

**Česká zemědělská univerzita v Praze**  
**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**  
**Katedra ochrany rostlin**



**Antagonistická aktivita *Clonostachys rosea***

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Maria Bazanová**

**Vedoucí práce: doc. Ing. Evženie Prokinová, CSc.**

**© 2014 ČZU v Praze**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Antagonistická aktivita *Clonostachys rosea*" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí této diplomové práce doc. Ing. Evženi Prokinové, CSc. za cenné rady a pomoc při zpracování práce. Dále bych též ráda poděkovala paní Jaroslavě Vospělové za spolupráci v laboratoři a skleníku.

## Souhrn

Od 1. ledna roku 2014 je pro pěstitele členských států Evropské unie povinné uplatňování zásad integrované ochrany rostlin. Mnohé metody integrované ochrany rostlin jsou šetrnější k životnímu prostředí i spotřebiteli. Jednou z takových metod je i biologická metoda ochrany rostlin, která využívá přirozených vztahů mezi organismy. Tato práce je součástí výzkumného projektu, který se zabývá vývojem nového biologického přípravku na ochranu rostlin proti houbovým rostlinným patogenům, jehož účinnou složkou jsou konidie čtyř kmenů hub *Clonostachys rosea*.

Cílem práce bylo ověření antagonistické aktivity *Clonostachys rosea* vůči patogenům *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium culmorum* a *Botrytis cinerea* na různých hodnotách pH. Vliv pH na antagonistickou aktivitu *Clonostachys rosea* byl posuzován v testech in vitro a následně prostřednictvím nádobových pokusů ve skleníku.

V první části práce jsou shrnuty současné informace o biologické ochraně rostlin a typech antagonistických vztahů mezi organismy. Dále je zde popsán rod *Clonostachys*, jeho využití v biologické ochraně rostlin a vliv pH na houbová bioagens a patogeny. V následující části práce jsou popsány a vyhodnoceny laboratorní pokusy a nádobové pokusy ve skleníku.

V testech in vitro bylo prokázáno, že pH mírně ovlivňuje antagonistickou aktivitu *Clonostachys rosea*. Avšak *Clonostachys rosea* stále inhibuje růst vybraných patogenů *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* a *Botrytis cinerea* a to nejlépe v mírně kyselém, neutrálním a mírně zásaditém pH. Z výsledků skleníkových pokusů lze usoudit, že upravené pH též mírně ovlivňuje antagonistickou aktivitu *Clonostachys rosea*. Dalo by se tedy předpokládat, že testovaný přípravek by bylo možné využívat k ochraně rostlin, rostoucích na půdách s rozličnými hodnotami pH. Výsledky skleníkových pokusů nám však stále nepřinášejí dostatečné informace o chování testovaného přípravku. Proto je nezbytné tyto výsledky ověřit v polních pokusech.

Nad rámec cílů stanovených pro tuto diplomovou práci byla ověřována životnost konidií *Clonostachys rosea* v průběhu skladování. Ověření životnosti je důležité z hlediska zachování účinnosti přípravku i po déletrvajícím skladování. Bylo stanoveno, že testovaný přípravek, resp. jeho účinná složka – konidie *Clonostachys rosea*, si uchovávají dostatečně vysokou životnost po dobu nejméně sedmi měsíců.

**Klíčová slova:** *Clonostachys*, biologická ochrana, antagonistická aktivita, pH

## Summary

Since January 1<sup>st</sup>2014 members of the European Union have to use methods of integrated plant protection. Many methods of integrated plant protection are friendlier to the environment and consumers. One of those methods is a biological method of plant protection which uses the natural relationships between organisms. This thesis is part of a research project that deals with the development of new biological plant protection product against fungal plant pathogens, whose active component is conidia of four fungal strains *Clonostachys rosea*.

The aim of this thesis was to verify the antagonistic activity of *Clonostachys rosea* against pathogens *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium culmorum* and *Botrytis cinerea* at different pH values. Effect of pH on the antagonistic activity of *Clonostachys rosea* was assessed in in vitro tests and subsequently through the tests in the greenhouse.

In the first part summarized the current information on biological plant protection, types of antagonistic relationships between organisms. Further is described the *Clonostachys* spiece, its use in biological plant control and the effect of pH on fungal pathogens and bioagents. The following section describes and evaluates laboratory and greenhouse experiments.

In vitro testing has shown that the pH slightly affects antagonistic activity of *Clonostachys rosea*. However, *Clonostachys rosea* still inhibits the growth of selected pathogens *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* and *Botrytis cinerea*, especially in a slightly acidic, neutral and slightly alkaline pH. We can suggest from the greenhouse test, that the modified pH also slightly affects antagonistic activity of *Clonostachys rosea*. It can be suggested, that this product can be used for protection of plants growing in soil with different pH. However, the results of greenhouse experiments are not bringing us enough information about behaviour of the tested product. This is why it is necessary to verify these results in field experiments.

Beyond the objectives set for this thesis was testing durability testing of conidia of *Clonostachy srosea* during storage. Durability verifying is important for maintaining efficacy even after prolonged storage. It was assessed, that tested product, or its active component- conidia of *Clonostachys rosea*, keeps sufficiently long durability for at least seven months.

**Keywords:** *Clonostachys*, biological control, antagonistic activity, pH

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíl práce</b> .....	<b>2</b>
2.1 Hypotéza .....	2
2.2 Cíl práce .....	2
<b>3 Literární přehled</b> .....	<b>3</b>
3.1 Biologická ochrana .....	3
3.1.1 Pojetí a cíle biologické ochrany .....	3
3.1.1.1 Cíle biologické ochrany rostlin proti chorobám: .....	5
3.1.1.2 Metody biologické ochrany rostlin.....	5
3.2 Biologická ochrana ve vztahu k chorobám rostlin .....	6
3.2.1 Typy antagonistických vztahů .....	6
3.2.1.1 Mykoparazitizmus .....	7
3.2.1.2 Antibióza .....	7
3.2.1.3 Kompetice (Soutěžení o živiny a prostor) .....	9
3.2.1.4 Kolonizace pletiv hostitele.....	10
3.2.1.5 Indukce rezistence rostlin k chorobám .....	10
3.2.1.6 Přirozená rezistence rostlin k chorobám .....	11
3.3 Faktory ovlivňující aktivitu bioagens .....	12
3.4 Houby rodu <i>Clonostachys</i> .....	13
3.4.1 Taxonomické zařazení <i>Clonostachys rosea</i> .....	13
3.4.2 Popis rodu .....	13
3.4.3 Využití <i>Clonostachys rosea</i> v biologické ochraně rostlin.....	14
3.5 Biologické přípravky využívané v ČR .....	17
3.6 Vliv pH na některá houbová bioagens, účinnost biologické ochrany a rozvoj patogenů .....	18
<b>4 Materiál a metoda</b> .....	<b>20</b>
4.1 Materiál .....	20
4.1.1 Použité kultury hub .....	20
4.1.2 Materiál používaný v laboratoři k testům in vitro .....	20
4.1.3 Materiál používaný ke skleníkovým pokusům.....	21
4.1.3.1 Osivo.....	21
4.2 Metoda .....	21
4.2.1 In vitro pokusy .....	21
4.2.1.1 Vliv pH živné půdy na rychlost růstu testovaných izolátů <i>Clonostachys rosea</i> 21	

4.2.1.2	Vliv pH na antagonistickou aktivitu <i>Clonostachys rosea</i> z přípravku vůči vybraným patogenům .....	22
4.2.1.3	Interakce <i>Clonostachys rosea</i> z přípravku s vybranými patogeny na živné půdě Cz – D .....	23
4.2.2	Skleníkové pokusy .....	23
4.2.2.1	Vliv pH půdy na antagonistickou aktivitu <i>Clonostachys rosea</i> z přípravku vůči vybraným fytopatogenům .....	23
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>27</b>
5.1	Hodnocení vlivu pH živné půdy na rychlost růstu testovaných izolátů <i>Clonostachys rosea</i> – in vitro .....	27
5.2	Hodnocení vlivu pH na antagonistickou aktivitu <i>Clonostachys rosea</i> z přípravku vůči vybraným patogenům – in vitro .....	30
5.2.1	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	30
5.2.2	<i>Rhizoctonia solani</i> .....	33
5.2.3	<i>Botrytis cinerea</i> .....	36
5.2.4	<i>Fusarium culmorum</i> .....	39
5.2.5	Hodnocení antagonistické aktivity <i>Clonostachys rosea</i> z přípravku vůči vybraným patogenům na živné půdě Cz – D .....	42
5.3	Hodnocení vlivu pH půdy na antagonistickou aktivitu <i>Clonostachys rosea</i> z přípravku vůči vybraným fytopatogenům – nádobové pokusy ve skleníku .....	43
5.3.1	Hrách .....	43
5.3.2	Pšenice .....	45
5.4	Hodnocení životnosti <i>Clonostachys rosea</i> v přípravku .....	47
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>54</b>
<b>8</b>	<b>Seznam literatury .....</b>	<b>55</b>
<b>9</b>	<b>Seznam příloh .....</b>	<b>61</b>

# 1 Úvod

V moderní společnosti je nyní více klade důraz na zdraví a krásu jedince, což je úzce spjato s kvalitními nezávadnými produkty pro přímou spotřebu i pro následné zpracování. Větší pozornost je věnována i životnímu prostředí a biodiverzitě prostředí. Proto mnoho pěstitelů již v minulosti přešlo k integrovanému systému ochrany rostlin, jehož uplatňování je od 1. ledna 2014 v EU pro pěstitele povinné. Integrovaná ochrana rostlin je soubor ekonomicky, technologicky a toxikologicky přijatelných metod ochrany rostlin. Mnohé metody integrované ochrany rostlin jsou šetrnější k okolí i spotřebiteli a jednou z nich je i biologická metoda ochrany rostlin. Biologická ochrana rostlin se uplatňuje v konvenčním zemědělství, v ekologickém zemědělství i v ochraně lesů a zahradních rostlin. Využívá přirozených vztahů mezi organismy, je selektivní, nezanechává v prostředí rezidua a její podstatou je udržení nebo obnovení přirozené rovnováhy prostředí. Přes svoje výhody se biologická ochrana využívá v praxi v menší míře, jelikož má určitá omezení. Jedním z takových omezení jsou různé nároky bioagens na prostředí, často je obtížné dodržet optimální podmínky pro bioagens, například při polní aplikaci. Naopak v krytých prostorách, jako jsou například skleníky, je jednodušší dodržet konkrétní podmínky pro introdukovaný organismus.

Biologická ochrana často využívá antagonistických vztahů houbových bioagens s patogeny. V České republice je registrováno několik biopreparátů na bázi antagonistických hub, jako jsou *Trichoderma harzianum*, *Pythium oligandrum*, *Coniothyrium minitans*, které jsou využívány k ochraně proti významným patogenům.

Tato práce je součástí projektu, který se zabývá testováním nově vyvíjeného biologického přípravku na bázi houby *Clonostachys rosea*, v němž byly použity čtyři kmeny této houby. Hlavním cílem práce bylo ověření antagonistické aktivity všech čtyř kmenů *Clonostachys rosea* obsažených v přípravku k vybraným patogenům při různých hodnotách pH. Pokusy byly prováděny v podmínkách in vitro a nádobových pokusech ve skleníku. Součástí práce bylo i ověření životnosti spor houby po určité době skladování s cílem ověřit dobu skladovatelnosti přípravku.



## **2 Vědecká hypotéza a cíl práce**

### **2.1 Hypotéza**

*Clonostachys rosea* vykazuje antagonistickou aktivitu vůči fytopatogenním houbám. Hodnota pH ovlivňuje intenzitu antagonistického projevu houby *Clonostachys rosea*.

### **2.2 Cíl práce**

1. Shrnout současné informace v dané problematice
2. Ověřit vliv pH na antagonistickou aktivitu *Clonostachys rosea* v podmínkách in vitro
3. Ověřit vliv pH na antagonistickou aktivitu *Clonostachys rosea* v nádobových pokusech ve skleníku

## 3 Literární přehled

### 3.1 Biologická ochrana

Biologická ochrana rostlin je ochrana prováděná biologickými prostředky. Je součástí integrované ochrany rostlin, kde je využíváno nepřímých i přímých metod ochrany rostlin, jako jsou chemické, fyzikální, mechanické a již zmíněné metody biologické. Biologická ochrana rostlin využívá nejčastěji přirozeně existujících antagonistických vztahů mezi organismy. Jejím cílem není vymýcení, ale potlačení populace škodlivého organismu pod ekonomický práh škodlivosti. Jako bioagens v biologické ochraně rostlin proti chorobám a se využívají rozličné organismy, může se jednat o predátory (např. *Cryptoleamus montrouzieri*, *Orius laevigatus*, *Phytoseiulus persimilis*, *Typhlodromus pyri*), parazitoidy (např. *Encarsia formosa*, *Trichogramma*), entomopatogenní houby a hlístice (např. *Beauveria bassiana*, *Phasmarhabditis hermaphrodita*), entomopatogenní viry z čeledi *Baculoviridae*, bakterie (např. *Bacillus thuringiensis*), houby a houbové organismy (např. *Clonostachys rosea*, *Trichoderma harzianum*, *Coniothyrium minitans*) a další. Prostředky biologické ochrany se převážně aplikují preventivně, za účelem dlouhodobé ochrany, oproti kurativním chemickým zásahům. Působí pomaleji než chemické látky a jsou též ovlivněny mnoha biotickými a abiotickými faktory daného prostředí, jako je například průběh počasí. Využití biologické ochrany je závislé na dalších činitelích, jako je cena biologických prostředků, jejich dostupnost a aplikační technologie. Při aplikaci biologických přípravků je nutné dbát na konkrétní nároky bioagens, použitého pro ochranu rostlin, znát termín aplikace, podmínky aplikace a škodlivý organismus, proti kterému se bude provádět biologická ochrana. Znalost škodlivého organismu je nezbytná, jelikož biologická ochrana je selektivní a působí konkrétně na daného patogena či škůdce. Biologická agens nepůsobí toxicky na necílové organismy, včetně člověka. Nezatěžují životní prostředí reziduí a vytváří dlouhodobě stabilizovaný systém. Biologickou ochranu rostlin lze aplikovat v ekologickém zemědělství, v chráněných oblastech a v ochranných pásmech vodních zdrojů (Věchet, 2010; Věchet, 2012).

#### 3.1.1 Pojetí a cíle biologické ochrany

Plodiny v ekosystémech jsou vystaveny vlivům biotických a abiotických faktorů, které ovlivňují jejich výnosy. Rozsah ztrát se odvíjí od vlastností rostlin a příznivých podmínek pro rozvoj původců chorob. Vedle biotických příčin hrají dominantní roli i mikrobiální patogeni,

kteří nepříznivě ovlivňují rostliny. To vede k velkým kvantitativním i kvalitativním ztrátám v požadovaném výnosu. Ve snaze minimalizovat incidenci (četnost) a rozšíření chorob plodin byly navrženy krátkodobé a dlouhodobé strategie s ohledem na rozdílné geografické podmínky. Pokud chceme dosáhnout očekávaného výnosu z pěstovaných plodin, musíme přizpůsobit strategie nebo kombinace strategií biologické ochrany danému prostředí. V době zvyšujícího se znečištění prostředí a přítomnosti reziduí chemikálií v kulturních plodinách se začal klást důraz na omezení chemického ošetřování plodin, které je ale nezbytnou podmínkou pro omezení chorob rostlin. Preventivní metody ochrany rostlin byly primárně zavedeny pro zajištění vysoké úrodnosti půdy a pro zvýšení výnosu plodin, pomocí aplikace hnojiv, orby, zavlažování a zabezpečení dostatečného množství organické hmoty v půdě. Přímé metody ochrany rostlin mají vliv na populační hustotu patogenů, způsobujících choroby rostlin. Základní myšlenkou biologické ochrany rostlin je kompatibilita se stávajícími pěstitelskými technologiemi. Strategie biologické ochrany rostlin jsou adaptovány na dané geografické podmínky tak, aby byly pěstiteli akceptovatelné (Narayanasamy, 2013b).

Koncepty biologické ochrany rostlin se vyvíjely v čase na základě informací a technik k rozpoznání interakcí mezi patogeny, ostatními organismy a rostlinami. Biologická ochrana využívá přirozených nebo modifikovaných organismů, genů nebo genových produktů ke snížení vlivu nežádoucích organismů. Též může podporovat žádoucí organismy (např. přirozené nepřátele patogenů, půdní mikroflóru apod.) tím, že nepůsobí toxicky. Míru antagonistické aktivity introdukovaného organismu ovlivňuje mnoho faktorů daného prostředí, mohou to být povětrnostní podmínky, pH půdy, vláhová režim atd. Bioagens mohou působit na rostliny přímo nebo nepřímo. Přímým působením je myšlena inhibice rozvoje patogenů. Nepřímo mohou bioagens na rostliny působit tím, že podpoří úroveň rezistence hostitelské rostliny vůči patogenům nebo působí pozitivně na růst rostlin. Biologická ochrana je tedy definována jako využití biotických a abiotických agens, které působí samostatně nebo kombinovaně. Redukují potenciál patogenů inhibicí nebo pomocí aktivace obranného systému hostitelské rostliny, což vede k redukci incidence a intenzity chorob. Studie prokázaly, že využití biotických a abiotických agens při ochraně rostlin vykazují synergický účinek. Jedním z impulzů pro využití biologické ochrany byl rozvoj rezistence patogenů k chemickým přípravkům. Avšak stále je využívání chemických látek dominantní vůči ostatním metodám ochrany rostlin, proto je v biologické ochraně kladen důraz i na kompatibilitu bioagens s chemickými přípravky. Studie prokazují, že biotická bioagens jsou v mnoha případech kompatibilní s chemicky využívanými přípravky (Narayanasamy, 2013b).

### 3.1.1.1 Cíle biologické ochrany rostlin proti chorobám:

1. Výběr nejefektivnějšího bioagens
2. Identifikace abiotických agens, která mohou působit individuálně nebo v kombinaci s biotickými agens
3. Dosažení podpory růstu rostlin
4. Prověření možnosti redukce užití nebo úplného nahrazení chemikálií v ochraně rostlin, aniž by se změnila efektivita zásahu (Narayanasamy, 2013b).

### 3.1.1.2 Metody biologické ochrany rostlin

1. Introdukce antagonisty do prostředí: Ideální je využití organismů přirozeně pocházejících z daného prostředí, kam jsou posléze opětovně vnášeny, což příznivě ovlivňuje přežití daného organismu a minimalizuje možnost narušení rovnováhy přirozených vztahů v prostředí. Existuje několik typů antagonistických vztahů, které jsou popsány v následujících kapitolách. Organismus s určitým typem antagonistického vztahu by měl být vitální a vyznačovat se rychlým růstem a dostatečnou kolonizací prostředí a tím zabraňovat incidenci a rozvoji choroby.
2. Indukce rezistence rostliny: Rezistence rostlin k patogenům lze v některých případech dosáhnout šlechtěním. Pomocí působení biotických a abiotických faktorů lze u rostlin dosáhnout indukované rezistence, která působí na rostlinu příznivě tím, že zvyšuje odolnost rostlin vůči působení rozličných stresů, což vede ke zvýšení výnosu dané plodiny. Biologická ochrana využívá k indukci rezistence rostlin patogenní i nepatogenní organismy a jejich metabolity. Například bakterie z rodu *Pseudomonas* nebo některé mykorrhizní houby působí na rostliny stimulačním účinkem.
3. Oslabení patogena: Oslabení patogena je možné dosáhnout změnou vhodných podmínek pro jeho růst a vývoj, k čemuž lze dospět například agrotechnickými zásahy, použitím chemických a fyzikálních metod. V rámci biologické ochrany rostlin dochází k oslabení patogenní aktivity patogena. Využívají se avirulentní nebo hypovirulentní kmeny jinak patogenních hub, které mohou potlačit populace virulentních patogenů a převládnout v daném prostředí.
4. Indukce supresivity: Supresivní půdy jsou půdy vyznačující se takovým složením mikroorganismů, které mohou přirozeně potlačovat patogeny převážně tím, že soutěží

s patogeny o živiny a prostor. Nebo působí na patogeny antibiózou a dalšími mechanismy (Prokinová, 1996).

## **3.2 Biologická ochrana ve vztahu k chorobám rostlin**

Biologická kontrola ve fytopatologii využívá mikrobiálních antagonistů k potlačení chorob (Věchet, 2012). Mikroorganismy používané pro biologickou ochranu přítomné v rostlinách i na povrchu rostlin, půdě a ovzduší využívají různé antagonistické mechanismy vůči cílovým patogenům. Je důležité pochopit, jak tato biotická bioagens fungují. Pro nejeftivnější ochranu je nezbytné znát jejich omezení a požadavky. Výzkumy prokázaly, že existuje mnoho rozmanitých antagonistických vztahů a dokonce některé druhy bioagens využívají více mechanismů pro potlačení fytopatogenů. Například některé druhy hub z rodu *Trichoderma* využívají dva i více mechanismů k potlačení patogenů. Antagonistické houby využívají parazitismu, antibiózy, kompetice, dále kolonizují pletiva hostitelské rostliny, vyvolávají indukovanou nebo systémovou rezistenci ke konkrétním patogenům. Kromě toho zvyšují odolnost rostliny vůči abiotickým i biotickým stresům, v případě, že jsou s rostlinou v mykorhize (Narayanasamy, 2013a).

### **3.2.1 Typy antagonistických vztahů**

Antagonistické vztahy lze rozdělit na přímý antagonismus, nepřímý antagonismus a smíšený antagonismus. V případě přímého antagonismu bioagens parazituje a usmrcuje patogena nebo degraduje jeho sklerocia. Nepřímý antagonismus zahrnuje vztahy mezi bioagens a patogenem, ve kterých nedochází k jejich přímému kontaktu. Bioagens aktivují v rostlině obranné mechanismy a tím mohou vyvolat rezistenci rostlin vůči konkrétním patogenům. Dále nepřímý antagonismus zahrnuje kompetici, což je vztah, kdy bioagens soutěží s patogenem o živiny a prostor a tím negativně ovlivňuje růst patogena a jeho schopnost kolonizovat prostředí. Smíšený antagonismus zahrnuje schopnost bioagens produkovat rozličné typy enzymů, antibiotik, antibiotikům podobných látek a toxinů, a tím inhibovat růst a rozvoj patogenů (Narayanasamy, 2013a).

### 3.2.1.1 Mykoparazitizmus

Houbové organismy pro biologickou kontrolu parazitují patogeny a získávají z nich potřebné živiny pro svůj vývoj. Biotrofní mykoparaziti mají stálý kontakt s buňkami hostitele, čerpají z nich živiny, ale neusmrcují je. Naopak nekrotrofní paraziti usmrcují buňky svého hostitele (Věchet, 2012).

