antibiotics by *Pseudomonas cepacia* as an agent for biological control of soilborne plant pathogens. *Soil Biol. Biochem.* 21:723-728.
- Howell C. R. (1999): Selective isolation from soil and separation in vitro of P and Q strains of *Trichoderma virens* with differential media. *Mycologia*, 91 (6): 930-934.
- Howell C. R., Stipanovic R. D. (1980): Suppression of *Pythium ultimum* induced damping - off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluterin. *Phytopathology*, 70:712-715.
- Howell C. R., Stipanovic R. D., Lumsdem R. D. (1993): Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling diseases. *Biocontrol Science and Technology*, 3 (4): 435-441.
- Hýsek J., Vach M., Javůrek M. (2008): Biologická ochrana obilnin proti houbovým fytopatogenům. Metodika pro praxi. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 22 s.
- Huang H. C., Huang J. W., Snaidon G., Erickson R. S. (1997): Effect of allyl alcohol and fermented agricultural wastes on carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* and colonization by *Trichoderma spp.* *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 43-46.
- Huang H. C., Bremer E., Hynes R. K., Erickson R. S. (2000): Foliar application of fungal biocontrol agents for the control of white mold of dry bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological control*, 18: 270-276.
- Hýsek J., Vach M., Javůrek M. (2008): Biologická ochrana obilnin proti houbovým fytopatogenům. Metodika pro praxi. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 22.
- Chet I., Inbar J., Hadar Y. (1997): Fungal antagonists and mycoparasites. In: Esser K., Lemke P.A. (Eds.): *The Mycota IV—Environmental and Microbial Relationships*. Springer, Verlag Berlin Heidelberg. 165-184.
- Islam T. M., Hashidoko Y., Deora A., Ito T., Tahara S. (2005): Suppression of damping-off disease in host plants by the rhizoplane bacterium *Lysobacter sp.* strain SB-K88 is

- linked to plant colonization and antibiosis against soilborne peronosporomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:3786-3796.
- Jeffries P., Barea J. M. (1994): Biogeochemical cycling and arbuscular mycorrhizas in the sustainability of plant-soil systems. In: Gianinazzi S, Schüepp H (eds): Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems. *Birkhäuser, Basel*, 101–115.
- Jeffries P. (1997): Mycoparasitism. In: Esser K., Lemke P. A. (Eds.): The Mycota IV—Environmental and Microbial Relationships. *Springer, Verlag Berlin Heidelberg*, 149-164.
- Kazda J., Mikulka J., Prokinová E. (2010): Encyklopedie ochrany rostlin, *Profi press s.r.o., Praha*, 399.
- Kennedy A. C., Smith K. L. (1995): Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant Soil*, 170: 75–86.
- Kerr A. (1980): Biological control of crown gall through production of agrocin 84. *Plant Dis.*, 64:25-30.
- Kloepper J. W., Leong J., Teintze M., Schroth M. N. (1980): *Pseudomonas* siderophores: A mechanism explaining disease suppression in soils. *Current Microbiol.*, 4:317-320.
- Kolombet L. V., Jigletsova S. K., Derbyshev V. V., Ezhov D. V., Kosareva N. I., Bystrova E. V. (2001): Studies of mycofungicide, a preparation based on *Trichoderma viride*, for plant infection control. *Applied biochemistry and microbiology*, 37 (1): 98-102.
- Kopřiva J. (1997): Ochrana. *Zahradnictví*, 6: 11.
- Kora C., McDonald M. R., Boland G. J. (2002): First report of foliar and root infection of carrot by *Sclerotinia minor* in Ontario, Canada. *Plant disease*, 86: 1406.
- Kora C., McDonald M. R., Boland G. J. (2008): New Progress in the Integrated Management of Sclerotinia Rot of Carrot. In: Ciancio A., Mukerji K. G. (Eds.): Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria. 13: 243-270.
- Koumoutsis A., Chen X. H., Henne A., Liesegang H., Gabriele H., Franke P., Vater J., Borris R. (2004): Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bact.* 186:1084-1096.
- Kubicek C. P., Eveleigh D. E., Esterbauer H., Steiner W., Kubicek-Pranz E. M. (eds.) (1990): *Trichoderma reesei* cellulases: biodiversity, genetics, physiology and applications. *Royal Society of Chemistry, Cambridge*.
- Kubicek CH. P., Harman G. E. (1998): *Trichoderma* and *Gliocladium*. Basic biology, taxonomy and genetics. 1: 277.