Někteří parazité houbového původu, například *Trichoderma virens*, mohou fungovat jako agresivní mykoparazité houbových fytopatogenů. Dokážou parazitovat nejen hyfy mnoha druhů fytopatogenních hub, ale též rozkládat jejich útvary pro přečkání nepříznivých podmínek – sklerocia. Jedním z fytopatogenů, které parazituje *Trichoderma virens*, je *Rhizoctonia solani*. *Coniothyrium minitans* napadá hyfy a sklerocia *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pythium oligandrum* atakuje žijící hyfy patogenů, jako jsou *Pythium ultimum* a další patogeny z rodu *Pythium*. Bylo prokázáno, že některé mykoparazitické houby z rodu *Pythium* parazitují patogenní *Fusarium nivale* a *Botrytis cinerea*. V laboratorních pokusech byla prokázána biologická aktivita *Trichoderma harzianum*, ať již samostatně nebo v kombinaci s bakterií *Streptomyces rochei*. Vykazovala schopnost zastavit šíření patogenní *Phytophthora capsici*, ale též kolonizovala celý povrch patogena a tím došlo k následnému rozpadu hyf *Phytophthora capsici* (Narayanasamy, 2013a).

Často se stává, že jeden houbový patogen, například *Blumeria graminis*, může být parazitován několika mykoparazity – jsou to houby *Acremonium alternatum*, *Acrodonium crateriforme*, *Cladosporium oxysporum*, *Ampelomyces quisqualis* a *Gliocladium virens* (Kiss, 2003).

### 3.2.1.2 Antibióza

Antibióza je další druh antagonismu zprostředkovaný metabolity mikroorganismů. Mohou to být fungální antibiotika, toxické substance, antibiotikům podobné složky (Haggag and Mohamed, 2007). Islam et al. (2005) uvádějí, že je celkem jednoduché demonstrovat inhibici dvou organismů v laboratorních podmínkách na živných půdách. Produkce antibiotik, antibiotikům podobných látek, enzymů nebo toxinů vybraným bioagens je na Petriho misce mnohdy spatřitelná pouhým okem. V následujících podkapitolách budou popsána některá bioagens, která produkují inhibující látky.

### 3.2.1.2.1 Producenti lytických enzymů

Degradace buněčné stěny hub vyžaduje enzymy, které hydrolyzují polymery glukózy s různými glykosidickými vazbami. Chitináza a  $\beta$  – 1, 3 – glukánáza jsou považovány za důležité enzymy, které degradují nejčastější polymery v buněčných stěnách hub, jako je  $\beta$  – 1, 3 – glukán a chitin. Tyto enzymy potlačují vývoj houbových patogenů a tím eliminují vznik onemocnění rostlin houbového původu. Základním mechanismem je poškození sloučenin polysacharidů chitinu a glukanu, které umožňují udržovat pevnost buněčných stěn houbových patogenů. Následně dochází k porušení integrity buněčné stěny a rozpadu buňky (Narayanasamy, 2013a). Bélanger et al. (1995) uvádějí, že *Trichoderma harzianum* vykazuje antagonistickou aktivitu proti *Botrytis cinerea* vylučováním chitinolytických enzymů, což vede k degradaci buněčné stěny a následnému rozpadu buňky. Molekulárně biologické studie poskytují důkazy o nadměrné expresi genu *chit 42*, přítomného u *Trichoderma virens*. Tento gen kóduje enzym chitinázu, který potlačuje fytopatogenní *Rhizoctonia solani*. Rozdíly v biologické kontrole *T. virens* závisí na kmenu a dalších faktorech zapojujících se do biologické kontroly proti patogenům (Baek et al., 1999). Chet and Chernin (2002) poukazují na všudypřítomnou půdní houbu *Trichoderma harzianum*, která slouží jako bioagens a potlačuje vývoj *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* a *Botrytis cinerea*. Mechanismem jejího účinku je produkce lytických enzymů – chitinázy, glukánázy a proteázy.

*Clonostachys rosea* vykazuje antagonistickou aktivitu vůči *Fusarium culmorum* díky sekreci enzymu *N* – acetyl –  $\beta$  – D – glukosaminidázy (NAGasa). Tento enzym kóduje gen *cr – nag1* z *Clonostachys rosea*. Enzymatické testy ukázaly, že aktivita enzymu NAGasa byla potlačena v médiu s vysokým obsahem glukózy. Naopak v médiích s vysokým obsahem chitinu nebo přítomnosti *Fusarium culmorum* byla aktivita tohoto enzymu vyšší a buněčné stěny *F. culmorum* sloužily jako zdroj uhlíkatých látek pro *Clonostachys rosea* (Narayanasamy, 2013a). Mamarabadi et al. (2009) uvádějí, že *Clonostachys rosea* inhibuje růst mycelia *Fusarium culmorum* a *Pythium ultimum*, nicméně ke zvýšené expresi genu *cr – nag1* dochází pouze v případě interakce *Clonostachys rosea* a *F. culmorum*, v případě interakce s *Pythium ultimum* nedochází ke zvýšené expresi tohoto genu. Jejich výsledky ukazují, že *Clonostachys rosea* degraduje *Pythium ultimum* jiným mechanismem účinku, než jakým hydrolyzuje buněčné stěny *Fusarium culmorum*.

### 3.2.1.2.2 Producenti antibiotik

Některé houby pro biologickou kontrolu produkují antibiotika a tím inhibují klíčení spor, růst mycelia a sporulaci houbových patogenů. *Gliocladium virens* (synonymum *Trichoderma virens*) produkuje silná antibiotika dioxin a viridin a tím inhibuje tvorbu sklerocií *Sclerotinia sclerotiorum* a též parazituje na již existujících sklerociích. *Gliocladium virens* produkuje antibiotikum gliovirin, které silně inhibuje *Pythium ultimum* a *Phytophthora* sp. (Narayanasamy, 2013a). Howell at al. (1993) uvádějí, že kmeny *Gliocladium virens* lze rozdělit na základě produkce sekundárních metabolitů do dvou skupin (GV – P a GV – Q). Kmeny skupiny P produkují gliovirin a heptelidovou kyselinu, zatímco kmeny skupiny Q produkují gliotoxin a dimetylgliotoxin. Obě skupiny produkují viridin a fytotoxin viridol. Kmeny ze skupiny P fungují jako efektivní bioagens u sazenic bavlníku, které napadá *Pythium ultimum*, produkcí gliovirinu jej inhibují. Tyto kmeny však neposkytují ochranu bavlníku před *Rhizoctonia solani*, na druhé straně kmeny ze skupiny Q produkují gliotoxin a efektivně potlačují vývoj *Rhizoctonia solani*. Kmen *Clonostachys rosea* BAFC3874 izolovaný ze supresivní půdy, potlačující *Sclerotinia sclerotiorum*, efektivně inhibuje rozvoj infekce vyvolané tímto patogenem u hlávkového salátu a rostlin sóji. Testováním metodou podvojných kultur v podmínkách in vitro bylo zjištěno, že tento kmen produkuje toxiny proti *Sclerotinia sclerotiorum*. Houbová bioagens mohou produkovat jak hydrolytické enzymy inhibující patogena ve všech fázích jeho života, tak i různé druhy sekundárních metabolitů. *Pichia guilliermondii* má několik mechanismů biologické aktivity pro potlačování *Botrytis cinerea*. Suspenze buněk získaná z *Pichia guilliermondii* potlačovala *Botrytis cinerea*, což poukazuje na přítomnost inhibičních látek v suspenzi buněk bioagens. Dokonce po zahřátí suspenze buněk byl jejich inhibiční účinek zachován (Narayanasamy, 2013a).

Rodriguez et al. (2006) popisují antagonistickou aktivitu nepatogenního kmenu *Fusarium oxysporum* S6, izolovaného ze supresivních půd, vůči *Sclerotinia sclerotiorum*. Toxiny z *Fusarium oxysporum* byly izolovány pomocí chromatografických technik a pomocí spektroskopických metod identifikovány jako cyklosporin A. Antibiotikum cyklosporin A potlačuje růst a tvorbu sklerocií. Tyto testy byly prováděny v podmínkách in vitro metodou podvojných kultur a účinnost cyklosporinu A korelovala s jeho koncentrací.

### 3.2.1.3 Kompetice (Soutěžení o živiny a prostor)

Vlastnosti rhizosféry jsou důležitým atributem pro bioagens, ovlivňují jejich schopnost potlačovat půdní patogeny vyvolávající choroby rostlin. Pokud bioagens není schopné růstu



v rhizosféře, fylosféře nebo na povrchu jiných orgánů rostliny, nemůže soutěžit s patogeny o živiny a prostor nezbytné pro jeho další vývoj a kolonizaci. Různé druhy *Trichoderma* spp. identifikované jako bioagens jsou přidávány do půdy nebo jsou používány k ošetření semen. Jsou schopné se prosazovat společně s rozvíjejícím se kořenovým systémem rostlin. Mikroorganismy s lepším přijímacím mechanismem, nebo mikroorganismy s větší schopností produkce extracelulárních enzymů mají oproti ostatním organismům výhodnější podmínky. Soutěživost mezi mikroorganismy je o dusíkaté a uhlíkaté zdroje. Mikroorganismy mohou konkurovat o kořenové i ostatní exudáty rostlin. Kořenové exudáty mohou stimulovat klíčení spor a to jak patogenních, tak i spor bioagens. Interakce mezi rostlinou, patogenem a bioagens jsou proměnlivé v závislosti na půdním prostředí a mikroklimatu okolo rostlin. Příkladem takového soutěžení může být nepatogenní kmen *Fusarium oxysporum* F2, který efektivně redukuje rozvoj symptomů u lilku infikovaného *Verticillium dahliae* ve skleníku a v polních podmínkách. V laboratorních podmínkách, v testu podvojných kultur, bylo prokázáno, že daný kmen nepůsobí na patogena ani parazitismem ani antibiózou (Narayanasamy, 2013a).

#### **3.2.1.4 Kolonizace pletiv hostitele**

Některá bioagens mohou kolonizovat pletiva hostitelské rostliny dříve než patogen a tím snižovat riziko vzniku choroby. Ošetření semen bavlníku houbou *Trichoderma virens* snížilo kolonizaci kořenového systému u bavlníku patogenem *Fusarium oxysporum* a také snížilo incidenci a rozsah vadnutí klíčících rostlin. Některá bioagens mají schopnost kolonizovat již nekrotická nebo stárnoucí pletiva rostlin. Takto konkurují houbovým patogenům a efektivně jim zabraňují v další kolonizaci rostliny (Narayanasamy, 2013a).

Za použití imunohistologické metody byla porovnávána schopnost kolonizace pletiv hostitelské rostliny patogenem *Botrytis cinerea* způsobující šedou plísňovitost a jeho saprofytického antagonisty *Ulocladium atrum*. Po inokulaci obou organismů na brambořík bylo prokázáno, že *Ulocladium atrum* úspěšně kolonizuje pletiva rostliny a konkuruje tím *Botrytis cinerea*. To poukazuje na to, že *Ulocladium atrum* dokáže zamezit přístupu patogena ke zdrojům živin v listech. Výsledky této studie demonstrovaly soutěž o zdroje živin a tím přinášejí dostatečné biologické vysvětlení pro dynamické interakce mezi patogenem a bioagens (Narayanasamy, 2013a).

#### **3.2.1.5 Indukce rezistence rostlin k chorobám**

Jelikož rozvoj rezistence odrůd k chorobám pomocí šlechtění nebo biotechnologického přístupu je složitý, časově náročný nebo neproveditelný, upoutal pozornost vědců z celého

světa koncept indukce rezistence plodin k jejich chorobám navozením přirozených mechanismů rezistence. K indukci rezistence rostlin k chorobám byly používány ve velkém biotičtí i abiotičtí činitelé a to jak u zemědělských tak i u zahradnických plodin (Narayanasamy, 2013a).

**Některé příklady využití indukce rezistence rostlin k chorobám:** Byly prováděny pokusy, ve kterých se zjišťovala možnost navození rezistence u okurky a melounu s využitím patogenu *Colletotrichum lagenarium* způsobujícím antraknózu. Kromě rezistence na antraknózu vykazovaly inokulované dělohy rostlin systémově získanou rezistenci i k některým dalším chorobám způsobeným houbami, viry a bakteriemi. Pokud byly hypokotyly fazolí primárně inokulované bioagens před tím, než byly inokulované patogeny, vykazovaly navozenou rezistenci k *Rhizoctonia solani* a *Colletotrichum lindemuthianum*. Jako bioagens zde byly použity dvoujaderné druhy *Rhizoctonia*. Tito biologičtí činitelé vyvolali významný systemický nárůst aktivity obranných enzymů peroxidáz,  $\beta$  – 1, 3 – glukonáz a chitináz. Zvýšení aktivity peroxidázy a glukonázy pozitivně korelovalo s úrovní vyvolané rezistence. Rezistence rajčete k vadnutí způsobeného *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* může být indukovaná inokulací nepatogenního kmenu *Penicillium oxalicum*, což vede ke snížení významnosti choroby a menší četnosti vadnoucích rostlin. Histologické pozorování ukázalo, že u rostlin inokulovaných těmito nepatogenními kmeny nedošlo ke ztrátě kambia a rostliny vykazovaly nižší vaskulární kolonizaci patogenem. Obnovená nebo prodloužená aktivita kambia u zkoumaných rostlin vedoucí k formaci dalšího sekundárního xylému může být důvodem pro redukci rozsahu choroby. Bylo prokázáno, že této metody lze využít k ochraně citlivých odrůd rajčete k fusariovému vadnutí bez jakéhokoli vedlejšího dopadu na okolní prostředí. *Penicillium oxalicum* se ukázalo být především vhodné pro indukci rezistence k chorobám vyvolaným houbovými patogeny (Narayanasamy, 2013a).

### **3.2.1.6 Přirozená rezistence rostlin k chorobám**

Přirozená rezistence rostlin k chorobám je variabilní v závislosti na podmínkách prostředí, množství živin, vlastnostech některých mikroorganismů ve spermosféře, rhizosféře a fylosféře. Vlastnosti a skladba mikroorganismů mohou být významně ovlivněny exudáty kořenů, listů a ostatních částí rostlin. Převážná část mikroorganismů může zůstat neaktivní v půdě z důvodu limitů prostředí, mezi které patří teplota, dostupnost vody, provzdušnění a množství dostupných živin pro metabolismus a růst. Nicméně nutriční limity rhizosféry nejsou jediným aspektem ovlivňujícím mikroorganismy. Kořenový systém rostlin vylučuje

některé jednoduché cukry, aminokyseliny a mnoho dalších sloučenin. Pokud jsou tyto sloučeniny vhodné pro vývoj některých patogenů je větší pravděpodobnost, že rostlina vylučující tyto vhodné sloučeniny pro patogeny bude infikována, obzvlášť pokud je na dané patogeny citlivá. Kořenové exudáty mají vliv i na bioagens nacházející se v okolí rhizosféry (Narayanasamy, 2013a).

### **3.3 Faktory ovlivňující aktivitu bioagens**

Očekávaným cílem pěstitelů je vypěstování zdravé plodiny. Tento cíl je závislý na schopnosti rostliny překonat napadení patogenem a to jak vlastními mechanismy obrany, tak i za pomoci bioagens. Avšak účinnost a aktivita bioagens může být limitována mnoha činiteli. Aktivita bioagens může být velmi jednoduše ovlivněna některými faktory, mezi které patří: požadavky bioagens na růst a reprodukci, přežití bioagens v polních podmínkách, vlastnost patogenů, půdní podmínky, zemědělské zásahy a interakce s ostatními organismy rhizosféry a fylosféry. Všechny tři interakční komponenty (rostlina, bioagens a patogen) mohou být značně ovlivněné podmínkami prostředí, mezi které patří i půdní pH (Narayanasamy, 2013a).

## 3.4 Houby rodu *Clonostachys*

### 3.4.1 Taxonomické zařazení *Clonostachys rosea*

Taxonomické zařazení dle Schroers et al. (1999).

Říše: Fungi

Oddělení: Ascomycota

Kmen: Pezizomycotina

Třída: Sordariomycetes

Řád: Hypocreales

Čeleď: Bionectriaceae

Rod: *Clonostachys*

Druh: *Clonostachys rosea*

#### **Vědecká synonyma:**

*Clonostachys araucaria* Corda 1839,

*Stachylidium araucaria* (Corda) Bonord. 1851,

*Verticillium foexii* J. F. H. Beyma 1928,

*Verticillium intertextum* I. Isaac & R. R. Davies 1955,

*Verticillium pulverulentum* Gouw. 1924,

*Gliocladium verticilloides* Pidopl. 1930

### 3.4.2 Popis rodu

Schroers (2001) uvádí, že *Clonostachys* spp. tvoří bílé až nažloutlé, mírně vlnité mycelium, které může mít ze spodní strany nažloutlou barvu. Vytváří dva typy konidioforů s identickými výtrusy. První typ je přeslenitě rozvětvený s protáhlými 3 – 5 fialidami, na nichž jsou shluky výtrusů. Druhý typ konidioforů má štětcovitý tvar s fialidami těsně přiléhajícími k sobě a s výtrusy v nepravidelných shlucích. Optimální teplota pro růst *Clonostachys* spp. se pohybuje v rozmezí od (25 – 28)°C, minimální teploty pro růst jsou (4 – 8)°C.

Houby rodu *Clonostachys* jsou běžně přítomny v půdním prostředí na mnoha územích celého světa. Patří k antagonistům půdních fytopatogenů, které vyvolávají rozličné nemoci hospodářsky významných plodin. *Clonostachys* spp. vylučují gliotoxin, látku fungicidního charakteru, která může působit toxicky na živočišné škůdce a rostlinné patogeny.

Antagonistická aktivita *Clonostachys* spp. byla známá již v dřívějších letech, avšak větší pozornost byla věnována rodu *Trichoderma* spp., po roce 1990 došlo k posunu a zvýšení zájmu o využití hub rodu *Clonostachys* spp. v biologické ochraně rostlin. Důvodem pro tento posun byla nízká účinnost *Trichoderma* spp. v polních podmínkách, kdy teplota půdy klesla pod 18°C (Ondřej a kol., 2010b). Ondřej a kol. (2010b) též uvádějí, že v laboratorních podmínkách vykazují houby rodu *Clonostachys* největší radiální růst na umělé živné půdě Czapek – Dox Agar, ve tmě při teplotě (21 – 22)°C.

### 3.4.3 Využití *Clonostachys rosea* v biologické ochraně rostlin

Ondřej a kol. (2011) získali výsledky, které ukazují, že *Clonostachys rosea* je schopna mykoparazitické aktivity již při půdních teplotách (5 – 10)°C a tím zabezpečuje rozklad sklerocií v půdě během zimního období. V polních pokusech i testech in vitro vykazuje *Clonostachys rosea* antagonistickou aktivitu vůči fytopatogenní *Sclerotinia sclerotiorum*. Ukázalo se, že degraduje 80% sklerocií v půdě s nejvyšší životaschopností, což je stáří 1 – 2 roků (Ondřej a kol., 2010b). Cota et al. (2008) prokázali účinnost *Clonostachys rosea* při ochraně jahod proti *Botrytis cinerea*. Pro zvýšení výnosu je podle autorů nutná dvoutýdenní aplikace *Clonostachys rosea*. Cota et al. (2009) uvádějí výsledky svých pokusů, které dokazují, že nejúspěšnější kombinací v ochraně jahodníku před *Botrytis cinerea* jsou postřiky *Clonostachys rosea*, postřiky fungicidy a odstraňování posklizňových zbytků. Při hodnocení těchto tří zásahů samostatně se nejvíce osvědčily postřiky *Clonostachys rosea*. Chemická ochrana byla účinná na plochách s posklizňovými zbytky. Pouze odstranění posklizňových zbytků byl nejméně účinný způsob pro snížení výskytu šedé plísňovitosti a to jak na květech jahodníku, tak i na plodech. Xue (2003) při pokusech v ochraně krmného hrachu v Kanadě získal výsledky, které dokazují účinnost kmenu *Clonostachys rosea* ACM941 vůči *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aphanomyces euteiches* a *Mycosphaerella pinodes*. Aplikací tohoto kmenu, došlo ke zvýšení klíčivosti semen hrachu o 44% a k výraznému snížení jmenovaných fytopatogenních hub. Izolovaný kmen *Clonostachys rosea* IK726 poskytuje vysoký stupeň ochrany vůči hlavním fytopatogenům obilnin: *Fusarium culmorum*, *Tilletia tritici*, *Bipolaris sorokiniana*. Tento kmen též zabezpečuje ochranu semen mrkve napadených patogenní *Alternaria* spp., což umožňuje normální vyklíčení semen a růst zdravých sazenic (Jensen et al., 2004). Parazitismus *Clonostachys rosea* na *Bipolaris sorokiniana* prokázali i Ondráčková a kol. (2013), přitom různé kmeny *Clonostachys rosea* vykazovaly různou míru parazitismu.

*Clonostachys rosea* se nachází v půdním prostředí pastvin hospodářských zvířat, v lesních půdách, na loukách, obdělávaných půdách, vřesovištích, i v oblasti pobřežních půd. Studie ukazují, že je možné využít *Clonostachys rosea* pro biologickou ochranu proti parazitickým hlísticím u hospodářských zvířat. Deset kmenů této houby, izolované z půdního prostředí kozích pastvin, bylo použito při pokusech. Prokázalo se, že při aplikaci spor některých z těchto kmenů *C. rosea* se snižuje množství parazitických hlístic na pastvinách a tím dochází ke snížení jejich výskytu u hospodářských zvířat (Baloyi et al., 2011). Prokinová (2013) předpokládá, že by se do budoucna dalo využít přípravků na bázi *Clonostachys rosea* při ochraně polních plodin na podzim, k potlačení *Sclerotinia sclerotiorum*, *Claviceps purpurea* a *Rhizoctonia* spp.. Ondřej a kol. (2012) se zmiňují o biologickém přípravku na bázi hub *Clonostachys rosea* a *Trichoderma asperellum* pro ochranu okrasných trávníků proti *Pythium* spp., *Alternaria* spp.. Uvádějí také, že tyto houby pozitivně ovlivňují rozklad organické hmoty v půdě a mají příznivý vliv na příjem živin a celkový vzhled trávníku.

Některé kmeny *Clonostachys rosea* se osvědčily při biologické ochraně kakaovníku (*Theobroma cacao*) v Peru a Kostarice proti významným chorobám kakaovníku, které způsobují až 30% ztráty na výnosech. Jejich původci jsou *Phytophthora* spp., *Moniliophthora roreri*, *Moniliophthora perniciosa* (Kraus et al., 2013). Reeh and Cutler (2013) uvádějí výsledky skleníkových pokusů v Kanadě, ve kterých bylo prokázáno, že *Clonostachys rosea* významně snižuje rozšíření *Botrytis cinerea* při ochraně *Vaccinium angustifolium* (borůvka úzkolistá). Rodríguez et al. (2011) prováděli laboratorní a skleníkové pokusy s kmenem *Clonostachys rosea* BAFC3874. V testu podvojných kultur se prokázala antagonistická aktivita *Clonostachys rosea* vůči patogenním *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*. Další experimenty byly prováděny v nádobových pokusech ve skleníku na sóje a salátu. Semena rostlin byla vysazena do propařeného substrátu, který byl inokulován *Clonostachys rosea* BAFC3874 a po době 3 – 6 dnů byly vzešlé rostliny přesazené do substrátu inokulovaného *Sclerotinia sclerotiorum*. Výsledky ukazují, že menší úmrtnost rostlin byla u variant ošetřených *Clonostachys rosea* a u variant *Clonostachys rosea* + *Sclerotinia sclerotiorum* byly ztráty 0%. Varianty pouze se *Sclerotinia sclerotiorum* vykazovaly úmrtnost 77,5%. Délka nadzemní části byla ve všech ošetřených variantách o něco kratší oproti kontrole. Jensen et al. (2002) uvádějí, že *Clonostachys rosea* vykazovala antagonistickou aktivitu vůči *Bipolaris sorokiniana*.

Zou et al. (2010) píší o využití *Clonostachys rosea* jako nematofágních hub při biologické ochraně proti parazitickým hlísticím, které škodí rostlinám i zvířatům. Gen prC zajišťuje vylučování enzymů tzv. serinových proteáz (chymotrypsin, trypsin, elastáza) zodpovědných

za rozklad kutikuly nematod tím, že štěpí peptidové vazby proteinů. Studie prokázaly, že zvýšená exprese serinových proteáz u *Clonostachys rosea* je indukována přítomností kutikul hmyzu a nematod. Naopak k inhibici exprese těchto enzymů dochází při zvýšeném množství glutaminu a amoniaku v půdě.

V mnoha zemích je dominantní produkce jahod ve sklenících, avšak podmínky ve sklenících podporují vznik a rozvoj šedé plísnovitosti způsobené houbou *Botrytis cinerea*, která může způsobovat ztráty na výnosech až 50%. Aplikace fungicidních přípravků proti *Botrytis cinerea* je v mnoha případech velmi náročná, jelikož rostliny a plody jsou v různých vývojových fázích a nemusela by být dodržena ochranná lhůta. Limitujícími faktory pro chemické ošetření jahod je též nárůst rezistentních kmenů *Botrytis cinerea* a požadavky společnosti na bezreziduální produkci. Dalším způsobem jak omezit výskyt *Botrytis cinerea* je použití biologické ochrany a to houby *Clonostachys rosea*. Cílem publikované studie bylo prokázání antagonistické aktivity *Clonostachys rosea* vůči *Botrytis cinerea* a stanovení optimálních podmínek produkce spor *C. rosea* pro komerční využití. Ukázalo se, že největší produkci spor vykazuje *C. rosea* při vlhkosti 46% (Viccini et al., 2007). Ze sklerocií *Claviceps purpurea*, pocházejících z žita, bylo izolováno dvacet druhů hub. V podmínkách in vitro byla následně testována antagonistická aktivita těchto hub vůči anamorfnímu stádiu námele *Sphacelia septum*. Vysokou mykoparazitickou aktivitu vykazovaly pouze dvě z testovaných hub: *Clonostachys rosea* a *Trichoderma harzianum*. Střední mykoparazitická aktivita byla zaznamenána u *Ulocladium* sp., *Clonostachys catenulata*, *Trichoderma hamatum* a *Trichothecium roseum*. Též se testovala antagonistická aktivita izolovaných hub vůči *Sclerotinia sclerotiorum* v in vitro podmínkách, v tomto případě vykazovaly největší antagonistickou aktivitu pouze *Clonostachys rosea* a *Trichoderma harzianum*. V polních pokusech byl posuzován vliv na životaschopnost a rozklad sklerocií námele. Životaschopnost sklerocií byla ovlivněna jejich umístěním, jejich stářím, hloubkou umístění a přítomností konidií *Clonostachys rosea*. Nejvyšší životaschopnost vykazovala sklerocia ve stáří 1 – 2 let, sklerocia ve věku od 3 let a více již ztrácely schopnost klíčení. Prokázalo se, že sklerocia ve stáří 1 – 2 let byla z 80% degradována *Clonostachys rosea*. Degradace starších sklerocií byla způsobena bakteriemi, roztoči, hlísticemi a též houbami z rodu *Trichoderma*, *Fusarium*, *Clonostachys* atd (Ondřej et al., 2010a).

### 3.5 Biologické přípravky využívané v ČR

Přípravek na bázi houby *Pythium oligandrum* (oospory) – Polyversum biogarden má podle údajů výrobce tři mechanismy účinků:

1. Přímo napadá patogenní organismus a enzymaticky jej rozkládá.
2. Indukuje rezistenci k listovým a jiným patogenům, tím že stimuluje mechanismus tvorby morfologických a biochemických bariér v rostlinných pletivech.
3. Stimuluje růst rostlin – indukuje produkci růstově stimulujících látek, čímž dochází ke zvýšenému příjmu fosforu a mikroprvků rostlinou.

Přípravek je formulován jako smáčitelný prášek a lze jej aplikovat formou zálivky, postřiku, namáčením kořenů před výsadbou, mořením osiva. Uplatňuje se při ochraně řepky, máku, slunečnice, pšenice, žita, ječmene, tritikale, jahodníku, plodové a brukvovité zeleniny, chmelu, révy vinné, ve školkách lesních a zahradních dřevin i při ochraně golfových a okrasných trávníků. Hlavní choroby, proti kterým se přípravek používá, jsou fytophthora hniloba rhizomů a plodů jahodníku, červená hniloba jahodníku, plíseň šedá, helmintosporiíza máku, plíseň maková, fomové černání stonku, *Sclerotinia sclerotiorum* (Anon. 1, 2003, leták přípravku).

Postřikový biofungicid Contans WG, ve formě dispergovatelného granulátu na bázi houby *Coniothyrium minitans* působí na sklerocia fytopatogenních hub *Sclerotinia sclerotiorum* a *Sclerotinia minor*. *Coniothyrium minitans* infikuje sklerocia patogenních hub po aplikaci spor do půdy nebo na posklizňové zbytky. K bouřlivému rozvoji parazitující houby dochází zejména po aplikaci na posklizňové zbytky. Houba se rozšiřuje na okolní sklerocia, která nebyla primárně postřikem zasažena. K rozvoji houby dochází v povrchových vrstvách půdy v hloubce deseti centimetrů při teplotách vyšších než 1°C. Při promrznutí půdy nedochází k odumření, ale pouze k pozastavení růstu *Coniothyrium minitans*. Přípravek Contans se využívá při ochraně řepky, hořčice, máku, slunečnice, luskovin, zelenině a okrasných rostlin (Anon. 2, 2003, leták přípravku).

Do nedávna byl v ČR využíváný přípravek Supresivit na bázi houby *Trichoderma harzianum*, která kolonizovala povrch kořenů rostliny a aktivně parazitovala půdní fytopatogeny. Přípravek se využíval k ochraně lesních a okrasných dřevin, okrasných rostlin, zeleniny, obilnin, kukuřice a řepky. Na bázi stejné houby *Trichoderma harzianum* T – 39 se využíval i přípravek pro ochranu okurky a révy vinné s komerčním názvem Trichodex 20 WP. Tento přípravek působil redukcí populace *Botrytis cinerea* tím, že docházelo k soutěžení mezi *T. harzianum* a patogenem o živiny a prostor na povrchu listu hostitelské rostliny.



Platnost těchto přípravků byla v České republice ukončená (Anon. 3, n. d., leták přípravku). Ondřej a kol. (2010b) se zmiňují o pomocném půdním přípravku Gliorex na bázi hub *Clonostachys rosea* kmen SCL – 01 a *Trichoderma asperellum*. Přípravek je registrován jako pomocný rostlinný přípravek. Zvyšuje příjem živin z půdy, podílí se na ekto- a endomykorhize kořenů rostlin, snižuje výskyt a škodlivost patogenních hub přenosných půdou a osivem, v půdě rozkládá sklerocia hub (námel, hlízenka) i při nižších teplotách (od 7 °C), pozitivně ovlivňuje výnosové parametry a je kompatibilní s některými fungicidními mořidly osiv. Je použitelný v kmínu, cibulovinách, obilninách, pro ošetření osiva trav a luskovin (Anon. 4, n. d., leták přípravku). Jako pomocné rostlinné přípravky jsou registrovány i další přípravky na bázi mikroorganismů, které posilují vitalitu a odolnost rostlin k napadení patogeny. Jsou to např. přípravky řady Symbivit založené na mykorrhizních houbách (Anon. 5, 2014), přípravek Rhizobin, který obsahuje tzv. hlízkové bakterie rodu *Rhizobium* a je určený pro luskoviny (Anon. 6, 2008) a přípravek Prometheus, jehož účinnou složkou je bakterie *Pseudomonas veronii*, který je určen k ochraně řepky proti půdním patogenům (Anon. 7, 2007).

### **3.6 Vliv pH na některá houbová bioagens, účinnost biologické ochrany a rozvoj patogenů**

Chatterton and Punja (2010) prováděli skleníkový pokus kde na kořeny okurky, pěstované v kontejnerech se substrátem, byly naočkované konidie *Clonostachys rosea* f. *catenulata* kmen J1446. Prokázalo se, že hlavními faktory, které ovlivňovaly kolonizaci *Clonostachys rosea* f. *catenulata* bylo pH substrátu a teplota vzduchu ve skleníku. Hustota populace *Clonostachys rosea* f. *catenulata* byla vyšší, pokud se v substrátu udržovalo pH 5; 6; 7 a teplota vzduchu byla v rozmezí (18 – 22)°C. Chen et al. (2006) uvádějí, že pro optimální růst v in vitro podmínkách saprotrofní houby *Clonostachys compactiuscula* s mykoparazitickým potenciálem je nejvhodnější pH média 8,5. Garcia et al. (2003) uvádějí, že *Rosellinia* spp. způsobuje značné ztráty na výnosech kakaovníku a to zejména v kyselých půdách bohatých na organické látky. V rámci skleníkových pokusů byla hodnocena široká škála antagonistických hub a optimální pH pro jejich antagonistickou aktivitu vůči *Rosellinia* spp. Nejúčinnější kombinace bioagens se skládala z *Trichoderma harzianum* kmen ARB4, *T. harzianum* T22 a *Clonostachys rhizophaga*. Ukázalo se, že *Trichoderma harzianum* kmen ARB4 preferuje hodnotu pH 4. *T. harzianum* T22 rostla nejlépe při pH 6. *Clonostachys rhizophaga* neprokázala žádnou pH preferenci. Rostliny kakaovníku rostou v půdě v rozmezí

pH 4,5 – 8, optimálně však při pH 6,5. Proto se předpokládá, že nejúčinnější biologická ochrana kakaovníku vůči *Rosellinia* spp. spočívá ve zvýšení půdního pH vápněním a kombinací těchto tří bioagens, kteří poskytují širší škálu hodnot pH, ve kterých vykazují antagonistickou aktivitu. V tomto případě vápnění spolu s uvedenými bioagens vykazovaly synergický účinek a účinnost biologické ochrany se stupňovala se zvyšujícím se pH.

Penn and Daniel (2013) uvádějí, že pro kultivaci *Sclerotinia sclerotiorum* D - E7 na živném médiu v podmínkách in vitro, bylo použito pH 6,5. Yadav et al. (2012) ve své studii představují vliv kyseliny šťavelové na rozvoj patogenity *Sclerotinia sclerotiorum* v in vitro podmínkách. Kyselina šťavelová je jednou z nejsilnějších toxických organických sloučenin, kterou vylučují vláknité houby, což vede k tvorbě vápenatých iontů a pektolytických enzymů. Následně dochází k porušení buněčných stěn rostlin pektolytickými enzymy. Produkce kyseliny šťavelové je jedním z důležitých faktorů pro vývoj patogenity *Sclerotinia sclerotiorum*. Bylo prokázáno, že některé houby používané pro biologickou ochranu rostlin snášejí vyšší koncentrace kyseliny šťavelové, degradují ji a přispívají ke snížení napadení rostlin patogenní *Sclerotinia sclerotiorum*. V této studii se uvádí, že degradaci kyseliny šťavelové a následné snížení četnosti napadení patogenem zajišťují houby *Coniothyrium minitans*, *Trichoderma viride* a nepatogenní kmeny *Fusarium oxysporum*.

Li et al. (2012) zjistili, že *Botrytis cinerea* i další patogenní houby vylučují řadu proteinů, které hrají důležitou roli v úspěšném napadení rostliny těmito patogeny. Okolní pH reguluje expresi vylučovaných proteinů patogenů. V této studii je uvedeno, že pro úspěšnou infekci rostliny patogenní *Botrytis cinerea* B05.10 je nejvhodnější pH 6.

Muhsin and Selman (2012) kultivovali patogenní *Rhizoctonia solani* v in vitro podmínkách na živné půdě PDA (Potato dextrose agar). Při úpravě pH, které se pohybovalo od hodnoty 4 do hodnoty 9, zjistili že *Rhizoctonia solani* vykazuje nejlepší růst při hodnotě pH 6 a její růst je silně inhibován hodnotami pH 9 a 4.

Aleandri et al. (2007) uvádějí, že *Fusarium culmorum* infikuje sazenice pšenice vlivem vylučovaných enzymů, jako jsou pektin lyázy a polygalakturonázy. Ve své studii zkoumali vliv pH na vylučování těchto enzymů. Pokusy prováděli na hodnotách pH 5; 6; 7 a 8. Zjistili, že k nejvyšší produkci pektin lyáz dochází při hodnotách pH 5, na ostatních hodnotách pH byla produkce nižší. Produkce polygalakturonáz byla zvýšená též při hodnotě pH 5, na ostatních hodnotách pH byla produkce tohoto enzymu nízká, nebo zcela chyběla.

## 4 Materiál a metoda

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Použité kultury hub

Použité izoláty *Clonostachys rosea*:

- CCF4181 *Clonostachys rosea* f. *rosea* izolát ze sklerocia *Claviceps purpurea* (dále označován jako **Clon 1**)
- CCF4182 *Clonostachys rosea* f. *rosea* izolát z kořenů sóji (dále označován jako **Clon 2**)
- CCF4183 *Clonostachys rosea* f. *rosea* izolát z kořenů lnu (dále označován jako **Clon 3**)
- CCF4184 *Clonostachys rosea* f. *catenulata* izolát z větví rybízu (dále označován jako **Clon 4**)

Všechny izoláty byly izolovány na pracovišti AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s r.o. v Šumperku a byly poskytnuty KOR (katedra ochrany rostlin) ČZU (Česká zemědělská univerzita v Praze) v rámci spolupráce při řešení projektu.

Vyvíjený přípravek, který byl používán v pokusech, obsahuje všechny čtyři izoláty *Clonostachys rosea*. Výrobce tohoto přípravku je firma Fytovita, s.r.o., která poskytla naší katedře pro pokusné účely vzorky přípravků. V tabulkách a grafech je tento vyvíjený přípravek označován pracovním názvem **Clon**.

Použité fytopatogenní houby:

- *Sclerotinia sclerotiorum* (izolát z osiva slunečnice, izolováno na KOR, ČZU)
- *Fusarium culmorum* (izolát ze sbírky VÚRV - Výzkumný ústav rostlinné výroby v Praze Ruzyni)
- *Rhizoctonia solani* (izolát z napadené rostliny penízku rolního, izolováno na KOR, ČZU)
- *Botrytis cinerea* (izolát z napadené rostliny řepky, izolováno na KOR, ČZU)

#### 4.1.2 Materiál používaný v laboratoři k testům in vitro

- Plastové Petriho misky s víčkem o průměru 90 mm, alobal
- Sterilní laboratorní jehly, jednorázové sterilní očkovací kličky, pinzeta, nůžky

- Kleště, korkovrty s průměrem 10 a 12 mm
- Kahan, Erlenmeyerova baňka 0,5 l
- Umělé živné půdy: Czapek Dox Agar (Cz – D), Potato dextrose agar (PDA) – Himedia Laboratories
- pH metr se skleněnou elektrodou, automatická pipeta
- roztok hydroxidu draselného (pH 12,5), kyselina šťavelová (pH 2,6)
- antibiotikum tetracyklin, 70 – 90 % líh pro dezinfekci

### **4.1.3 Materiál používaný ke skleníkovým pokusům**

- Plastové květinové truhlíky (pro cca 2 kg substrátu)
- Zahradnický substrát (Agro, nákup v zahradním centru)
- Dolomitický vápenec, zakoupeno v maloobchodní síti (zahrádkářské balení)
- Kyselina šťavelová (Lach-Ner, s.r.o.)

#### **4.1.3.1 Osivo**

- Pšenice ozimá, odrůda Bohemia, poskytla firma Česká Osiva
- Hrách, odrůda Grandera, zakoupeno v maloobchodní síti (zahrádkářské balení)

## **4.2 Metoda**

### **4.2.1 In vitro pokusy**

Tyto pokusy probíhaly v období od října roku 2012 do září roku 2013.

#### **4.2.1.1 Vliv pH živné půdy na rychlost růstu testovaných izolátů *Clonostachys rosea***

K testům in vitro byla použita živná půda Czapek – Dox Agar (Cz – D), ve které bylo upraveno pH pomocí kyseliny šťavelové pro kyselé hodnoty pH a hydroxidu draselného pro zásadité hodnoty pH. Hodnoty pH se u tohoto pokusu pohybovaly od 4,2 do 9,8. Chemikálie byly přimíchávány do tekutého sterilního agaru o teplotě 55°C a hodnota pH se měřila pomocí pH metru se skleněnou elektrodou. Též do tekutého agaru bylo přidáno antibiotikum (tetracyklin) a následně za sterilních podmínek ve flowboxu byl agar rozlit

na plastové Petriho misky o průměru 90 mm. Takto připravený agar byl ponechán k zatuhnutí. Korkovrtem o průměru 10 mm, omytém v lihu a ožehlým nad plamenem kahanu, byly ze 7 – 10 dnů starých kultur jednotlivých izolátů hub vykrájeny terčíky. Do připravených Petriho misek s agarem byl vložen vždy jeden terčík od každého izolátu do středu misky. Každá varianta měla tři opakování. Misky byly uzavřeny a umístěny do termostatu (tma, 21°C), kontroly s měřením radiálního růstu byly prováděny každé tři dny, po dobu dvanácti dnů.

#### **4.2.1.2 Vliv pH na antagonistickou aktivitu *Clonostachys rosea* z přípravku vůči vybraným patogenům**

Vliv pH na antagonistickou aktivitu *Clonostachys rosea* byl opět testován v podmínkách in vitro. V těchto testech již byl použit konkrétní vzorek vyvíjeného biologického přípravku na bázi *Clonostachys rosea* (čtyř kmenů) a testovala se jeho antagonistická aktivita na různých hodnotách pH s vybranými patogeny (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium culmorum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*).

Jako živná půda byl použit Czapek Dox Agar s dodaným antibiotikem (tetracyklin). Do tekutého agaru při teplotě 55°C byly přidávány podle požadované hodnoty pH buď kyselina šťavelová, nebo hydroxid draselný. Pomocí pH metru se skleněnou elektrodou byly stanoveny hodnoty pH v agaru od 4,5 do 7,5 a takto upravený agar byl rozlit za sterilních podmínek ve flowboxu na plastové Petriho misky o průměru 90 mm. Připravený agar byl ponechán k zatuhnutí.

Vzorek biologického přípravku ve formě prášku byl nanesený pomocí jednorázových sterilních očkovacích kliček, ve sterilním prostředí na Petriho misky se živnou půdu Cz – D a umístěn do termostatu (tma, 21°C). Takto vytvořené kolonie sloužily pro zdroj terčků. Terčíky patogenů byly získány z kolonií vyrostlých na živné půdě Cz – D, kam byly naočkovány sterilními jehlami. Inkubace patogenů probíhala v termostatu za stejných podmínek, jako pro biologický přípravek (tma, 21°C).

Korkovrtem o průměru 12 mm, omytém v lihu a ožehlým nad plamenem kahanu, byly z narostlých kultur vytvořeny terčíky. Následně do Petriho misek byly sterilními jehlami vloženy dva terčíky hub, z nichž jeden terčík byl kulturou *Clonostachys rosea* z přípravku a druhý příslušného patogena. Terčíky byly umístěny přibližně 2,5 cm od sebe. Sledoval se růst hub a jejich interakce na příslušném pH. V kontrolní variantě byl na agar s upraveným pH vložen vždy jeden terčík (kultura z biologického přípravku nebo patogen) a sledoval se jejich

samostatný růst. Měření bylo prováděno každé 4 dny, po dobu 16 dnů. Každá varianta měla 6 opakování.

#### **4.2.1.3 Interakce *Clonostachys rosea* z přípravku s vybranými patogeny na živné půdě Cz – D**

Korkovrtem o průměru 12 mm, omytém v lihu a ožehlým nad plamenem kahanu, byly z narostlých kultur *Clonostachys rosea* a patogenů (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium culmorum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*) vytvořeny terčíky. Následně do Petriho misek se živnou půdou Czapek Dox Agar (pH 5,8) byly sterilními jehlami vloženy dva terčíky hub, z nichž jeden terčík byl kulturou *Clonostachys rosea* z přípravku a druhý příslušného patogena. Terčíky byly umístěny přibližně 2,5 cm od sebe. Inkubace probíhala po dobu šestnácti dnů (tma, 21°C). Každá varianta měla 6 opakování. Hodnotila se míra antagonistické aktivity *C. rosea* měřením radiálního růstu *C. rosea* a příslušného patogena. Měření bylo prováděno každé čtyři dny.

#### **4.2.2 Skleníkové pokusy**

Tyto pokusy probíhaly v období od října roku 2013 do ledna roku 2014.