- Lacey L. A., Frutos R., Kaya H. K., Vail P. (2001): Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They have a future?. *Biological control*, 21: 230 – 248.
- Landa Z. (2002): Biologická ochrana zahradních rostlin proti chorobám a škůdcům v polních podmínkách, ve sklenicích a fóliovnících. In: Demo M., Hričovský I. (Eds.): Trvalo udržatelné technologie v záhradnictve. *Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre*, 225-280.
- Leclere V., Bechet M., Adam A., Guez J. S., Wathelet B., Ongena M., Thonart P., Gancel F., Chollet-Imbert M., Jacques P. (2005): Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:4577-4584.
- Lewis K., Whipps J. M., Cooke R. C. (1989): Mechanisms of biological disease control with special reference to the case study of *Pythium oligandrum* as an antagonist. In: Whipps J. M., Lumsden R. D. (Eds.): *Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth*. Cambridge University Press, London, 191.
- Melzer M. S., Smith E. A., Boland G. J. (1997): Index of plant hosts of *Sclerotinia minor*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 272-280.
- Merriman P. R., Pywell M., Harrison G., Nancarrow J. (1979): Survival of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* and effects of cultivation practises on disease. *Soil biology and biochemistry*, 11: 567-570.
- Milner J. L., SiloSuh L., Lee J. C., He H. Y., Clardy J., Handelsman J. (1996): Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Applied and environmental mikrobiology*, 62(8): 3061-3065.
- Moore W. D. (1949): Flooding as means of destroying sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, 39:920-927.
- Morall R. A. A., Dueck J. (1982): Epidemiology of *Sclerotinia* stem rot of rapeseed in Saskatchewan. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 4: 161-168.
- Moyne A. L., Shelby R., Cleveland T. E., Tuzun S. (2001): Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *J. Appl. Microbiol.*, 90:622-629.
- Nesrsta M. (1991): Produkce antibiotik a toxinů u rodu *Trichoderma*. *Miscelanea prognostica*, 3: 9-27.
- Okrouhlá M. (1993): Biologické zdroje pro nechemickou ochranu rostlin. *Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha*, 5-38.
- Paulitz T. C., Belanger R. R. (2001): Biological control in greenhouse systems. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 39: 103-133.
- Phillips A. J. L. (1990): The effects of soil solarization on sclerotial populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant pathology*, 39: 38-43.

- Sandra A. I., Wright C. H., Zumoff L. S., Steven V. B. (2001): *Pantoea agglomerans* strain EH318 produces two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora* in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:282-292.
- Schwartz H. F., Steadman J. R. (1978): Factors affecting sclerotia populations of, and apotecium production by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, 68: 383-388.
- Shanahan P., O'Sullivan D. J., Simpson P., Glennon J. D., O'Gara F. (1992): Isolation of 2,4-Diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:353-358.
- Simpfendorfer S., Heenan D. P., Kirkegaard J. A., Lindbeck K. D., Murray G. M. (2004): Impact of tillage on lupin growth and the incidence of pathogenic fungi in southern New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 44: 53-56.
- Sivan A., Chet I. 1989: The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopathology*, 79 (2): 198-203.
- Smith K. P., Havey M. J., Handelsman J. (1993): Suppression of cottony leak of cucumber with *Bacillus cereus* strain UW85. *Plant Dis.*, 77:139-142.
- Smith E. M., Wehner F. C. (1986): Induction of crater disease of wheat in the field by artificial infestation of the soil with *Rhizoctonia solani*. *Phytophylactica*, 18: 127-130.
- Steadman J. R. (1979): Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, 69: 904-907.
- Steadman J. R. (1983): White mold – a serious yield-limiting disease of bean. *Plant diseases*, 67: 346-350.
- Stoztky G., Lynch J. M. (1972): Activity, ecology and population dynamics of microorganisms in soil. *Crit Rev Microbiol*, 2: 59–137.
- Subbarao K. V. (1998): Progress toward integrated management of lettuce crop. *Plant Disease*, 82: 1068-1078.
- Subbarao K. V. (2002): Cottony rot/Pink rot. In: Davis R. M., Raid R. N. (Eds.): Compendium of umbelliferous crop diseases. *APS press, St. Paul, MN*, 29-30.
- Tari P. H., Anderson A. J. (1988): Fusarium wilt suppression and agglutinability of *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:2037-2041.
- Tichá K. (2001): Biologická ochrana rostlin. *Grada publishing, spol. s r.o., Praha*, 88.
- Thomashow L. S., Bonsall R. F., and Weller D. M. (2002): Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes *in situ*. In: Manual of Environmental Microbiology (2nd ed.). *ASM Press, Washington DC*. 638-647.

- Thomashow L. S., Weller D. M., Bonsall R. F., Pierson L. S. (1990): Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent pseudomonas in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:908-912.
- US Congress Office of Technology Assessment (1995): Biologically-based technologies for pest control. OTA-ENV-636. *US Government Printing Office, Washington, DC.*
- Van Loenen M. C. A., Turbett Y., Mullins C. E., Feilden N. E. H., Wilson M. J., Leifert C., Seel W. E. (2003): Low temperature-short duration steaming of soil kills soil-borne pathogens, nematode pests and weeds. *European journal of Plant Pathology*, 109: 993-1002.
- Váňa J. (1996): Systém a vývoj hub a houbových organismů. *Univerzita Karlova Praha, Karolinum*, 99-112.
- Vašák J., Fábry A., Zukalová H., Morbacher J., Baranyk P. (1997): Systém výroby řepky. *Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin, Praha*, 74.
- Veselá D. (1986): Biologická ochrana proti chorobám kořenů vzházejících rostlin. *Sborník Ref. Z I. Sem. „Biotechnologie v integrované ochraně rostlin“ – Mykopreparáty československé výroby a jejich využití v ochraně polních kultur, VÚRV Praha-Ruzyně.*
- Warton B., Matthiessen J. N., Shackleton M. A. (2001): Glucosinolate content and isothiocyanate evolution: Two measures of the biofumigation potential of plants. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 49: 5244-5250.
- Weindling R. (1932): Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 84: 816-821.
- Whetzel H.H. (1929). North American species of *Sclerotinia*. 11. Two species on *Carex*, *S. duriaea* (Tul.) Rehm, and *S. longisclerotialis* sp. n. *Mycologia*, 21, 5-32.
- Whipps J. M., Gerlagh M. (1992). Biology of *Coniothyrium minitans* and its potential for use in disease biocontrol. *Mycological Research*, 96, 897–907.
- Whipps J. M., Lumsden R. D. (2001): In: Butt T. M., Jackson S., Magan N.(Eds.) Fungi as Biocontrol agents. Progress, problems and potential. *CAB International, New York*, 2: 9 - 23.
- Wilhite S. E., Lunsden R. D., and Strancy D. C. (2001): Peptide synthetase gene *In: Trichoderma virens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 5055-5062.
- Williams J. R., Stelfox D. (1980): Influence of farming practices in Alberta on germination and apotecium production of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2: 169-172.
- Zvára J., Táborský V. (1985): Cvičení z ochrany rostlin I. *Provozně ekonomická fakulta v Českých Budějovicích*, 66-67.

7. Přílohy

Grafický list 1: Vzájemné interakce mykoparazitických hub z komerčních biopreparátů s fytopatogenní houbou *Sclerotinia sclerotiorum*



Fytopatogenní houba *S. sclerotiorum* – kontrolní varianta



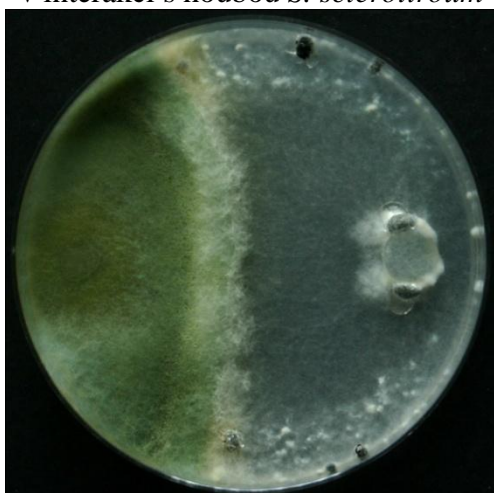
Trichoderma spp. z biopreparátu Binab Golf v interakci s houbou *S. sclerotiorum*



T. virens z biopreparátu SoilGard v interakci s houbou *S. sclerotiorum*



T. harzianum z biopreparátu Supresivit v interakci s houbou *S. sclerotiorum*



T. harzianum z biopreparátu Trianum v interakci s houbou *S. sclerotiorum*



C. rosea f. *catenulata* z biopreparátu PrestopMix v interakci se *S. sclerotiorum*

Grafický list 2: Vzájemné interakce mykoparazitických hub z komerčních biopreparátů s fytopatogenní houbou *Rhizoctonia solani*