##### **4.2.2.1 Vliv pH půdy na antagonistickou aktivitu *Clonostachys rosea* z přípravku vůči vybraným fytopatogenům**

Dvanáct plastových truhlíků bylo naplněno vždy 2 kg zahradnického substrátu. Čtyři truhlíky obsahovaly neupravený zahradnický substrát s výchozím pH 6,3. Pro úpravu půdního pH na hodnotu 7 byl použit dolomitický vápenec, 40 g dolomitického vápence bylo rozpuštěno ve dvou litrech vody. Půl litru připraveného roztoku bylo řádně promícháno s obsahem truhlíku (2 kg substrátu). Takto upraveny byly též čtyři truhlíky. Další čtyři truhlíky se zahradnickým substrátem byly obdobným způsobem upraveny na pH 4,5. Pro snížení pH bylo použito 100 gramů kyseliny šťavelové, která byla rozpuštěná do dvou litrů vody. Do každého ze čtyř truhlíků bylo aplikováno 0,5 litrů roztoku. Pro zachování srovnatelné půdní vlhkosti bylo do neupraveného substrátu přidáno 0,5 litrů vody. Takto připravené substráty byly ponechány do příštího dne, kdy byly do substrátu aplikovány patogeny a vyséváno osivo (kapitoly 4.2.3.1, 4.2.3.1 a 4.2.3.3). Hodnota pH substrátu byla měřená na začátku a na konci pokusů.

Dávky dolomitického vápence a kyseliny šťavelové byly stanoveny v laboratorních podmínkách na vzorcích půd zahradnického substrátu pomocí pH metru.

#### **4.2.2.1.1 Vliv moření osiva hrachu biologickým přípravkem na bázi *Clonostachys rosea* na růst a napadení patogenem *Sclerotinia sclerotiorum* při různých hodnotách pH**

Do šesti truhlíků (2 x pH 6,3; 2 x pH 7 a 2 x pH 4,5) byl vpraven patogen *Sclerotinia sclerotiorum* z předem narostlých kultur na Petriho miskách v laboratoři. Do každého truhlíku byl aplikován rozdrobený obsah jedné Petriho misky + 10 sklerocií daného patogena. Do variant bez patogenu byl k substrátu přidán čistý agar Cz – D. Následně bylo do každého truhlíku vyseto dvacet semen hrachu. Do šesti truhlíků z dvanácti byl vyšetý hrách namořený biologickým přípravkem na bázi *Clonostachys rosea*. Moření v přebytku, metoda wet powder (zvlhčeného prášku).

Vznikly tak 4 varianty pro každou hodnotu pH:

1. Neošetřený hrách
2. Ošetřený hrách
3. Neošetřený hrách + *Sclerotinia sclerotiorum*
4. Ošetřený hrách + *Sclerotinia sclerotiorum*

V průběhu pokusu byly rostliny zavlažovány v pravidelných intervalech a po pěti týdnech byl pokus vyhodnocen. Hodnotil se počet vzešlých rostlin, počet napadených rostlin patogenem, výška nadzemní části rostlin a délka kořenového systému. Po dvou měsících od vyhodnocení rostlin byl vysypán obsah truhlíku a hledala se sklerocia *S. sclerotiorum*. Hodnotilo se, zda jsou napadena *Clonostachys rosea*.

#### **4.2.2.1.2 Vliv moření osiva pšenice biologickým přípravkem na bázi *Clonostachys rosea* na růst a napadení patogenem *Fusarium culmorum* při různých hodnotách pH**

Do šesti truhlíků (2 x pH 6,3; 2 x pH 7 a 2 x pH 4,5) byl inokulován patogen *Fusarium culmorum* z předem narostlých kultur na Petriho miskách v laboratoři. Do každého truhlíku byl přidán rozdrobený obsah jedné Petriho misky. Do variant bez patogenu byl k substrátu aplikován čistý agar Cz – D. Následně bylo do každého truhlíku vyseto třicet semen pšenice. Do šesti truhlíků z dvanácti byla vyšetá pšenice namořená biologickým přípravkem na bázi *Clonostachys rosea*. Moření v přebytku, metoda wet powder (zvlhčeného prášku).

Vznikly tak 4 varianty pro každou hodnotu pH:

1. Neošetřená pšenice

2. Ošetřená pšenice
3. Neošetřená pšenice + *Fusarium culmorum*
4. Ošetřená pšenice + *Fusarium culmorum*

V průběhu pokusu byly rostliny zavlažovány v pravidelných intervalech a po pěti týdnech byl pokus vyhodnocen. Hodnotil se počet vzešlých rostlin, počet napadených rostlin patogenem, výška nadzemní části rostlin a délka kořenového systému.

#### **4.2.2.1.3 Vliv moření osiva pšenice biologickým přípravkem na bázi *Clonostachys rosea* na růst a napadení patogenem *Rhizoctonia solani* při různých hodnotách pH**

Tento pokus je identický s předchozím pokusem popsáním v kapitole 4.2.3.2, s jediným rozdílem. Místo patogena *Fusarium culmorum* zde byl použit patogen *Rhizoctonia solani*. Tento pokus měl dvě opakování. Hodnoty uvedené v tabulce v kapitole výsledky jsou průměrné hodnoty dvou opakování.

U rostlin s příznaky napadení byly izolovány původci choroby (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium culmorum*, *Rhizoctonia solani*) na umělou živnou půdu PDA. Kořenové krčky a kořeny rostlin s příznaky napadení byly pomocí sterilní pinzety umístěny do Petriho misek s umělou živnou půdou PDA. Inkubace probíhala po dobu 14 dnů (tma, 21°C).

Nad rámec cílů stanovených pro tuto diplomovou práci byla ověřována životnost konidií *Clonostachys rosea* v průběhu skladování. Ověření životnosti je důležité z hlediska zachování účinnosti přípravku i po déletrvajícím skladování.

#### **Materiál**

Kultivace hub *Clonostachys* z přípravku probíhala na Soya – trypton agar a na Czapek – Dox agar. Byly použity uzavřené alu – sáčky s obsahem 10 g přípravku příslušné výrobní šarže dodané výrobcem, které byly na pracovišti k dispozici. Pro poslední hodnocení již nebyl k dispozici vzorek šarže 16EX1212.

#### **Metoda**

Hodnocení bylo provedeno v roce 2013. Uzavřené sáčky byly skladovány při laboratorní teplotě (cca 24 °C), která ale v letních měsících (červenec, srpen) dosáhla maxima 35 °C. Testováno bylo pět šarží – 24EX1221, vyrobená v květnu 2012, 09EX1310, vyrobená v březnu 2013, 16321212 vyrobená v dubnu 2012. U šarže 16EX1212 nebylo uvedeno přesné datum výroby, byla vyrobená koncem roku 2012. Šarže 33EX1237 byla vyrobená počátkem roku 2013 (přesné datum neuvedeno). Tyto šarže obsahovaly směs 4 kmenů *Clonostachys*



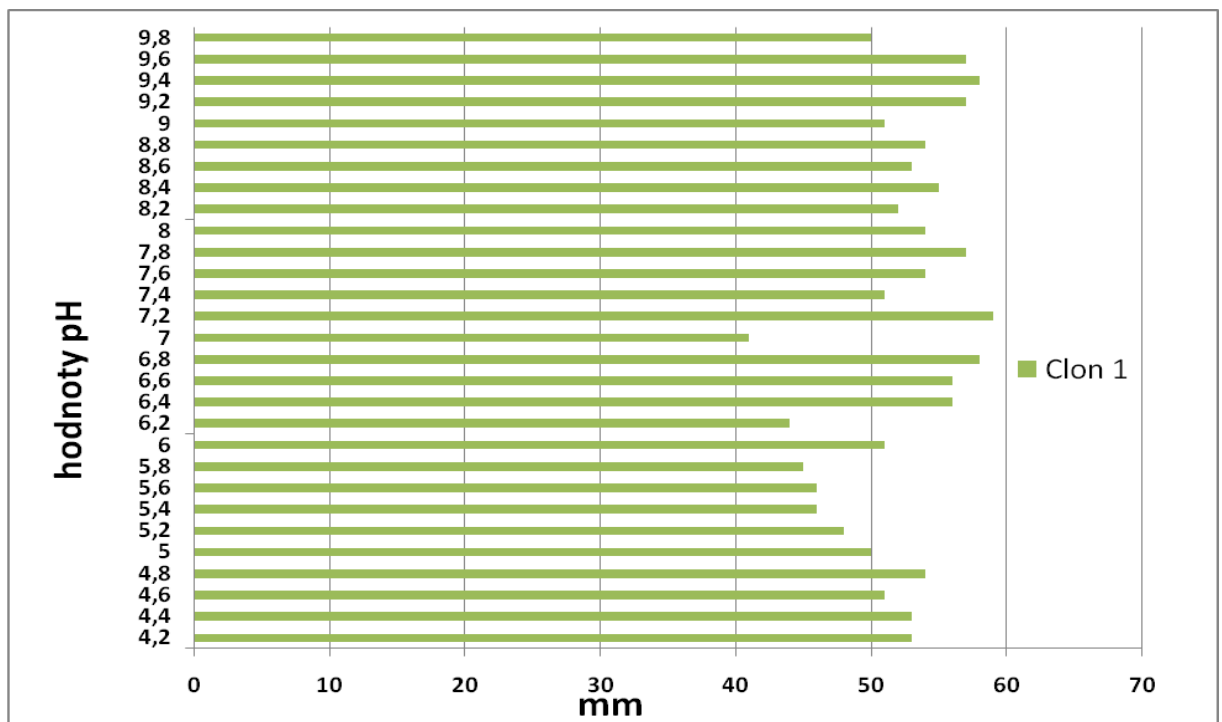
*rosea*. Byl zjišťován počet životaschopných spor v 1 g přípravku, čtyřikrát v průběhu doby skladování. Výchozí titer spor byl u všech šarží řádově  $10^7$ .

1 ml suspenze, ředění  $10^{-4}$ , bylo pipetováno do Petriho misky (90 mm) a poté zalito příslušnou živnou půdou. Inkubace probíhala 7 dní, ve tmě při 21 °C. Kolonie *Clonostachys* byly následně počítány na počítadle kolonií, byl proveden přepočít na 1 g přípravku.

## 5 Výsledky

### 5.1 Hodnocení vlivu pH živné půdy na rychlost růstu testovaných izolátů *Clonostachys rosea* – in vitro

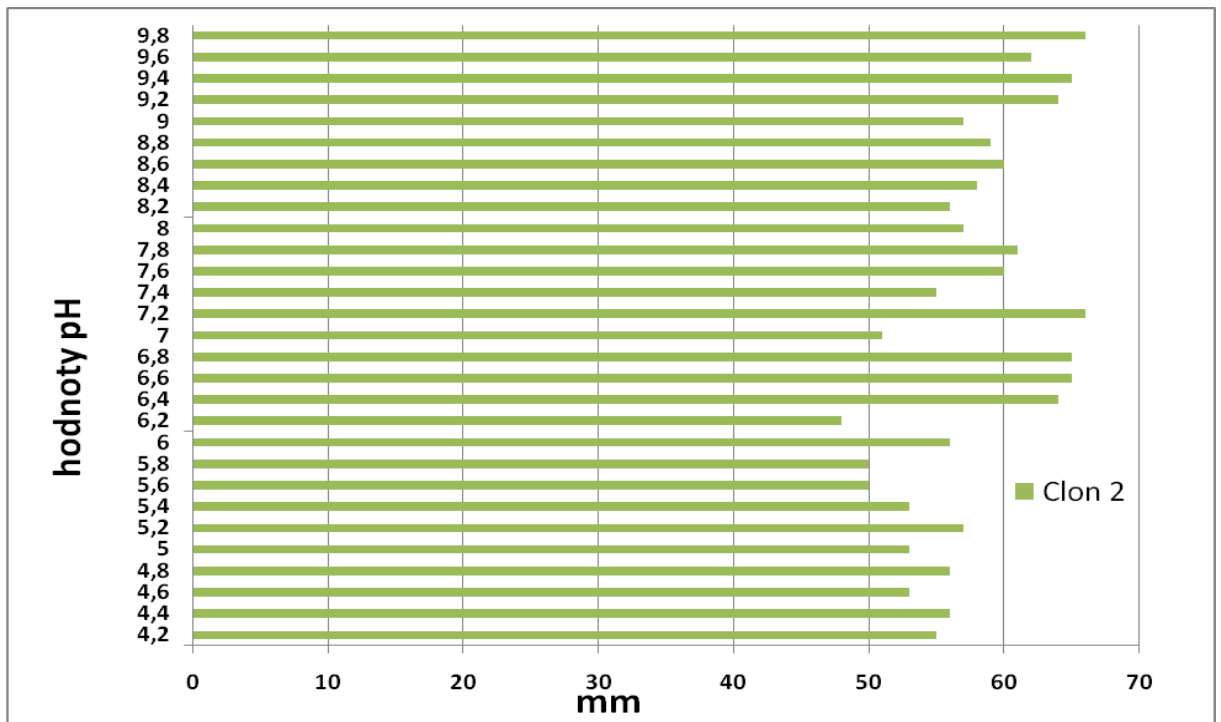
Graf 1: Růst Clon 1 při různých hodnotách pH, stáří 15 dní – velikost kolonie.



Graf 1 zobrazuje výsledky radiálního růstu prvního z izolátů houby *Clonostachys rosea*, pod pracovním názvem Clon 1 při různých hodnotách pH. Do grafu byly použity výsledky z patnáctého dne kultivace a jsou vyjádřeny v mm.

Z grafu je patrné, že Clon 1 vykazuje největší radiální růst při hodnotách pH okolo 6,4 – 6,8; 7,2 a 9,2 – 9,6.

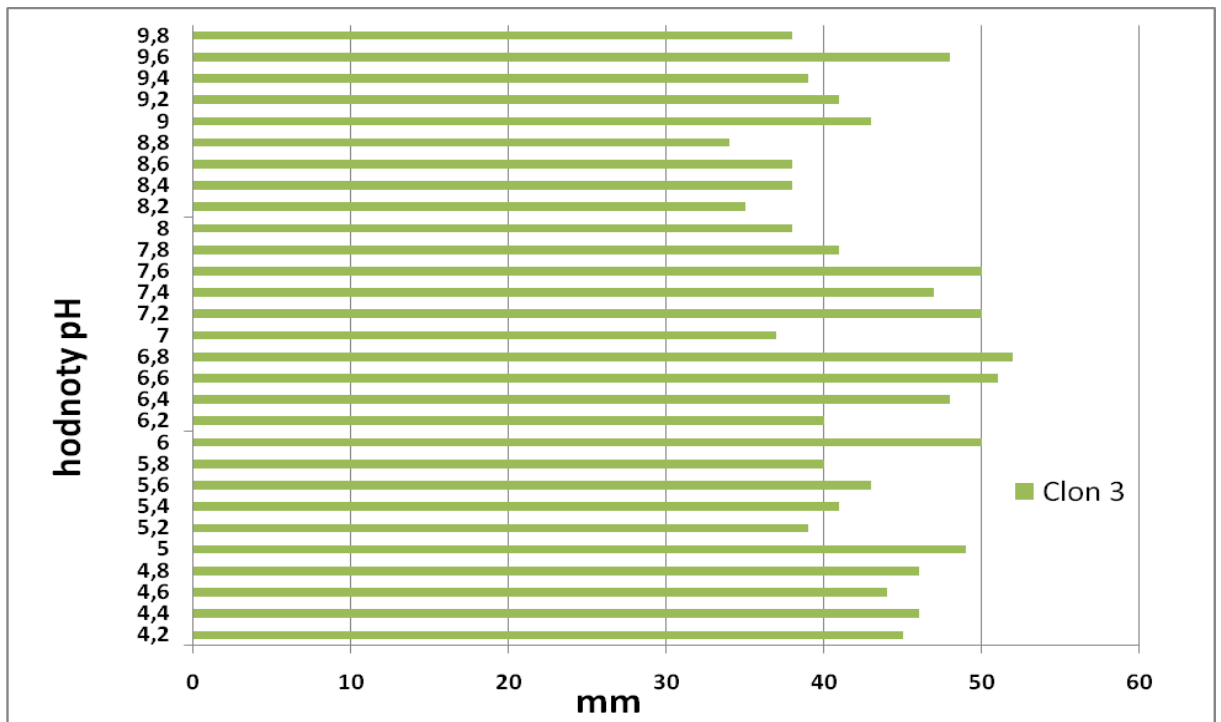
**Graf 2: Růst Clon 2 při různých hodnotách pH, stáří 15 dní – velikost kolonie.**



V grafu 2 je znázorněný růst na různých hodnotách pH dalšího z izolátů houby *Clonostachys rosea* Clon 2. Do grafu byly použity výsledky z patnáctého dne kultivace a jsou vyjádřeny v mm.

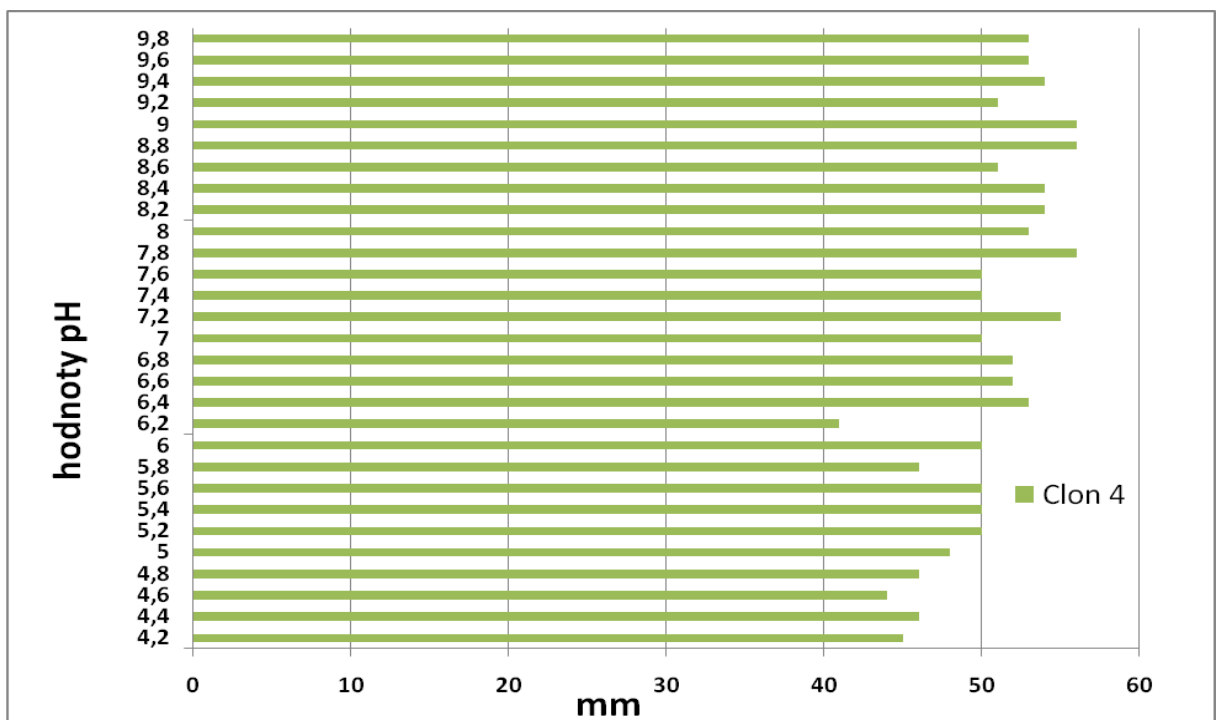
V grafu je patrné, že Clon 2 vykazuje největší radiální růst při hodnotách pH 6,4 – 6,8; 7,2 a 9,2 – 9,8.

**Graf 3: Růst Clon 3 při různých hodnotách pH, stáří 15 dní – velikost kolonie.**



Graf 3 znázorňuje radiální růst izolátu Clon 3 při různých hodnotách pH. Do grafu byly použity výsledky z patnáctého dne kultivace a jsou vyjádřeny v mm. Je patrné, že izolát Clon 3 vykazuje největší radiální růst při hodnotách pH 5; 6; 6, 6; 6,8; 7,2 a 7,6.

**Graf 4: Růst Clon 4 při různých hodnotách pH, stáří 15 dní – velikost kolonie.**



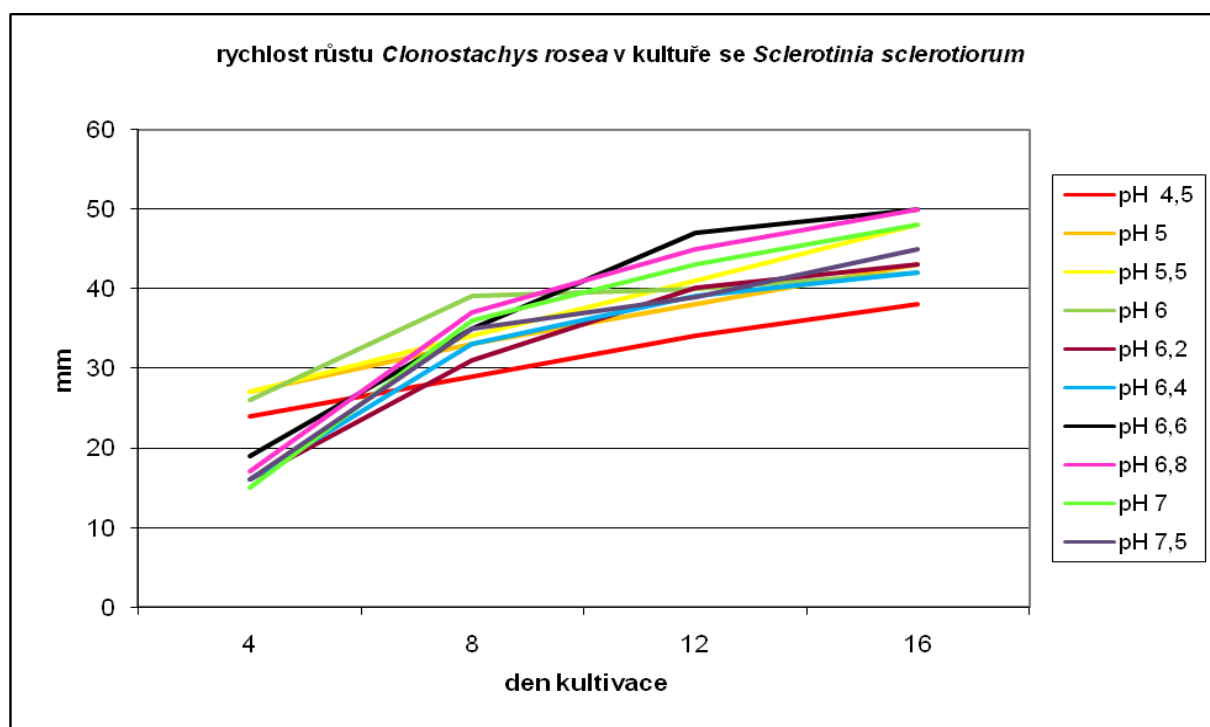
Graf 4 zobrazuje intenzitu radiálního růstu izolátu Clon 4 při různých hodnotách pH. Do grafu byly použity výsledky z patnáctého dne kultivace a jsou vyjádřeny v mm.