Fytopatogenní houba *R. solani* – kontrolní varianta



Trichoderma spp. z biopreparátu Binab Golf v interakci s houbou *R. solani*



T. virens z biopreparátu SoilGard v interakci s houbou *R. solani*



T. harzianum z biopreparátu Supresivit v interakci s houbou *R. solani*



T. harzianum z biopreparátu Trianum v interakci s houbou *R. solani*



C. rosea f. *catenulata* z biopreparátu PrestopMix v interakci se *R. solani*

Grafický list 3: Ověření parazity sklerocií *S. sclerotiorum* získaných z vzájemných interakcí kmenů hub rodu *Trichoderma* z komerčních biopreparátů s fytopatogenní houbou *S. sclerotiorum*



Sklerocia *S. sclerotiorum* – kontrolní varianta



Ověření parazitace sklerocií *S. sclerotiorum* - Binab Golf



Parazitovaná sklerocia *S. sclerotiorum* – SoilGard



Ověření parazitace sklerocií *S. sclerotiorum* - Supresivit



Ověření parazitace sklerocií *S. sclerotiorum* - Trianum



Ověření parazitace sklerocií *S. sclerotiorum* - Prestop Mix

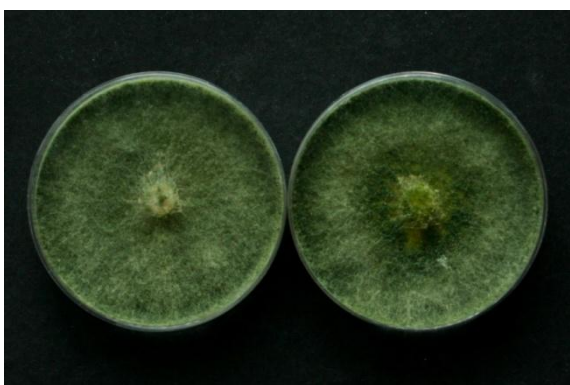
Grafický list 4: Ověření parazitace terčků *R. solani* získaných z vzájemných interakcí kmenů hub rodu *Trichoderma* z komerčních biopreparátů s fytopatogenní houbou *R. solani*



Terčiky mycelia *R. solani* – kontrolní varianta



Ověření parazitace terčků *R. solani*
- Binab Golf



Parazitované terčiky *R. solani* houbou
T. virens z biopreparátu SoilGard



Ověření parazitace terčků *R. solani*
- Supresivit

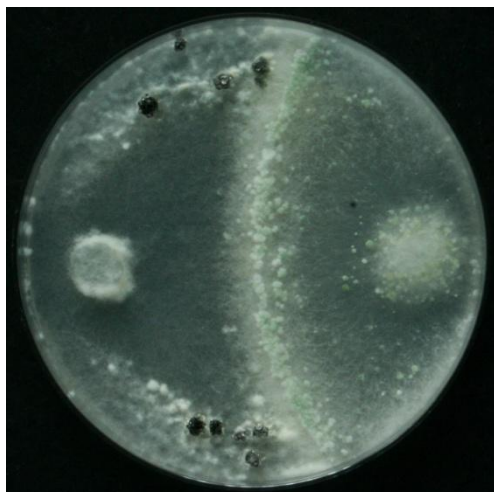


Ověření parazitace terčků *R. solani*
- Triatum

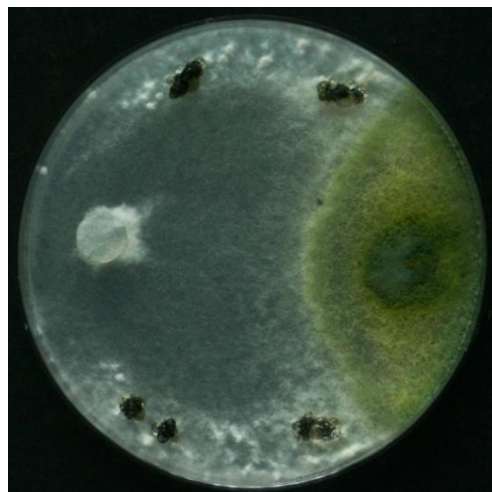


Ověření parazitace terčků *R. solani*
- Prestop Mix

Grafický list 5: Vzájemné interakce vybraných kmenů hub rodu *Trichoderma* odizolovaných z půd Jižních Čech s fytopatogenní houbou *S. sclerotiorum*



Kmen 2 KZ v interakci s fytopatogenní houbou *S. sclerotiorum*



Kmen 2 KZ SBT v interakci s fytopatogenní houbou *S. sclerotiorum*



Kmen 5 KZ v interakci s fytopatogenní houbou *S. sclerotiorum*



Kmen 10 KZ v interakci s fytopatogenní houbou *S. sclerotiorum*

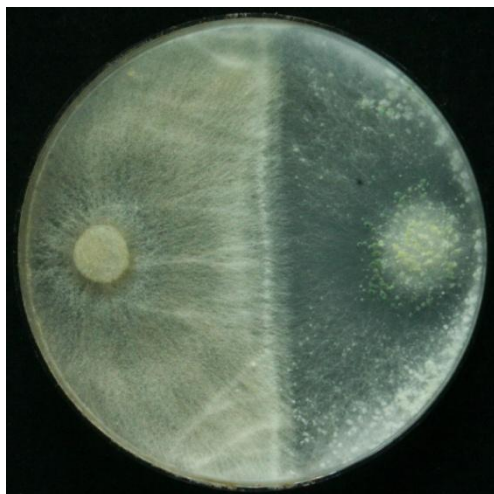


Kmen 11 EZ v interakci s fytopatogenní houbou *S. sclerotiorum*

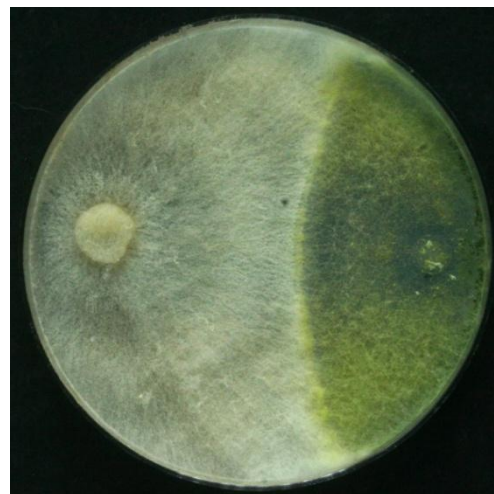


Kmen 13 EZ v interakci s fytopatogenní houbou *S. sclerotiorum*

Grafický list 6: Vzájemné interakce vybraných kmenů hub rodu *Trichoderma* odizolovaných z půd Jižních Čech s fytopatogenní houbou *Rhizoctonia solani*



Kmen 2 KZ v interakci s fytopatogenní houbou *R. solani*



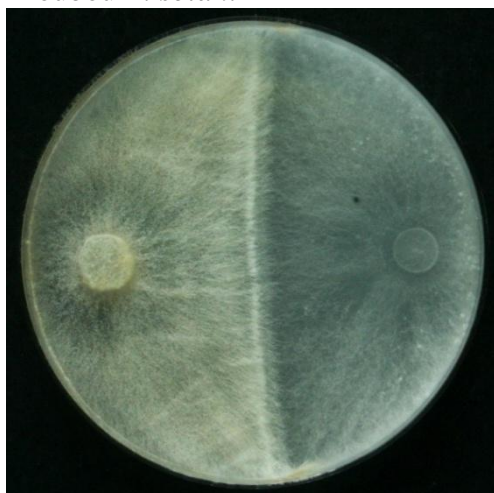
Kmen 2 KZ SBT v interakci s fytopatogenní houbou *R. solani*