Z grafu je patrné, že testovaný izolát Clon 4 vykazuje vyšší intenzitu růstu při všech hodnotách pH oproti ostatním testovaným izolátům, avšak nejvyšší hodnoty růstu dosahuje při hodnotách pH 7,2; 7,8 – 8,4 a 8,8 – 9,8.

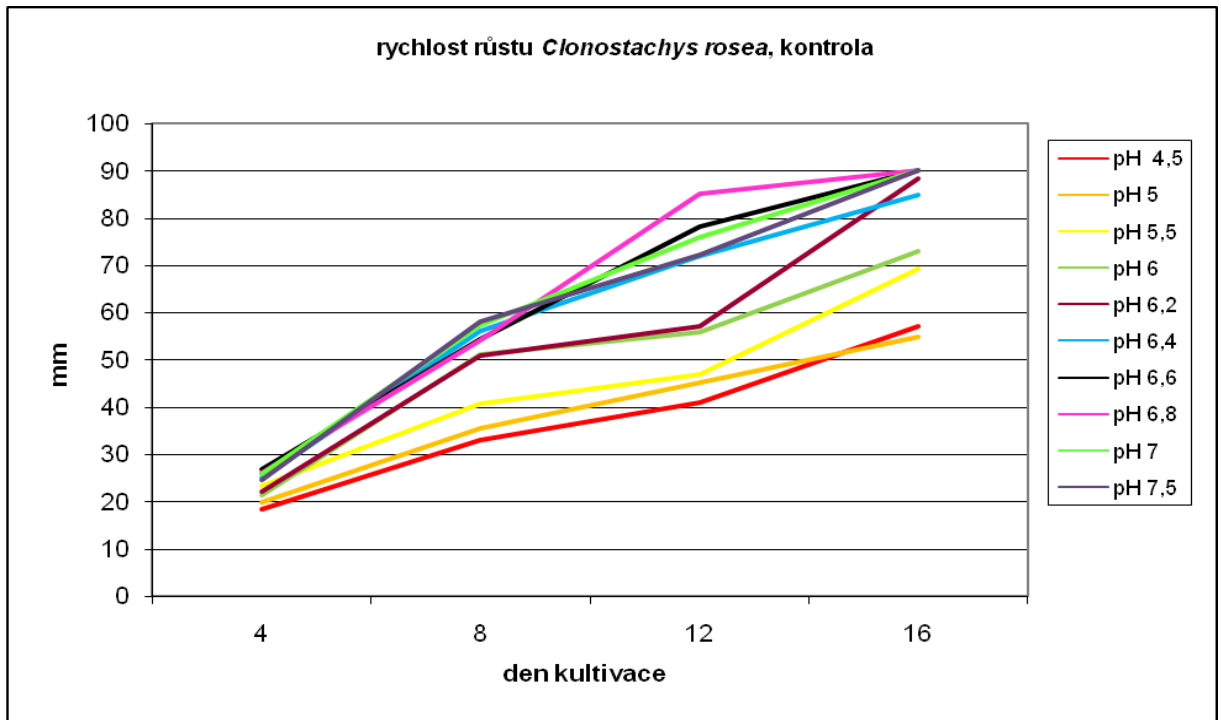
## 5.2 Hodnocení vlivu pH na antagonistickou aktivitu *Clonostachys rosea* z přípravku vůči vybraným patogenům – in vitro

### 5.2.1 *Sclerotinia sclerotiorum*

Graf 5: Rychlost růstu *Clonostachys rosea* z přípravku v kultuře se *Sclerotinia sclerotiorum* na živných půdách s různou hodnotou pH

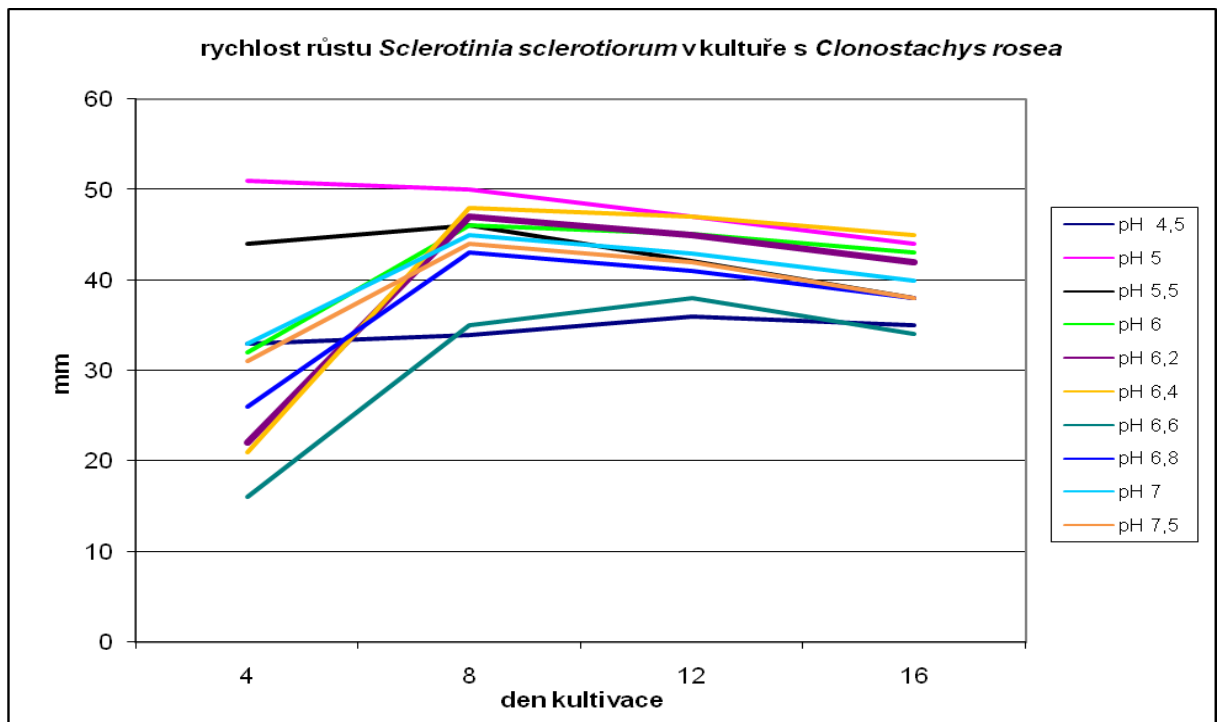


**Graf 6: Rychlost růstu *Clonostachys rosea* z přípravku na živných půdách s různou hodnotou pH – kontrola**

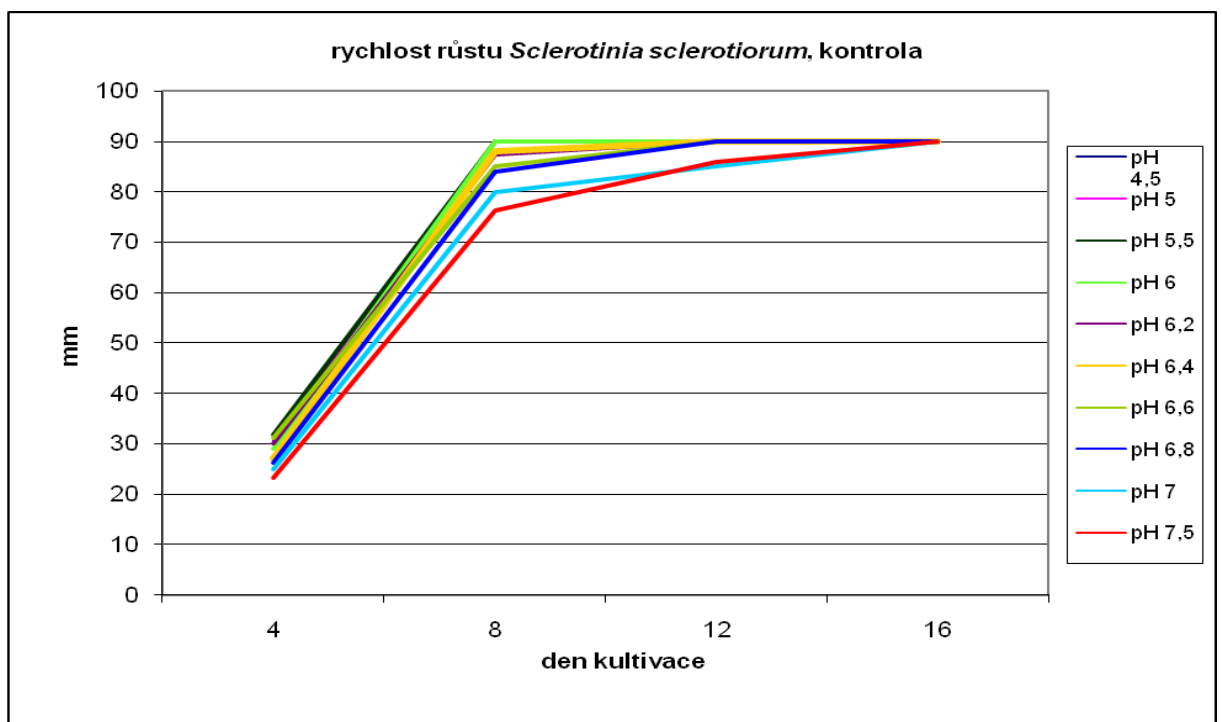


Z grafů 5 a 6 je patrné, že *Clonostachys rosea* vykazuje pomalejší počáteční růst v kultuře se *Sclerotinia sclerotiorum* oproti kontrole. V kultuře se *Sclerotinia sclerotiorum* dosahuje *Clonostachys rosea* z přípravku menších hodnot radiálního růstu oproti kontrole a to na všech hodnotách pH. Při srovnání radiálního růstu *Clonostachys rosea* na různých hodnotách pH je vidět, že *C. rosea* v kultuře se *S. sclerotiorum* vykazuje nejvyšší růst při pH 6,6 – 7,5; v případě kontroly 6,2 – 7,5.

**Graf 7: Rychlost růstu *Sclerotinia sclerotiorum* v kultuře s *Clonostachys rosea* z přípravku na živných půdách s různou hodnotou pH**



**Graf 8: Rychlost růstu *Sclerotinia sclerotiorum* na živných půdách s různou hodnotou pH – kontrola**



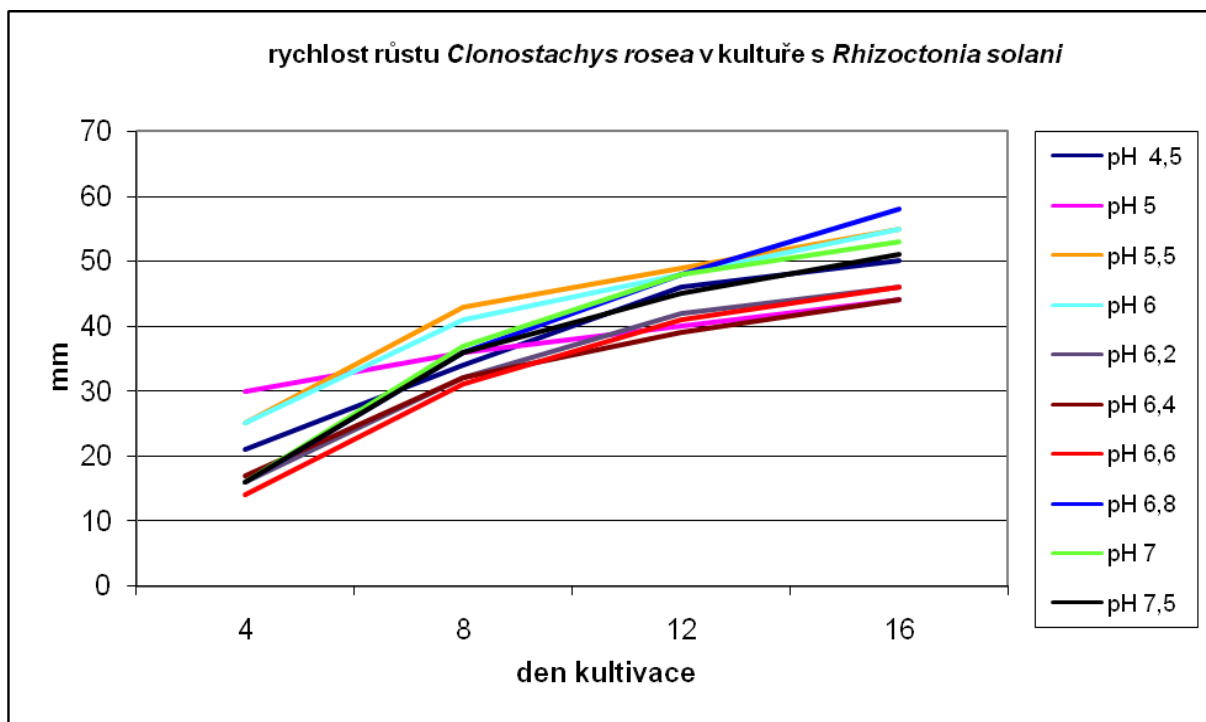
Z grafů 7 a 8 vyplývá, že *Sclerotinia sclerotiorum* v samostatné kultivaci dosahuje nejvyššího růstu již v osmém dni kultivace a to zejména při hodnotách pH 6 – 6,4. K šestnáctému dni kultivace dosahuje *S. sclerotiorum* na všech hodnotách pH velikosti radiálního růstu 90 mm. V případě růstu *S. sclerotiorum* v kultuře spolu s *Clonostachys rosea* dosahuje *S. sclerotiorum* nejvyššího růstu ve čtvrtém dni kultivace při hodnotách pH 5 a 5,5. Nejnižší růst v kultuře s *Clonostachys rosea* vykazuje *S. Sclerotiorum* při pH 4,5 a 6,6.

Při porovnání grafů 5 a 7, kde je znázorněna interakce *Clonostachys rosea* se *Sclerotinia sclerotiorum* je zřejmé, že *Clonostachys rosea* z biologického přípravku vykazuje zpočátku pomalejší růst oproti *Sclerotinia sclerotiorum*. Po určité době začíná být konkurenceschopné a inhibuje růst patogena. Při porovnání antagonistické aktivity *C. rosea* na různých hodnotách pH v šestnáctém dni kultivace je zřejmé, že biologický přípravek na bázi *Clonostachys rosea* neztrácí schopnost antagonistické aktivity vůči *Sclerotinia sclerotiorum*, i přesto že je mírně inhibován hodnotami pH ve srovnání s kontrolou.

Konkrétní hodnoty radiálního růstu *C. rosea* a *S. sclerotiorum* použité pro grafy 5, 6, 7 a 8 jsou uvedeny v příloze v tabulkách 1, 2 a 3.

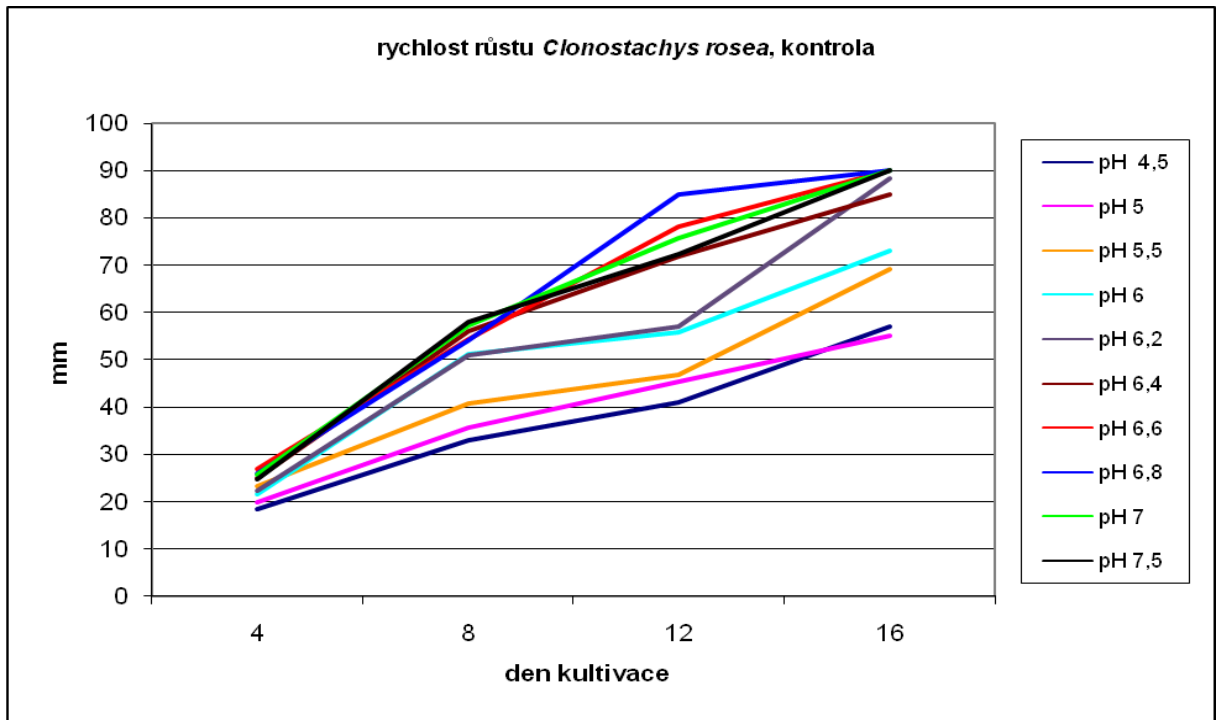
## 5.2.2 *Rhizoctonia solani*

**Graf 9: Rychlost růstu *Clonostachys rosea* z přípravku v kultuře s *Rhizoctonia solani* na živných půdách s různou hodnotou pH**





**Graf 10: Rychlost růstu *Clonostachys rosea* z přípravku na živných půdách s různou hodnotou pH – kontrola**



Z grafů 9 a 10 je patrné, že *Clonostachys rosea* v kultuře s *Rhizoctonia solani* vykazuje pomalejší počáteční růst ve srovnání s kontrolou a to zejména při pH 6,2 – 7,5. Nejvyšší růst vykazuje *C. rosea* v kultuře s *R. solani* v šestnáctém dni kultivace při pH 5,5; 6; 6,8 a 7. V kontrolní variantě vykazuje *C. rosea* nejvyšší radiální růst v šestnáctém dni kultivace při pH 4,5; 6,6 – 7,5.



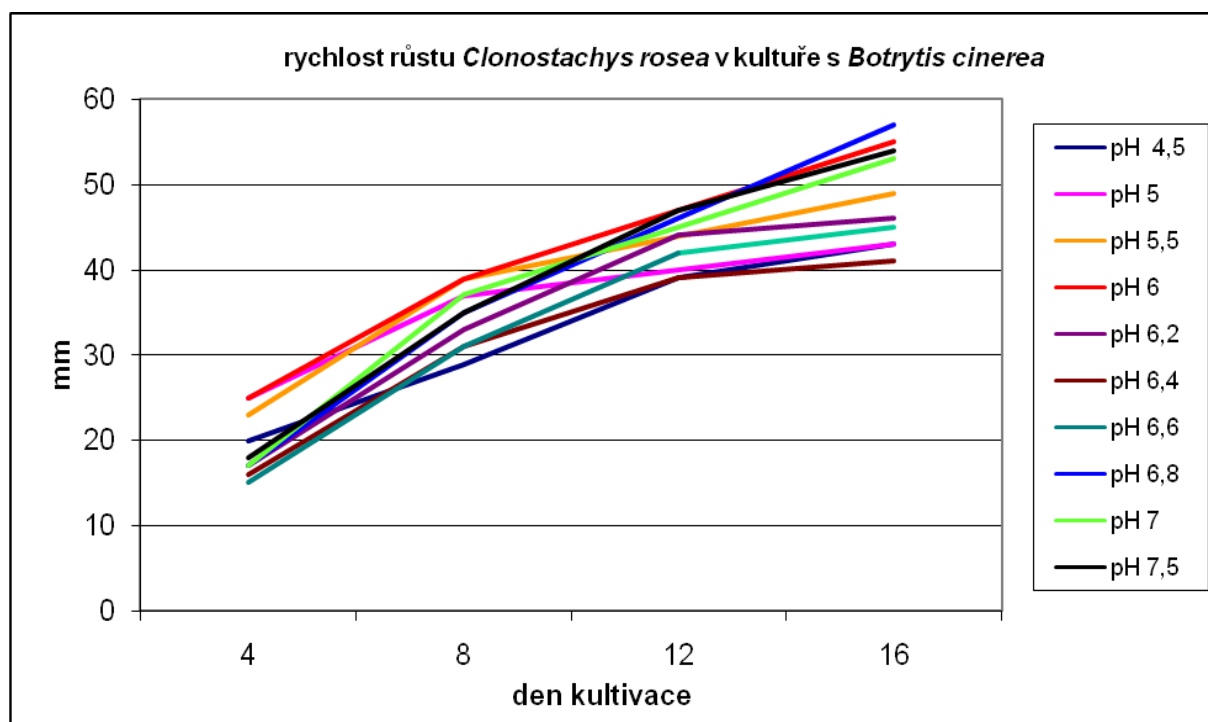
Z grafů 11 a 12 je vidět, že *Rhizoctonia solani* vykazuje v kultuře s *Clonostachys rosea* rychlejší počáteční růst zejména při hodnotách pH 6 – 7,5 oproti kontrole. Nejvyššího růstu dosahuje *R. solani* v kultuře s *C. rosea* v osmém dni kultivace při pH 6,4. V kontrolní variantě dosahuje *R. solani* růstu až 90 mm v šestnáctém dni kultivace na všech hodnotách pH.

Při porovnání grafů 9 a 11, kde je znázorněna interakce *Clonostachys rosea* z přípravku s *Rhizoctonia solani* je zřejmé, že *Clonostachys rosea* vykazuje antagonistickou aktivitu vůči patogenu *Rhizoctonia solani* na všech pH, zejména však při hodnotě pH 4,5; 5,5; 6 a 6,8 – 7,5. Jako v předchozích případech vykazuje *C. rosea* ze začátku pomalejší růst, avšak od dvanáctého dne kultivace již inhibuje patogena.

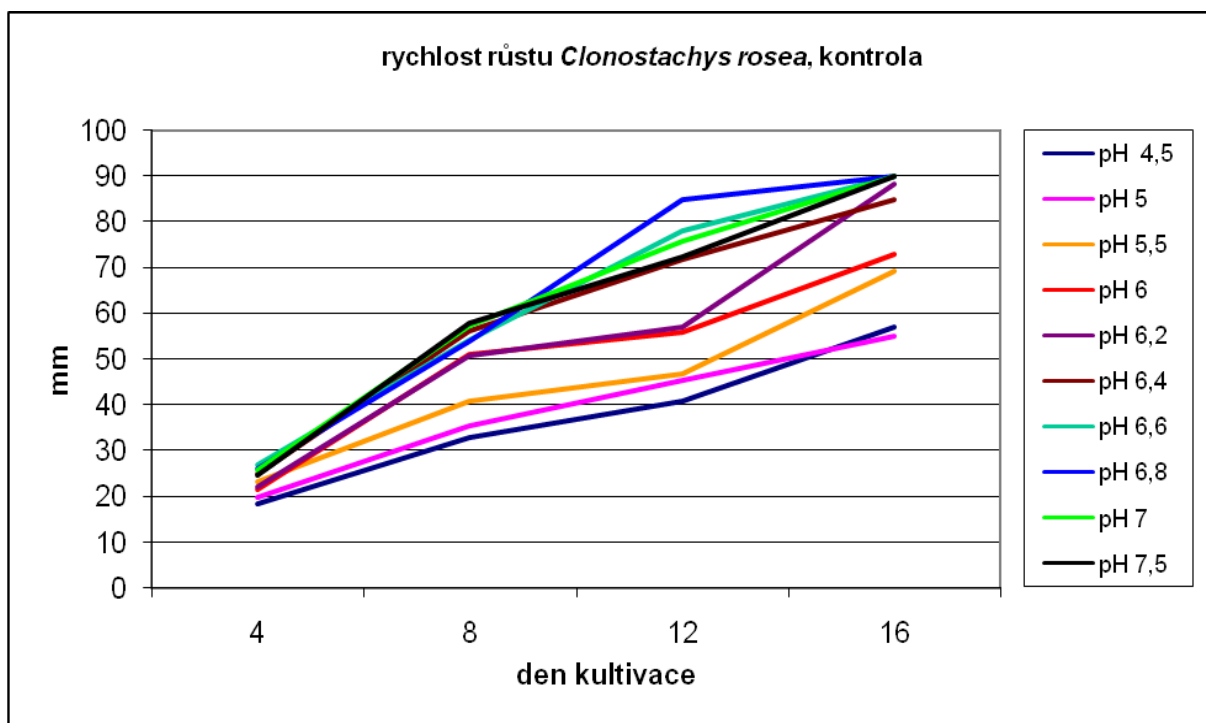
Konkrétní hodnoty radiálního růstu *C. rosea* a *R. solani* použité pro grafy 9, 10, 11 a 12 jsou uvedeny v příloze v tabulkách 2, 4 a 5.

### 5.2.3 *Botrytis cinerea*

**Graf 13: Rychlost růstu *Clonostachys rosea* z přípravku v kultuře s *Botrytis cinerea* na živných půdách s různou hodnotou pH**



**Graf 14: Rychlost růstu *Clonostachys rosea* z přípravku na živných půdách s různou hodnotou pH – kontrola**



Z grafů 13 a 14 je zřejmé, že *Clonostachys rosea* v kultuře s *Botrytis cinerea* vykazuje menší radiální růst oproti kontrole na všech hodnotách pH, zejména při pH 4,5; 5 a 6,4. Při pH 6,8 vykazuje *C. rosea* v kultuře s *B. cinerea* nejvyšší růst. V případě kontroly při porovnání naměřených hodnot v šestnáctém dni kultivace vykazuje *C. rosea* nejnižší radiální růst při hodnotách pH 4,5 – 6. Nejvyšší radiální růst vykazuje *C. rosea* při hodnotách pH 6,2 – 7,5.



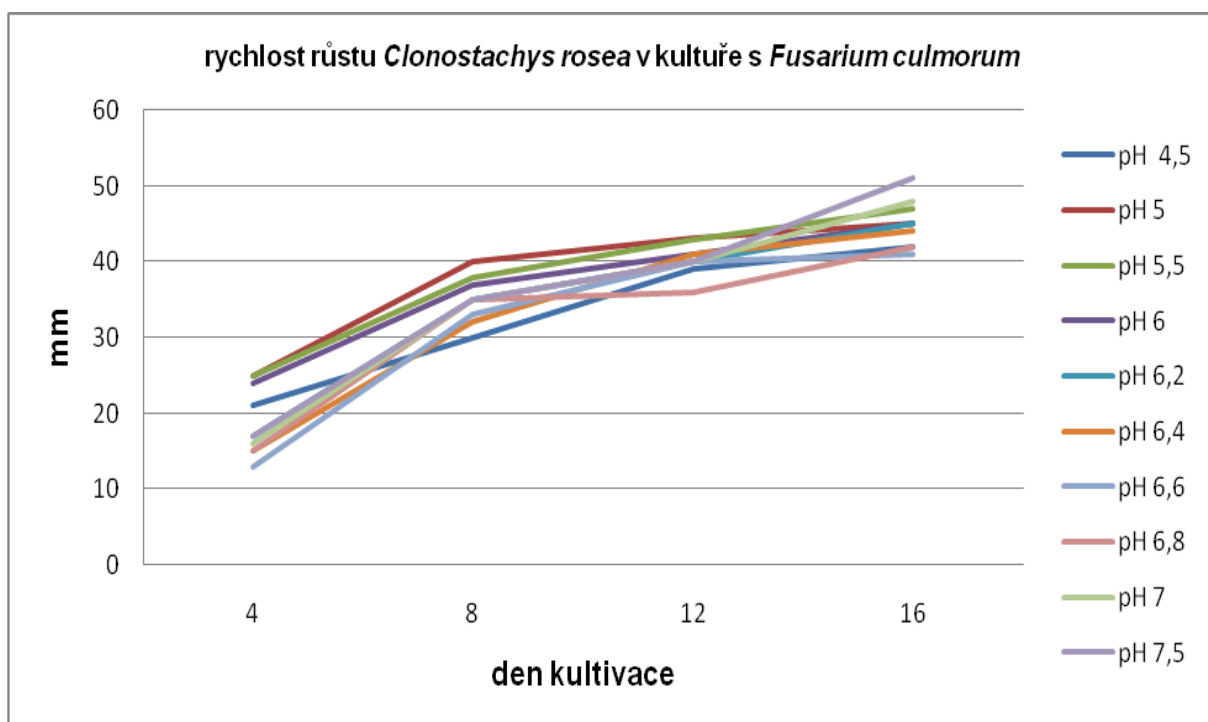
Z grafů 15 a 16 je patrné, že *Botrytis cinerea* v kultuře s *Clonostachys rosea* vykazuje nižší růst na všech hodnotách pH oproti kontrole. Nejvyššího růstu dosahuje *Botrytis cinerea* v kultuře s *C. rosea* ve čtvrtém dni kultivace při hodnotách pH 4,5 – 5,5. V případě kontroly dosahuje *Botrytis cinerea* maximálního růstu na všech hodnotách pH v šestnáctém dni kultivace.

Při porovnání grafů 13 a 15, kde je znázorněna interakce *Clonostachys rosea* z přípravku s *Botrytis cinerea* je zřejmé, že *Clonostachys rosea* vykazuje nejvyšší míru antagonistické aktivity v šestnáctém dni kultivace vůči *Botrytis cinerea* na všech hodnotách pH, a to zejména na pH 4,5 – 6,2 a 6,6 – 7,5.

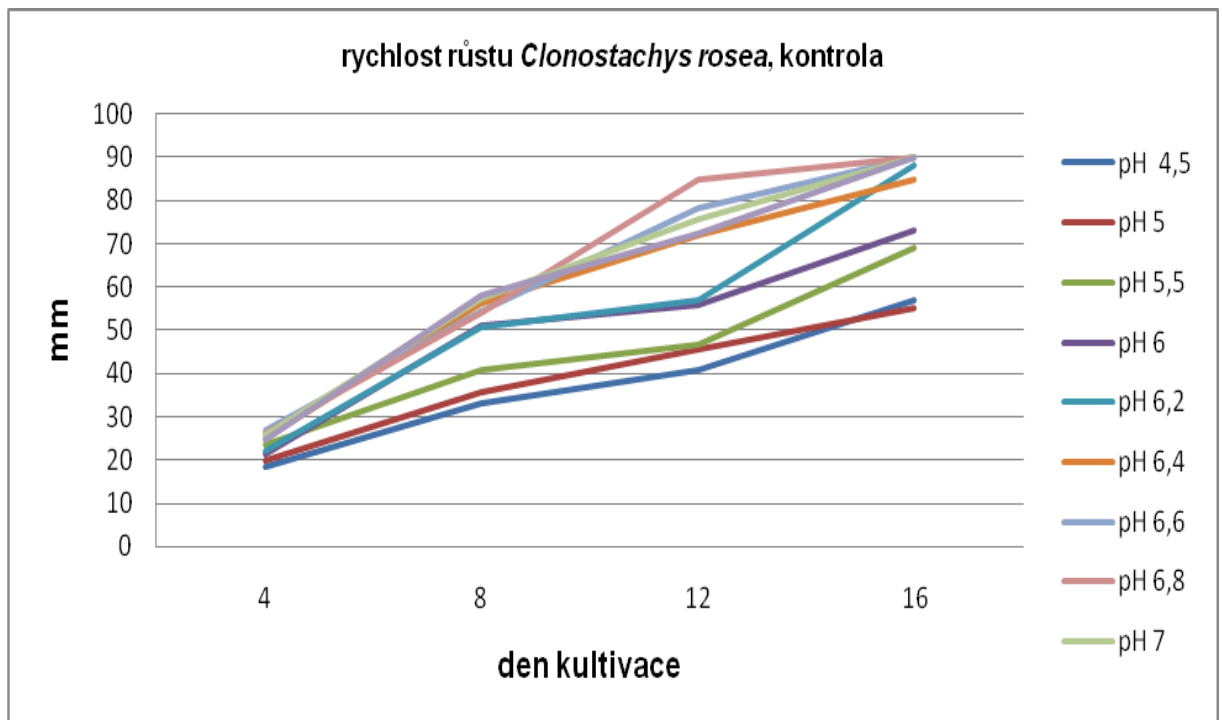
Konkrétní hodnoty radiálního růstu *C. rosea* a *B. cinerea*, použité pro grafy 13, 14, 15 a 16, jsou uvedeny v příloze v tabulkách 2, 6 a 7.

## 5.2.4 *Fusarium culmorum*

**Graf 17: Rychlost růstu *Clonostachys rosea* z přípravku v kultuře s *Fusarium culmorum* na živných půdách s různou hodnotou pH**

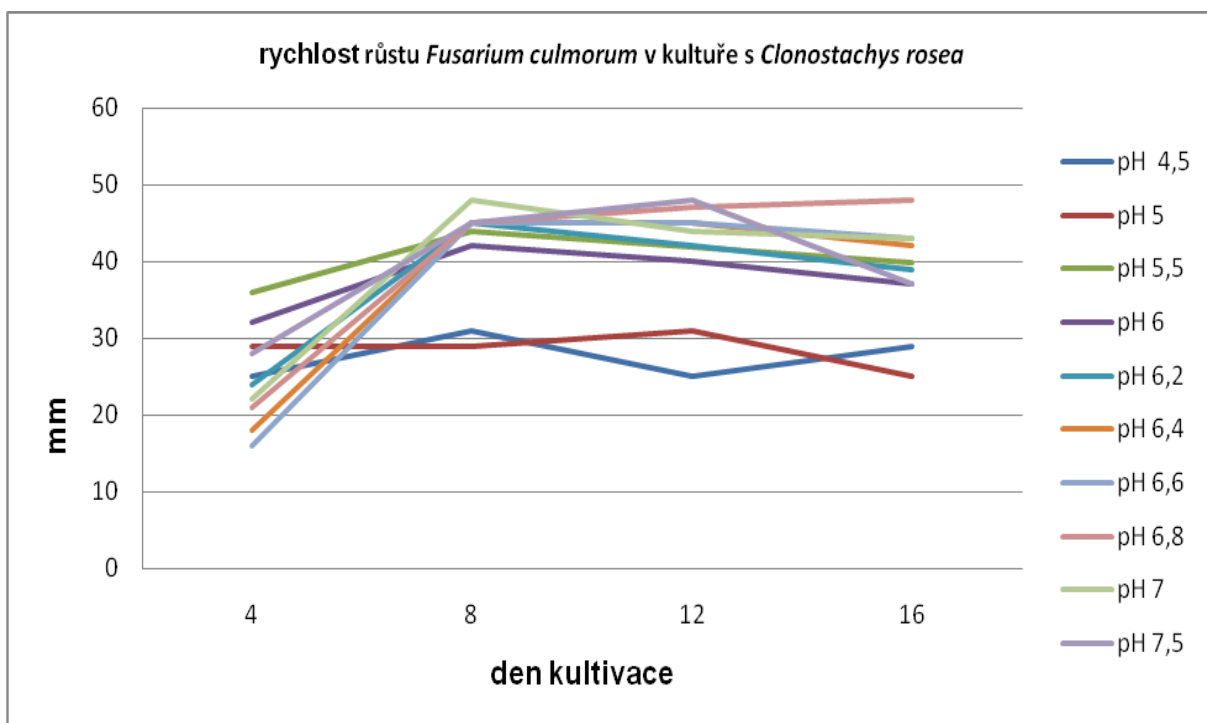


**Graf 18: Rychlost růstu *Clonostachys rosea* z přípravku na živných půdách s různou hodnotou pH – kontrola**



Z grafů 17 a 18 je patrné, že *Clonostachys rosea* v kultuře s *Fusarium culmorum* vykazuje pomalejší počáteční růst oproti kontrole. Největšího růstu dosahuje *C. rosea* v kultuře s *Fusarium culmorum* na hodnotách pH 5,5; 7; 7,5. Při kontrole dosahuje největšího růstu *C. rosea* na hodnotách pH 6,2; 6,4; 6,6; 6,8 a 7.

**Graf 19: Rychlost růstu *Fusarium culmorum* v kultuře s *Clonostachys rosea* na živných půdách s různou hodnotou pH**



V grafu 19 je patrné, že *Fusarium culmorum* v kultuře s *Clonostachys rosea* vykazuje rychlejší počáteční růst na hodnotách pH 5,5; 6 a 7,5. Naopak jeho růst je inhibován hodnotami pH 4,5 a 5. V ostatních případech je patrné, že k šestnáctému dni kultivace dochází k mírné inhibici růstu *F. culmorum* *Clonostachys rosea*.

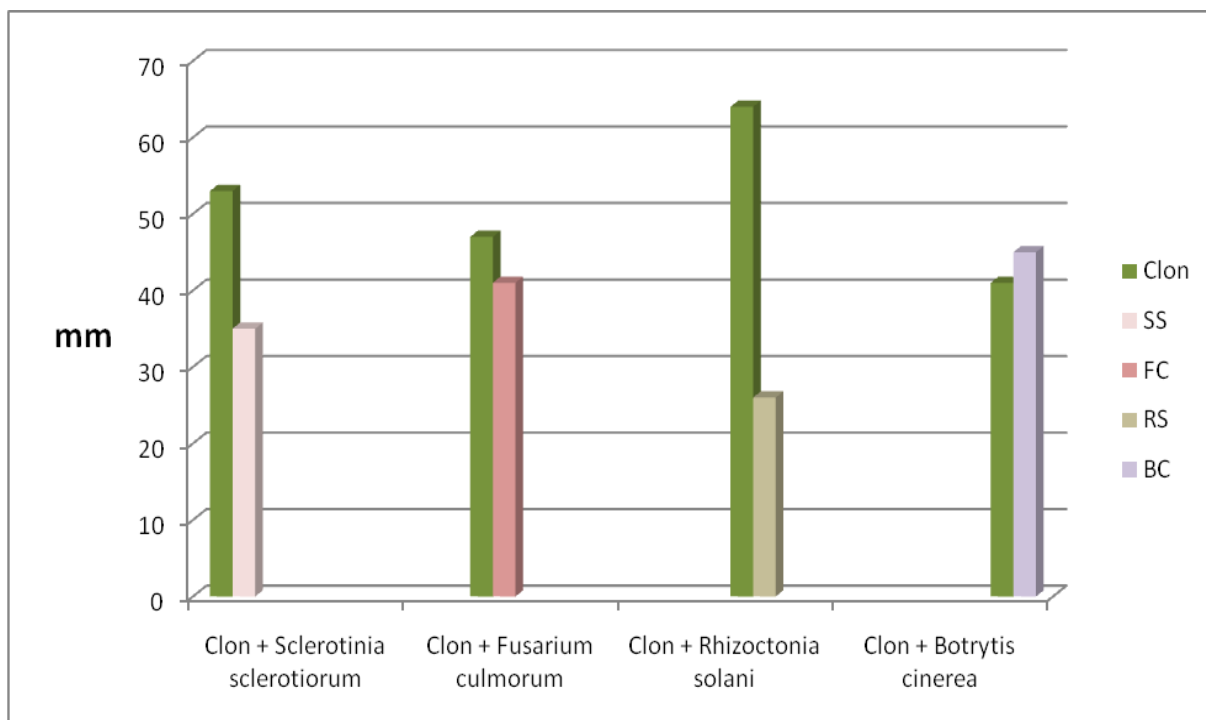
V případě *Fusarium culmorum* došlo ke kontaminaci více misek kontroly. Výsledky byly natolik nevěrohodné, že nejsou v práci uvedené.

Konkrétní hodnoty radiálního růstu *C. rosea* a *Fusarium culmorum*, použité pro grafy 17, 18, a 19 jsou uvedeny v příloze v tabulkách 2 a 8.



## 5.2.5 Hodnocení antagonistické aktivity *Clonostachys rosea* z přípravku vůči vybraným patogenům na živné půdě Cz – D

Graf 20: Interakce mezi *Clonostachys rosea* z přípravku s patogeny *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium culmorum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* na živné půdě Cz – D (pH 5,8), stáří 16 dní – velikost kolonie.

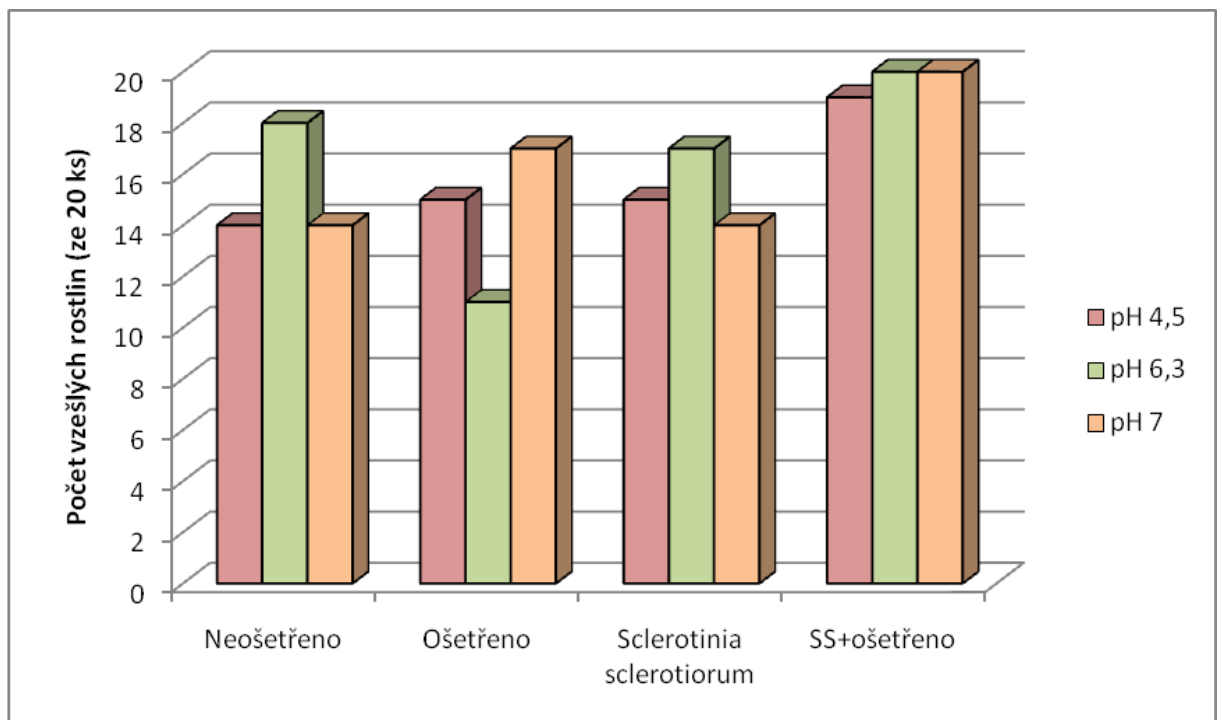


Graf 20 znázorňuje míru antagonistické aktivity biologického přípravku na bázi *Clonostachys rosea*, v grafu uvedený pod zkratkou Clon vůči vybraným patogenům. Interakce byly hodnoceny na živné půdě Czapek Dox Agar (pH 5,8). Z grafu je patrné, že nejvyšší míru antagonistické aktivity vykazuje biologický přípravek na bázi *Clonostachys rosea* vůči patogenu *Rhizoctonia solani*. Dále vykazuje též antagonistickou aktivitu vůči *Sclerotinia sclerotiorum* a mírně i vůči *Fusarium culmorum*.

## 5.3 Hodnocení vlivu pH půdy na antagonistickou aktivitu *Clonostachys rosea* z přípravku vůči vybraným fytopatogenům – nádobové pokusy ve skleníku

### 5.3.1 Hrách

Graf 21: Počet vzešlých rostlin hrachu, při vysetí 20 ks semen (skleníkový pokus).



Z grafu 21 vyplývá, že ve variantě s kontaminovanou půdou patogenem *Sclerotinia sclerotiorum* + ošetřené osivo byla nejlepší vzcházivost semen hrachu při všech hodnotách pH. Dále se vysoká vzcházivost pohybovala v neošetřené variantě při pH 6,3 a v ošetřené variantě při pH 7.