Kmen 5 KZ v interakci s fytopatogenní houbou *R. solani*



Kmen 10 KZ v interakci s fytopatogenní houbou *R. solani*

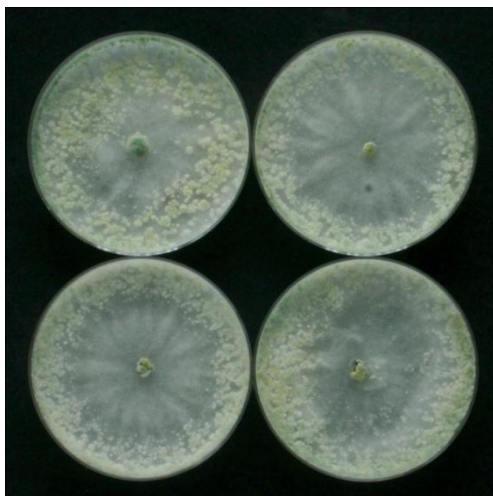


Kmen 11 EZ v interakci s fytopatogenní houbou *R. solani*



Kmen 13 EZ v interakci s fytopatogenní houbou *R. solani*

Grafický list 7: Ověření parazite sklerocií *S. sclerotiorum* získaných z vzájemných interakcí kmenů mykoparazitických hub rodu *Trichoderma* odizolovaných z půd Jižních Čech s fytopatogenní houbou *S. sclerotiorum*



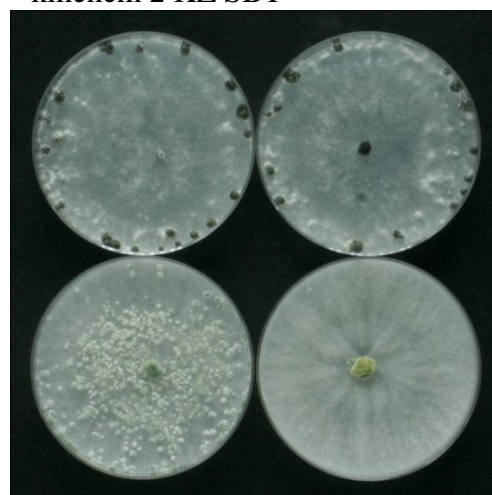
Parazitovaná sklerocia *S. sclerotiorum* kmenem 2 KZ



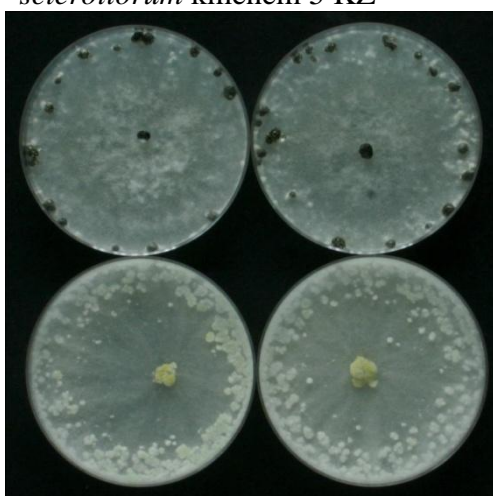
Parazitovaná sklerocia *S. sclerotiorum* kmenem 2 KZ SBT



Ověření parazitace sklerocií *S. sclerotiorum* kmenem 5 KZ



Ověření parazitace sklerocií *S. sclerotiorum* kmenem 10 KZ



Ověření parazitace sklerocií *S. sclerotiorum* kmenem 11 EZ



Parazitovaná sklerocia *S. sclerotiorum* kmenem 13 EZ

Grafický list 8: Ověření parazitice bloček *R. solani* získaných z vzájemných interakcí kmenů mykoparazitických hub rodu *Trichoderma* odizolovaných z půd Jižních Čech s fytopatogenní houbou *R. solani*



Parazitované bločky *R. solani*
kmenem 2 KZ



Parazitované bločky *R. solani*
kmenem 2 KZ SBT



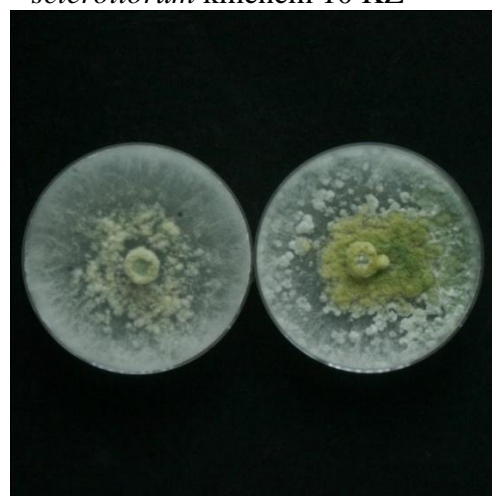
Ověření parazitace sklerocií *S. sclerotiorum*
kmenem 5 KZ



Ověření parazitace sklerocií *S. sclerotiorum*
kmenem 10 KZ



Ověření parazitace sklerocií *S. sclerotiorum*
kmenem 11 EZ



Parazitovaná sklerocia *S. sclerotiorum*
kmenem 13 EZ