**Tabulka 1: Vliv moření osiva hrachu biologickým přípravkem na bázi *Clonostachys rosea* na růst a napadení patogenem *Sclerotinia sclerotiorum* při různých hodnotách pH (skleníkový pokus).**

<b>Hrách + <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (SS), skleník – průměr z 10 rostlin</b>									
	<b>pH 4,5</b>			<b>pH 6,3</b>			<b>pH 7</b>		
	Napadené rostliny/ks	Nadzemní část/cm	Kořeny/cm	Napadené rostliny/ks	Nadzemní část/cm	Kořeny/cm	Napadené rostliny/ks	Nadzemní část/cm	Kořeny/cm
<b>Neošetřeno</b>	<b>0</b>	<b>30</b>	<b>21</b>	<b>0</b>	<b>34</b>	<b>19</b>	<b>0</b>	<b>30</b>	<b>13</b>
<b>Ošetřeno</b>	<b>0</b>	<b>31</b>	<b>15</b>	<b>0</b>	<b>30</b>	<b>18</b>	<b>0</b>	<b>33</b>	<b>16</b>
<b>SS + neoš.</b>	<b>1</b>	<b>30</b>	<b>16</b>	<b>5</b>	<b>27</b>	<b>18</b>	<b>1</b>	<b>31</b>	<b>13</b>
<b>SS + oš.</b>	<b>0</b>	<b>31</b>	<b>18</b>	<b>0</b>	<b>30</b>	<b>19</b>	<b>0</b>	<b>30</b>	<b>12</b>

V tabulce 1 je srovnávána nadzemní části rostlin hrachu, kořenů rostlin hrachu a počet napadených rostlin patogenem *Sclerotinia sclerotiorum* při hodnotách pH 4,5; 6,3 a 7. V první variantě bylo vyseto neošetřené osivo hrachu, ve druhé variantě bylo vyseto osivo hrachu mořené biologickým přípravkem na bázi *Clonostachys rosea*. Ve třetí variantě bylo do půdy kontaminované *Sclerotinia sclerotiorum* vyseto neošetřené osivo, a ve variantě čtvrté bylo vyseto ošetřené osivo do půdy kontaminované *Sclerotinia sclerotiorum*. K nejvyššímu napadení rostlin patogenem došlo v případě varianty *S. sclerotiorum* + neošetřené osivo a to při pH 6,3. V případě varianty *S. sclerotiorum* + ošetřené osivo, nedošlo k napadení rostlin patogenem při všech hodnotách pH. Při srovnání růstu nadzemních částí a kořenů rostlin nejsou výrazné rozdíly mezi jednotlivými variantami.

Z rostlin hrachu a pšenice s příznaky napadení byly izolovány původci choroby na umělé živnou půdu PDA, čímž bylo potvrzeno, že došlo k napadení patogenem (ilustrační fotografie v příloze).

Z truhlíku, kam byla aplikována sklerocia, se z deseti kusů našly 3 až 4 kusy. Všechna nalezená sklerocia *Sclerotinia sclerotiorum* byla infikována *Clonostachys rosea* z přípravku.

### 5.3.2 Pšenice

Vzcházivost pšenice byla na všech hodnotách pH 100 %.

**Tabulka 2: Vliv moření osiva pšenice biologickým přípravkem na bázi *Clonostachys rosea* na růst a napadení patogenem *Fusarium culmorum* při různých hodnotách pH (skleníkový pokus).**

<b>Pšenice + <i>Fusarium culmorum</i> (FC), skleník – průměr z 10 rostlin</b>									
	<b>pH 4,5</b>			<b>pH 6,3</b>			<b>pH 7</b>		
	Napadené rostliny/ks	Nadzemní část/cm	Kořeny/cm	Napadené rostliny/ks	Nadzemní část/cm	Kořeny/cm	Napadené rostliny/ks	Nadzemní část/cm	Kořeny/cm
<b>Neošetřeno</b>	<b>0</b>	39	13	<b>0</b>	39	16	<b>0</b>	40	20
<b>Ošetřeno</b>	<b>0</b>	41	13	<b>0</b>	38	17	<b>0</b>	38	18
<b>FC + neoš.</b>	<b>4</b>	40	13	<b>2</b>	37	17	<b>12</b>	37	17
<b>FC+ oš.</b>	<b>2</b>	39	16	<b>0</b>	37	16	<b>4</b>	37	16

V tabulce 2 jsou srovnávány nadzemní části rostlin pšenice, kořeny rostlin pšenice a počet napadených rostlin patogenem *Fusarium culmorum* při hodnotách pH 4,5; 6,3 a 7. V první variantě bylo vyseto neošetřené osivo pšenice, ve druhé variantě bylo vyseto osivo pšenice mořené biologickým přípravkem na bázi *Clonostachys rosea*. Ve třetí variantě bylo do půdy kontaminované *Fusarium culmorum* vyseto neošetřené osivo a ve variantě čtvrté bylo vyseto ošetřené osivo do půdy kontaminované *Fusarium culmorum*. K nejvyšší četnosti napadených rostlin dochází ve variantě *Fusarium culmorum* + neošetřené osivo při hodnotě pH 7. Nenapadené rostliny jsou pouze v půdách bez kontaminace patogenem a ve variantě *Fusarium culmorum* + ošetřené rostliny při pH 6,3. K nejvyššímu růstu nadzemní části rostlin dochází v ošetřené variantě při pH 4,5. Při pH 4,5 byla naměřena největší délka kořenového systému ve variantě *Fusarium culmorum* + ošetřené osivo. Naopak při hodnotě pH 7 dochází k lepšímu růstu kořenového systému v neošetřených variantách. Naměřená délka kořenů rostlin je větší při hodnotách pH 6,3 a 7 oproti pH 4,5.

**Tabulka 3: Vliv moření osiva pšenice biologickým přípravkem na bázi *Clonostachys rosea* na růst a napadení patogenem *Rhizoctonia solani* při různých hodnotách pH (skleníkový pokus).**

<b>Pšenice + <i>Rhizoctonia solani</i> (RS) – 2 opakování, skleník – průměr z 10 rostlin</b>									
	<b>pH 4,5</b>			<b>pH 6,3</b>			<b>pH 7</b>		
	Napadené rostliny/ks	Nadzemní část/cm	Kořeny/cm	Napadené rostliny/ks	Nadzemní část/cm	Kořeny/cm	Napadené rostliny/ks	Nadzemní část/cm	Kořeny/cm
<b>Neošetřeno</b>	<b>0</b>	39	10	<b>0</b>	38	13	<b>0</b>	38	13
<b>Ošetřeno</b>	<b>0</b>	37	10	<b>0</b>	40	13	<b>0</b>	36	13
<b>RS + neoš.</b>	<b>4</b>	37	10	<b>1</b>	39	11	<b>4</b>	37	11
<b>RS+ oš.</b>	<b>0</b>	40	15	<b>1</b>	38	13	<b>0</b>	36	17

V tabulce 3 je srovnávána nadzemní část rostlin pšenice, kořenů rostlin pšenice a počet napadených rostlin patogenem *Rhizoctonia solani* při hodnotách pH 4,5; 6,3 a 7. V první variantě bylo vyseto neošetřené osivo pšenice, ve druhé variantě bylo vyseto osivo pšenice mořené biologickým přípravkem na bázi *Clonostachys rosea*. Ve třetí variantě bylo do půdy kontaminované *Rhizoctonia solani* vyseto neošetřené osivo a ve variantě čtvrté bylo vyseto ošetřené osivo do půdy kontaminované *Rhizoctonia solani*. Při hodnotách pH 4,5 a 7 ve variantě *Rhizoctonia solani* + neošetřené osivo, dochází k napadení rostlin patogenem oproti variantě *Rhizoctonia solani* + ošetřené osivo, kde k napadení nedochází. Větší délka kořenového systému byla naměřena v případě kombinace patogena a ošetřeného osiva při pH 4,5 a 7, oproti ostatním variantám. Délky nadzemních částí rostlin jsou téměř srovnatelné při všech hodnotách pH.

Z rostlin pšenice s příznaky napadení byly izolovány původci choroby na umělé živnou půdu PDA, čímž bylo potvrzeno, že došlo k napadení patogenem (ilustrační fotografie v příloze).

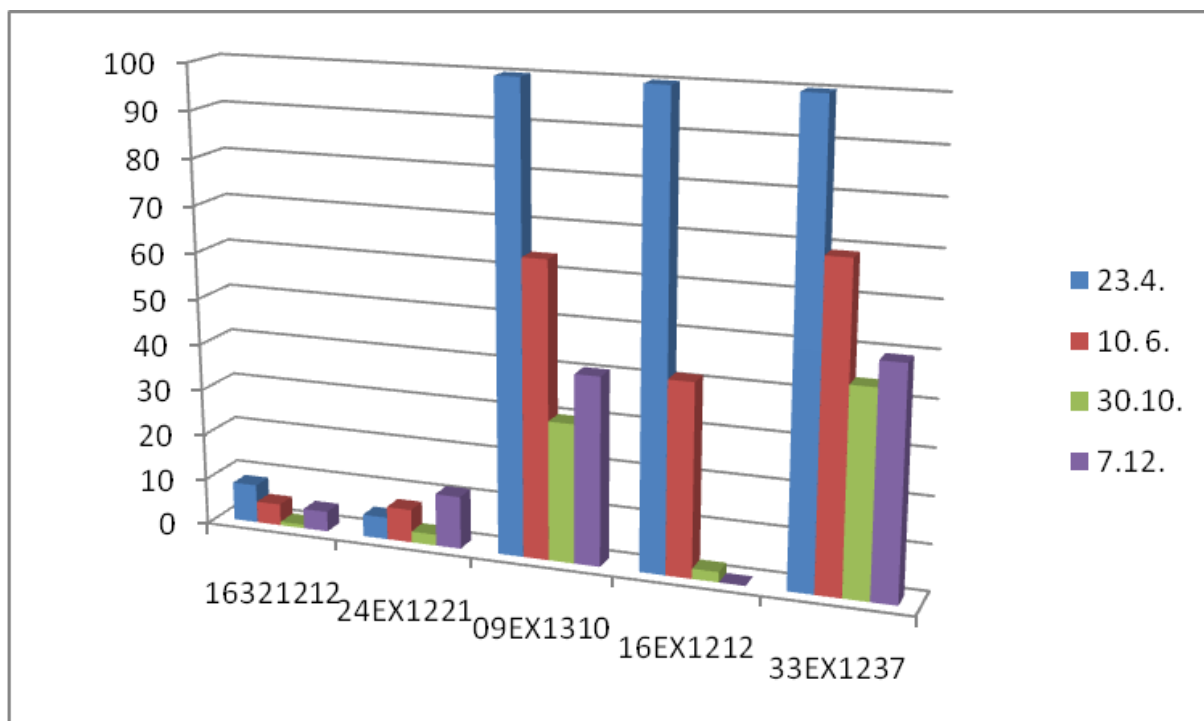
## 5.4 Hodnocení životnosti *Clonostachys rosea* v přípravku

Tabulka 4: Počet CFU  $\times 10^6$  v 1 g přípravku se směsí 4 kmenů *Clonostachys rosea*

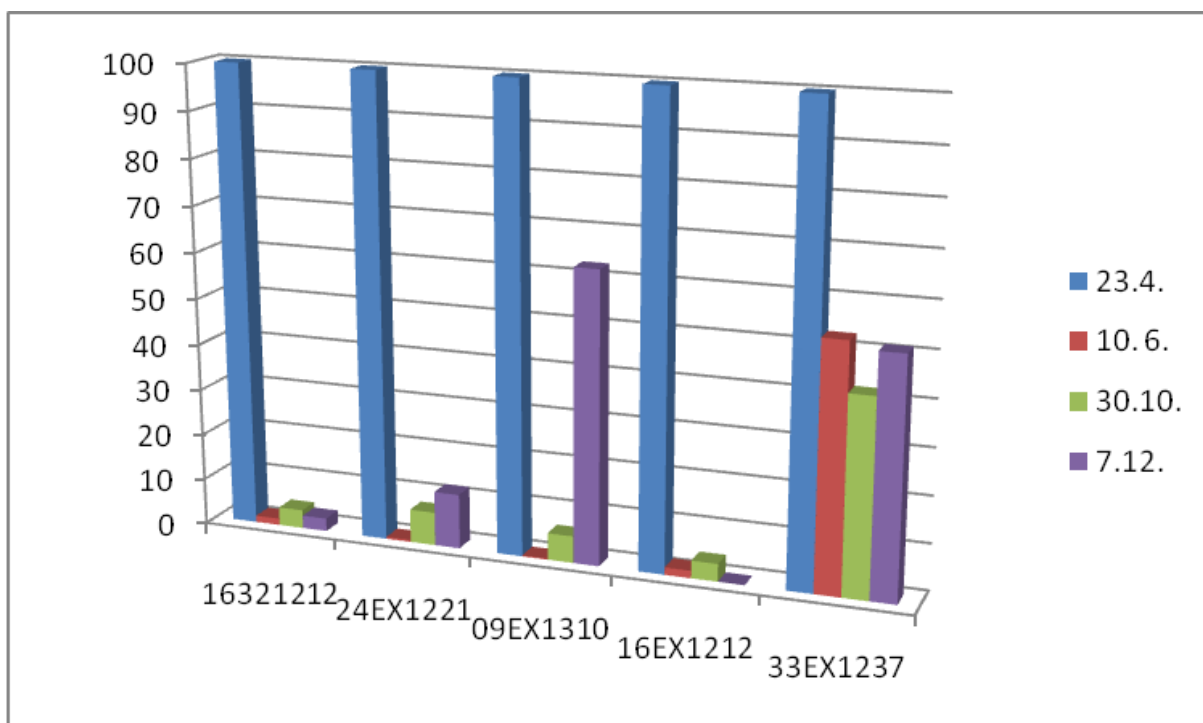
trypton-soya agar				
šarže	23.4.	10. 6.	30.10.	7.12.
16321212	8,4	4,7	0,8	4,4
24EX1221	4,8	7,2	2,4	11,4
09EX1310	100	63,8	30	40,6
16EX1212	100	41,4	2,2	—
33EX1237	100	69	44	49,4
Czapek-Dox agar				
šarže	23.4.	10. 6.	30.10.	7.12.
16321212	100	1,4	4	2,8
24EX1221	100	0,4	7,2	11,8
09EX1310	100	0,2	5,8	62,7
16EX1212	100	1,6	3,8	—
33EX1237	100	52,8	42,2	51,2

Pozn.: 100: nepočitatelné; – nebyl vzorek

Graf 22: Počet CFU  $\times 10^6$  v 1 g přípravku se směsí 4 kmenů *Clonostachys rosea*, kultivace na trypton – soya agar



**Graf 23: Počet CFU  $\times 10^6$  v 1 g přípravku se směsí 4 kmenů *Clonostachys rosea*, kultivace na Czapek – Dox agar**



Z výsledků uvedených v tabulce 4 a grafech 22 a 23, lze vyvodit, že v termínu 30. 10. bylo zjištěno značně menší množství CFU (colonyformingunits) oproti dalšímu termínu hodnocení – v prosinci, kdy byl u stejných vzorků konstatován vyšší počet CFU, tedy nedošlo k očekávanému snížení četnosti živých spor v posledním termínu hodnocení. V průběhu měsíců březen – květen 2013 se titer spor/g udržoval stále řádově na hodnotách  $10^6$  spor/g, v červnu a červenci došlo k poklesu titru na  $10^5$  spor/g u dvou šarží, kultivace na Cz – D agar. Při posledním hodnocení v prosinci byly zjištěné počty živých spor u všech hodnocených šarží vyšší než při hodnocení na konci října.

## 6 Diskuze

Chatterton and Punja (2010) uvádějí, že hustota populace *Clonostachys rosea* f. *catenulata* byla vyšší, pokud se udržovalo pH 5,6 a 7. Chen et al. (2006) uvádějí, že pro optimální růst v in vitro podmínkách saprotrofní houby *Clonostachys compactiuscula* z rodu *Clonostachys* je nejvhodnější pH média 8,5. Garcia et al. (2003) publikovali, že *Clonostachys rhizophaga* z rodu *Clonostachys* neprokázala žádnou pH preferenci. Z výsledků našich laboratorních pokusů, kde byly testovány jednotlivé izoláty *Clonostachys rosea* lze vyvodit, že všechny izoláty převážně preferují mírně kyselé, neutrální a mírně zásadité pH. První z izolátů CCF4181 *Clonostachys rosea* f. *rosea* (pracovní název Clon 1) vykazoval největší radiální růst při hodnotách pH okolo 6,4 – 6,8; 7,2 a 9,2 – 9,6. Druhý izolát CCF4182 *Clonostachys rosea* f. *rosea* (pracovní název Clon 2) nejvíce preferoval hodnoty pH 6,4 – 6,8; 7,2 a 9,2 – 9,8. Izolát CCF4183 *Clonostachys rosea* f. *rosea* (pracovní název Clon 3) nejlépe kolonizoval živnou půdu při hodnotách pH 5; 6; 6,6; 6,8; 7,2 a 7,6. Izolát CCF4184 *Clonostachys rosea* f. *catenulata* (pracovní název Clon 4) vykazoval vyšší intenzitu růstu při všech hodnotách pH oproti ostatním testovaným izolátům, avšak nejvyšší hodnoty dosahuje při hodnotách pH 7,2; 7,8 – 8,4 a 8,8 – 9,8. Z tohoto vyplývá, že rozdíly v preferenci hub z rodu *Clonostachys* spp. k pH jsou závislé na použitém druhu a kmeni dané houby. Testovaný přípravek s účinnou látkou – konidie čtyř kmenů houby *Clonostachys rosea* (dále jen *Clonostachys rosea*), které jsou uvedené výše, byl testován na škále pH 4,5 – 7,5. V laboratorních testech se prokázalo, že nejlépe kolonizuje prostor při hodnotách 6 až 7,5. Vykazuje aktivitu i v kyselých podmínkách, ale jeho růst je mírně inhibován. Hodnoty pH na kterých byl testován přípravek, vycházely z předpokladu, že běžné půdní pH v podmínkách našich polí se pohybuje v této škále.

V laboratorních testech in vitro bylo potvrzeno, že testovaný přípravek s účinnou látkou – konidie *Clonostachys rosea* vykazuje antagonistickou aktivitu vůči *Sclerotinia sclerotiorum* a inhibuje její růst. Naše výsledky jsou v souladu s literárními údaji, které dokazují účinnost *C. rosea* vůči *S. sclerotiorum*, toto dokládají např. Ondřej a kol. (2011) a Rodríguez et al. (2011). Xue (2003) se též zmiňuje o antagonistické aktivitě *Clonostachys rosea* a publikoval výsledky, které dokazují účinnost kmenu *Clonostachys rosea* ACM941 vůči *Sclerotinia sclerotiorum*. Penn and Daniel (2013) uvádějí, že pro kultivaci *Sclerotinia sclerotiorum* D - E7 na živném médiu v podmínkách in vitro bylo použito pH 6,5. V našich pokusech byl zaznamenán nejvyšší růst *Sclerotinia sclerotiorum* v osmém dni kultivace a to zejména při hodnotách pH 6 – 6,4. Výsledky interakcí *C. rosea* se *S. sclerotiorum* potvrzují, že *C.*



*rosea* neztrácí schopnost antagonistické aktivity ani při různých hodnotách pH. Rodríguez et al. (2011) prováděli test podvojných kultur, ve kterých se prokázala antagonistická aktivita *Clonostachys rosea* BAFC3874 vůči *Rhizoctonia solani*. Toto potvrzují i naše výsledky, kdy na živné půdě Czapek Dox Agar vykazovala *C. rosea* nejvyšší míru antagonistické aktivity vůči *R. solani*. Muhsin and Selman (2012) kultivovali patogenní *Rhizoctonia solani* v in vitro podmínkách na živné půdě PDA (Potato dextrose agar). Při úpravě pH, které se pohybovalo od hodnoty 4 do hodnoty 9, zjistili že *Rhizoctonia solani* vykazuje nejlepší růst při hodnotě pH 6 a její růst je silně inhibován hodnotami pH 9 a 4. Z výsledků našich pokusů je zřejmé, že *R. solani* vykazuje nejvyšší růst při hodnotách pH 5,5 a to ve čtvrtém dni kultivace. Při delší kultivaci (16 dnů) *R. solani* nevykazuje pH preferenci v in vitro podmínkách. V kultuře s *C. rosea* roste *R. solani* nejlépe při hodnotách pH 5,5 a 6,4 v počátcích kultivace. Následně je *R. solani* inhibována *C. rosea* na všech hodnotách pH zejména však při hodnotě pH 4,5; 5,5; 6 a 6,8 – 7,5. Viccini et al. (2007) publikovali, že *Clonostachys rosea* vykazuje antagonistickou aktivitu vůči *Botrytis cinerea*. Naše výsledky prokázaly nedostatečnou míru antagonistické aktivity *C. rosea* vůči *B. cinerea* na běžně používané živné půdě Czapek Dox Agar (pH 5,8). Avšak při úpravě pH byla antagonistická aktivita *C. rosea* vůči *B. cinerea* zvýšena zejména na pH 6 a 6,8. V případě *Fusarium culmorum* došlo ke kontaminaci více misek kontroly, výsledky byly nevěrohodné, a proto nejsou v práci uvedené. Z časových důvodů nebylo možné pokus založit znovu, ale ze samotné interakce *Clonostachys rosea* s *Fusarium culmorum* usuzujeme, že *C. rosea* vykazuje mírnou antagonistickou aktivitu vůči patogenu a to na všech hodnotách pH. Toto potvrzují i výsledky Jensen et al. (2011), kteří uvádějí, že *Clonostachys rosea* IK726 poskytuje vysoký stupeň ochrany vůči hlavním fytopatogenům obilnin: *Fusarium culmorum*, *Tilletia tritici*, *Bipolaris sorokiniana*. Narayanasamy (2013a), publikoval fakt, že *Clonostachys rosea* vykazuje antagonistickou aktivitu vůči *Fusarium culmorum* díky sekreci enzymu *N* – acetyl –  $\beta$  – D – glukosaminidázy (NAGasa). Též Mamarabadi et al. (2009) uvádějí, že *Clonostachys rosea* inhibuje růst mycelia *Fusarium culmorum*.

Hosnedl a Hochman (1994) uvádějí, že pro pěstování hrachu je vhodné pH 6 – 7. Co se týče vzcházivosti rostlin hrachu v našem skleníkovém pokusu, byla vzcházivost v průměru vyšší právě na hodnotách pH 6,3 a 7. Pokud budeme porovnávat vzcházivost rostlin hrachu při standardním pH zahradnického substrátu (6,3), byla vzcházivost výrazně vyšší u neošetřené varianty oproti ošetřenému osivu přípravkem na bázi kmenů *Clonostachys rosea*. Při porovnání vzcházivosti hrachu v truhlících kontaminovaných patogenem *Sclerotinia sclerotiorum* byla vzcházivost výrazně vyšší u varianty *Sclerotinia sclerotiorum* + ošetřené

osivo. Nejvyšší vzcházivost ze všech variant byla u varianty právě *Sclerotinia sclerotiorum* + ošetřené osivo a to na všech hodnotách pH. Z tohoto by se předpokládat, že kombinace patogena a ošetřeného osiva povzbuzuje rostliny hrachu ve vzcházení. Ovšem tento předpoklad by měl být ověřen dalšími pokusy. Duková (2013) ve své práci uvádí, že vzcházivost rostlin ozimé pšenice byla u ošetřené i neošetřené varianty 90%. V našich pokusech vykazovala pšenice vzcházivost 100% ve všech variantách. Rozdíly ve vzcházivosti pšenice mohly být ovlivněné rozdílnými podmínkami.

Penn and Daniel (2013) uvádějí, že pro růst *Sclerotinia sclerotiorum* D - E7 bylo použito pH 6,5. V našich uskutečněných pokusech došlo k nejvyššímu napadení rostlin hrachu tímto patogenem při pH 6,3 ve variantě, kde nebylo ošetřené osivo *Clonostachys rosea*. Xue (2003) při pokusech v ochraně krmného hrachu v Kanadě získal výsledky, které dokazují účinnost kmenu *Clonostachys rosea* ACM941 *Sclerotinia sclerotiorum*. Toto je v souladu s našimi dosaženými výsledky, kdy ve variantách s ošetřeným osivem k napadení rostlin hrachu nedošlo. Výrazné rozdíly v délce nadzemní části rostlin a kořenů nebyly zaznamenány. Duková (2013) uvádí výsledky svých skleníkových pokusů, kde porovnává délku nadzemních částí a kořenů rostlin ozimé pšenice ošetřené biologickým přípravkem na bázi kmenů *Clonostachys rosea* s neošetřenou kontrolou. Délka nadzemních částí rostlin se výrazně neliší, avšak délka kořenů je větší u ošetřené varianty oproti kontrole. V našich pokusech byla délka kořenů pšenice delší ve variantě *Fusarium culmorum* + ošetřené osivo pouze při pH půdy 4,5 a ve variantě *Rhizoctonia solani* + ošetřené osivo při pH půdy 4,5 a 7. Nadzemní části rostlin jsou srovnatelné ve všech variantách. Vyšší četnost napadení rostlin pšenice těmito patogeny byla u variant s neošetřeným osivem a to na všech hodnotách pH. Duková (2013) uvádí výsledky polních pokusů, kdy rostliny ošetřené přípravkem na bázi *Clonostachys rosea* vykazují podstatně delší růst nadzemních částí rostlin i kořenů. Námi získané výsledky z nádobových pokusů ve skleníku neposkytují dostatečné informace o chování přípravku v půdě s rozdílnou hodnotu pH, proto je nezbytné ověřit získané výsledky v polních pokusech.

Ondřej et al. (2010a) publikovali výsledky, kde v polních pokusech posuzovali vliv na životaschopnost a rozklad sklerocií námele. Životaschopnost sklerocií byla ovlivněna jejich umístěním, jejich stářím, hloubkou umístění a přítomností konidií *Clonostachys rosea*. Nejvyšší životaschopnost vykazovala sklerocia ve stáří 1 – 2 let, sklerocia ve věku od 3 let a více již ztrácely schopnost klíčení. Prokázalo se, že sklerocia ve stáří 1 – 2 let byla z 80% degradována *Clonostachys rosea*. Degradace starších sklerocií byla způsobena bakteriemi, roztoči, hlísticemi a též houbami z rodu *Trichoderma*, *Fusarium*, *Clonostachys* atd.

V uskutečněných pokusech ve skleníku jsme zaznamenaly výskyt sklerocií napadených *Clonostachys rosea*, ostatní nenalezena sklerocia byla pravděpodobně v půdě degradována.

Xue (2003) při pokusech v ochraně krmného hrachu v Kanadě získal výsledky, které dokazují účinnost kmenu *Clonostachys rosea* ACM941 vůči *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aphanomyces euteiches* a *Mycosphaerella pinodes*. Aplikací tohoto kmenu došlo ke zvýšení klíčivosti semen hrachu o 44% a k výraznému snížení jmenovaných fytopatogenních hub. Jensen et al. (2011) uvádějí, že *Clonostachys rosea* IK726 poskytuje vysoký stupeň ochrany vůči hlavním fytopatogenům obilnin: *Fusarium culmorum*, *Tilletia tritici*, *Bipolaris sorokiniana*. Prokinová (2013) předpokládá, že by se do budoucna dalo využít přípravků na bázi *Clonostachys rosea* při ochraně polních plodin na podzim, k potlačení *Sclerotinia sclerotiorum*, *Claviceps purpurea* a *Rhizoctonia* spp. Ondřej a kol. (2011) získali výsledky, které ukazují, že *Clonostachys rosea* je schopna mykoparazitické aktivity již při půdních teplotách (5 - 10)°C a tím zabezpečuje rozklad sklerocií v půdě během zimního období. V polních pokusech i testech in vitro vykazuje *Clonostachys rosea* antagonistickou aktivitu vůči fytopatogenní *Sclerotinia sclerotiorum*. Ze získaných informací a námi dosažených výsledků jak v in vitro pokusech, tak i pokusech ve skleníku usuzujeme, že testovaný přípravek, respektive jeho účinná složka – konidie *Clonostachys rosea* vykazují antagonistickou aktivitu vůči vybraným patogenům a jejich míra antagonistické aktivity je pouze z menší míry ovlivněna pH prostředí. V pokusech in vitro bylo prokázáno, že nejvyšší míru antagonistické aktivity vykazuje *Clonostachys rosea* při mírně kyselém, neutrálním a mírně zásaditém pH což je dobrý předpoklad pro ošetření běžně pěstovaných polních plodin, které právě takové pH vyžadují. Tento předpoklad potvrzují autoři ve svých publikacích: Hosnedl a Hochman (1994) uvádějí, že pro hrách je nejvhodnější pH 6 – 7. Faměra (1993) uvádí pH pro ozimou pšenici 6,2 – 7. Kunzová a kol. (2012) se zmiňuje o nejvhodnějším pH pro slunečnici, které by se mělo pohybovat v rozmezí od 5,5 – 6,5. Richter a kol. (2001) publikovali, že pro pěstování ozimé řepky je vhodné pH 6 – 7,2.

U dvou šarží (16321212 a 24EX1221) byl značný rozdíl v počtu klíčivých výtrusů *Clonostachys rosea* při prvním hodnocení v dubnu 2013, tj. po roce, resp. po 11 měsících skladování v závislosti na kultivačním médiu. Tento výsledek je v souladu s literárními údaji, ve kterých autoři hodnotili vliv kultivačního média na tvorbu výtrusů mikroskopických hub. Význam složení kultivačního média pro produkci konidií *Trichoderma harzianum* 1211, *T. virens* 9011, *T. atroviride* 6022 a *T. koningii* 2 a vliv na jejich životnost dokládají např. Panahian et al. (2012). Životnost *Clonostachys rosea* kmen IK726 uchovávané na zrnech

ječmene testovali Jensen et al. (2002) při skladování v teplotě 4° C a 20° C. V nižší teplotě poklesla životnost po pěti měsících skladování o jeden řád a účinnost *C. rosea* proti *Bipolaris sorokiniana* byla stále vysoká. Konstatovali, že konidie produkované na pevném živném médiu přežívaly lépe než ty, které byly vyprodukované na tekutém médiu. Při skladování v teplotě 20° C došlo k poměrně značnému snížení životnosti již po třech až pěti měsících. Pokud byla ale zrna ječmene s *C. rosea* uchovávána v silikagelu v teplotě 20° C, ke snížení životnosti konidií nedošlo ani po 6 měsících. U obou uvedených námi testovaných šarží byl zjištěn menší počet vyrostlých kolonií ve srovnání s ostatními hodnocenými šaržemi přípravku. To odpovídá tomu, že obě šarže byly skladovány již 12 a 11 měsíců, zatímco ostatní šarže byly skladovány po dobu 7,5 a 4 měsíců. Minimální doba životnosti mikroskopických hub a bakterií obsažených v biologických přípravcích je obvykle přibližně deset měsíců. To dokládají např. Abdel - Kader et al. (2012), testovali ve skleníkových pokusech životnost bakterií *B. subtilis*, *P. fluorescens* a houby *T. harzianum* uchovávaných v průběhu skladování ve formě smáčitelného prášku a konstatovali, že po deseti měsících nedošlo ke snížení jejich životnosti. Při našem posledním hodnocení v prosinci byly zjištěné počty živých spor u všech hodnocených šarží překvapivě vyšší než při hodnocení na konci října. Vzhledem k tomu, že byla dodržována stále stejná metodika a používány standardní živné půdy neumíme pouze na základě dosavadních výsledků tento jev vysvětlit. Nabízí se otázka, zda může vysoká teplota během skladování (vzorky byly skladovány v místnosti, zapečetěné), která v měsících červenec a srpen dosahovala v odpoledních hodinách v místnosti až 35°C, být příčinou dormance spor *Clonostachys rosea*. Jde však o domněnku, kterou bude třeba ještě potvrdit nebo vyvrátit. V každém případě lze konstatovat, že testovaný přípravek, resp. jeho účinná složka – konidie *Clonostachys rosea*, si uchovávají dostatečně vysokou životnost po dobu nejméně sedmi měsíců.

## 7 Závěr

V testech in vitro bylo prokázáno, že pH mírně ovlivňuje antagonistickou aktivitu *Clonostachys rosea*. Avšak *Clonostachys rosea* stále inhibuje růst vybraných patogenů *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* a *Botrytis cinerea* a to nejlépe v mírně kyselém, neutrálním a mírně zásaditém pH. Z výsledků skleníkových pokusů usuzujeme, že upravené pH též mírně ovlivňuje antagonistickou aktivitu *Clonostachys rosea*. Dalo by se tedy předpokládat, že testovaný přípravek by bylo možné využívat k ochraně rostlin, rostoucích na půdách s rozličnými hodnotami pH. Výsledky skleníkových pokusů nám však stále nepřináší dostatečné informace o chování testovaného přípravku. Proto je nezbytné tyto výsledky ověřit v polních pokusech.

Testovaný přípravek, resp. jeho účinná složka – konidie *Clonostachys rosea*, si uchovávají dostatečně vysokou životnost po dobu nejméně sedmi měsíců.

## 8 Seznam literatury

Abdel - Kader M. M., El - Mougy N. S., Aly M. D. E., Lashin S. M. 2012. Long Activity of Stored Formulated Bio – Agents Against Some Soil - Borne Plant Pathogenic Fungi Causing Root Rot of Some Vegetables. *Journal of Applied Sciences Research*. 8(4). 1882-1892.

Aleandri, M. P., Magro, P., Chilosi, G. 2007. Modulation of host pH during the wheat–*Fusarium culmorum* interaction and its influence on the production and activity of pectolytic enzymes. *Plant Pathology*. 56 (3). 517 – 525.

Anonym 1. 2003. Polyversum – Biogarden. [online]. [cit. 21. 2. 2014]. Dostupné z <<http://www.agromanual.cz/cz/pripravky/fungicidy/fungicid/polyversum-biogarden.html>>.

Anonym 2, 2003. Contans WG. [online]. [cit. 21. 2. 2014]. Dostupné z <[http://www.agromanual.cz/download/pdf\\_etiketa/e\\_contans\\_wg.pdf](http://www.agromanual.cz/download/pdf_etiketa/e_contans_wg.pdf)>.

Anonym 3, rok neznámý. Supresivit. [online]. [cit. 21. 2. 2014]. Dostupné z <[http://www.homegrown.cz/fotky4018/fotov/d\\_\\_ps\\_315supersivit.pdf](http://www.homegrown.cz/fotky4018/fotov/d__ps_315supersivit.pdf)>.

Anonym 4, rok neznámý. Gliorex – pomocný rostlinný přípravek. [online]. [cit. 28. 3. 2014]. Dostupné z <[http://www.agritec.cz/new/images/dokumenty/Letaky/gliorex\\_letak.pdf](http://www.agritec.cz/new/images/dokumenty/Letaky/gliorex_letak.pdf)>.

Anonym 5, 2014. Mykorhizní přípravky řady Symbiom – záruka vysoké kvality a profesionality. [online]. [cit. 28. 3. 2014]. Dostupné z <<http://www.symbiom.cz/profi>>.

Anonym 6, 2008. Seznamte se s RIZOBINEM. [online]. [cit. 28. 3. 2014]. Dostupné z <<http://www.rizobin.cz/>>.

Anonym 7, 2007. Prometheus CZ. [online]. [cit. 28. 3. 2014]. Dostupné z <<http://www.monastechnology.cz/index.php/prometheus-cz>>.

Baek, J. M., Howell, C. R., Kenerley, C. 1999. The role of extracellular chitinase from *Trichoderma virens* GV 29 – 8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics*. 35. 41 – 50.

Baloyi, M. A., Laing, M. D., Yobo, K. S. 2011. Isolation and *in vitro* screening of *Bacillus thuringiensis* and *Clonostachys rosea* as biological control agents against sheep nematodes. African Journal of Agricultural Research. 6 (22). 5047 – 5054.

Bélanger, R. R., Dufour, N., Caron, J., Benhamoun, N. 1995. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: indirect evidence for sequential role of antibiotics and parasitism. Biocontrol Science and Technology. 5. 41 – 53.

Cota, L. V., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S. G., Macedo, P. E. F. 2009. Biological control by *Clonostachys rosea* as a key component in the integrated management of strawberry gray mold. Biological control. 50 (3). 222 – 230.

Cota, L. V., Maffia, L. A., Mizubuti, E. S. G., Macedo, P. E. F., Antunes, R. F. 2008. Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. Biological control. 46 (3). 515 – 522.

Duková, K. 2013. Ošetření osiva ozimé pšenice proti patogenům přenosným osivem. Bakalářská práce, v držení Katedry ochrany rostlin ČZU v Praze.

Faměra, O. 1993. Základy pěstování ozimé pšenice. Institut výchovy a vzdělávání Mze ČR v Praze. 51 s. ISBN 80 – 7105 – 045 – 8.

Garcia, R. A. M., ten Hoopen, G. M., Kass, D. C. J., Garita, V. A. S., Krauss, U. 2003. Evaluation of mycoparasites as biocontrol agents of *Rosellinia* root rot in cocoa. Biological Control. 27 (2). 210 – 227.

Haggag, W. M., Mohamed, H. A-L. A. 2007. Biotechnological aspects of microorganisms used in plant biological control. American – Eurasian Journal of Sustainable Agriculture. 1. 1-12.

Hosnedl, V., Hochman, M. 1994. Základy pěstování hrachu. Institut výchovy a vzdělávání Mze ČR v Praze. 44 s. ISBN 80 – 7105 – 069 – 5.

Howell, C. R., Stipanovic, R. D., Lunsden, 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. 435 – 441.

Chatterton, S., Punja, Z. K. 2010. Factors influencing colonization of cucumber roots by *Clonostachys rosea* f. *catenulata*, a biological disease control agent. *Biocontrol Science and Technology*. 20 (1). 37 – 55.

Chen, L. C., Lai, Y. K., Wu, S. C., Lin, C. C., Guo, J. H. 2006. Production by *Clonostachys compactiuscula* of a lovastatin esterase that converts lovastatin to monacolin J. *Enzyme and Microbial Technology*. 39 (5). 1051 – 1059.

Chet, I., Chernin, L. 2002. Biocontrol microbial agents in soil. Bitton G (ed) *Encyclopedia of environmental microbiology*, vol 1. Wiley, New York., p 450 – 465.

Islam, T. M., Hashidoko, Y., Deora, A., Tahara, S. 2005. Suppression of dumping-off disease in host plants by the rhizoplane bacterium *Lysobacter* sp. strain SB-K88 is linked to plant colonization and antibiosis against soilborn a Perenosporomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*. 71. 3786-3796.

Jensen, B., Knudsen, I. M. B., Madsen, M., Jensen, D. F. 2004. Biopriming of Infected Carrot Seed with an Antagonist, *Clonostachys rosea*, Selected for Control of Seedborne *Alternaria* spp. *The American Phytopathological Society*. 94 (6). 551 – 560.

Jensen, B., Knudsen, I. M. B., Jensen, D. F. 2002. Survival of Conidia of *Clonostachys rosea* on Stored Barley Seeds and Their Biocontrol Efficacy Against Seed – borne *Bipolaris sorokiniana*. *Biocontrol Science and Technology*. 12 (4). 427-441.

Kiss, L. 2003. A review of fungal antagonists of powdery mildews and their potential as biological agents. *Pest Management Science*. 59. 475-483.

Krauss, U., Hoopen, M., Rees, R., Stirrup, T., Argyle, T., George, A., Arroya, C., Corrales, E., Casanoves, F. 2013. Mycoparasitism by *Clonostachys byssicola* and *Clonostachys rosea*



on *Trichoderma* spp. from cocoa (*Theobroma cacao*) and implication for the design of mixed biocontrol agents. *Biological control*. 67 (3). 317 – 327.

Kunzová, E., Veverka, K., Škarpa, P., Zupalová, H. 2012. Výživa, hnojení a ochrana slunečnice. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i. 41 s. ISBN 978 – 80 – 7427 – 126 – 7.

Li, B. Q., Wang, W. H., Zong, Y. Y., Qin, G. Z. 2012. Exploring Pathogenic Mechanisms of *Botrytis cinerea* Secretome under Different Ambient pH Based on Comparative Proteomic Analysis. *Journal of Proteome Research*. 11 (8). 4249 – 4260.

Mamarabadi, M., Jensen, D. F., Lübeck, M. 2009. An N – acetyl –  $\beta$  – d – glukosaminidase gene, *cr – nag1*, from the biocontrol agent *Clonostachys rosea* is upregulated in antagonistic interaction with *Fusarium culmorum*. *Mycological Research*. 113. 33 – 43.

Muhsin, T. M., Selman, M. S. 2012. In vitro, optimization of growth and bioactivity of antibacterial metabolite produced by *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Journal of Basrah Researches (Sciences)*. 39 (1A). 101 – 111.

Narayanasamy, P. 2013a. *Biological Management of Diseases of Grops. Volume 1: Characteristics of Biological Control Agents*. Springer Dordrecht Heidelberg New York London. p. 673. ISBN: 978 – 94 – 007 – 6379 – 1.

Narayanasamy, P. 2013b. *Biological Management of Diseases of Grops. Volume 2: Integration of Biological Control Strategies with Crop Disease Management Systems*. Springer Dordrecht Heidelberg New York London. p. 346. ISBN: 978 – 94 – 007 – 6376 – 0.

Ondráčková, E., Ondřej, M., Prokinová, E., Nesrsta, M. 2013. Mycoparasitic fungi reducing the incidence and virulence of *Bipolaris sorokiniana*. *Czech Mycology*. 65 (1). 103 – 112.

Ondřej, M., Cagaš, B., Ondráčková, E. 2010a. Effect of the mycoflora of ergot (*Claviceps purpurea*) sclerotia on their viability. *Plant Protection Science*. 46 (2): 66 – 71.

Ondřej, M., Ondráčková, E., Cagaš, B., Nesrsta, M. 2010b. Využití houby *Clonostachys rosea* k redukci půdních patogenů. *Rostlinolékař*. 2. 18 – 22.

Ondřej, M., Ondráčková, E., Cagaš, B., Nesrsta, M. 2011. Mykoparazitické houby redukující námelovitou žita. *Farmář*. 4. 18 – 22.

Ondřej, M., Ondráčková, E., Cagaš, B., Nesrsta, M. 2012. Biologická ochrana travníků proti patogenním houbám. *Úroda*. 12. 25 – 28.

Panahian, Gh. R., Rahnama, K., Jafari, M. 2012. Mass production of *Trichoderma* spp. and application. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*. 3 (2). 292-298.

Penn, C. D., Daniel, S. L. 2013: Salicylate Degradation by the Fungal Plant Pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Current Microbiology*. 67 (2). 218 – 225.

Prokinová, E. 1996. Biologická ochrana proti houbovým chorobám rostlin. Ústav zemědělských a potravinářských informací. Praha. 39 s. ISSN: 0862 – 3562.

Prokinová, E. 2013. Ochrana polních plodin na podzim. *Farmář*. 8. 38 – 40.

Reeh, K. W., Cutler, G. C. 2013. Laboratory efficacy and fungicide compatibility of *Clonostachys rosea* against *Botrytis* blight on lowbush blueberry. *Canadian Journal of Plant Science*. 93 (4). 639 – 642.

Richter, R., Hřivna, L., Cerkal, R. 2001. Výživa a hnojení ozimé řepky. Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin. Praha. 41 s. ISBN 80-238-8096-9.

Rodríguez, M. A., Cabrera, G., Godeas, A. 2006. Cyclosporine A from *Fusarium oxysporum* suppressing *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Applied Microbiology*. 100. 575 – 586.

Rodríguez, M. A., Cabrera, G., Gozzo, F. C., Eberlin, M. N., Godeas, A. 2011. *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. *Journal of Applied Microbiology*. 110 (5). 1177 – 1186.

Schoroers, H. J., Samuels, G. J., Seifert, K. A., Gams, W. 1999. *Clonostachys rosea* [online]. [cit. 8. 2. 2014]. Dostupné z <<http://www.mycobank.org/BioMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=51343&Fields=All>>.

Schroers, H. J. 2001. Taxon descriptions [online]. [cit. 2. 4. 2012]. Dostupné z <<http://www.mycobank.org/BioMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=58623&Fields=All>>.

Věchet, L. 2010. Biologická ochrana a indukovaná rezistence rostlin k chorobám a škůdcům. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Praha. 34 s. ISBN: 978 – 80 – 7427 – 048 – 2.

Věchet, L. 2012. Biologická kontrola chorob rostlin. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Praha. 38 s. ISBN: 978 – 80 – 7427 – 114 – 4.

Viccini, G., Mannich, M., Capalbo, D. M. F., Valdebenito – Sanhueza, R., Mitchell, D. A. 2007. Spore production in solid - state fermentation of rice by *Clonostachys rosea*, a biopesticide for gray mold of strawberries. *Process Biochemistry*. 42 (2): 275 – 278.

Xue, A. G. 2003. Biological Control of Pathogens Causing Root Rot Complex in Field Pea Using *Clonostachys rosea* Strain ACM941. *The American Phytopathological Society*. 93 (3). 329 – 335.

Yadav, S., Srivastava, A. K., Singh, D. P., Arora, D. K. 2012. Isolation of Oxalic acid tolerating fungi and decipherization of its potential to control *Sclerotinia sclerotiorum* through oxalate oxidase like protein. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 28 (11). 3197 – 3206.

Zou, Ch. G., Tao, N., Liu, W. J., Yang, J. K., Huang, X. W., Tu, H. H., Gan, Z. W., Zhang, K. Q. 2010. Regulation of subtilisin-like protease *prC* expression by nematode cuticle in the nematophagous fungus *Clonostachys rosea*. *Environmental Microbiology*. 12 (12). 3243 – 3252.

## 9 Seznam příloh

Příloha 1: Vliv pH na antagonistickou aktivitu *Clonostachys rosea* z přípravku vůči vybraným patogenům (tabulky 1 – 8)

Příloha 2: Ilustrační fotografie – typy konidioforů *Clonostachys rosea*

Příloha 3: Ilustrační fotografie – skleník