

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA**

**Zemědělská fakulta v Českých Budějovicích**

Katedra rostlinné výroby-oddělení ochrany rostlin

Téma bakalářské práce:

**Studium suprese fytopatogenní houby *Sclerotinia sclerotiorum***

**pomocí mykoparazitické houby *Coniothyrium minutans***

**Vedoucí bakalářské práce:**

Ing. Andrea Bohatá Ph.D

Katedra rostlinné výroby

ZF JU v Českých Budějovicích

**Autor bakalářské práce:**

Jana Bílková

Zemědělská specializace

Biologie a ochrana zájmových organismů

České Budějovice Duben 2011

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zemědělská fakulta

Katedra: Katedra rostlinné výroby

Školní rok:2010/2011

## **Zadání bakalářské práce**

### **Jméno a příjmení**

Jana Bílková

### **Obor**

Zemědělská specializace

Biologie a ochrana zájmových organismů

### **Název tématu**

Studium suprese fytopatogenní houby *Sclerotinia sclerotiorum* pomocí mykoparazitické houby *Coniothyrium minitans*

### **Zásady pro vypracování:**

(obsahují cíle práce a metodický postup)

1. Literární přehled shrnující nové poznatky z oblasti suprese fytopatogenní houby *S. sclerotiorum* pomocí mykoparazitické houby *C. minitans*
2. Zaměření na využití mykoparazitických hub v biologické ochraně rostlin proti původcům onemocnění
3. Charakteristika mykoparazitické houby *C. minitans*, houby rodu *Trichoderma* a fytopatogenní houby *S. sclerotiorum*
4. Využití laboratorních testů „in vitro“ na zjištění suprese *S. sclerotiorum* pomocí různých kmenů *C. minitans*
5. Vyhodnocení růstové a produkční vlastnosti *C. minitans*, které by mělo sloužit k objektivnímu posouzení a ověření možnosti využít mykoparazitickou houbu *C. minitans* v ochraně rostlin proti hlízence obecné (*Sclerotinia sclerotiorum*)

Rozsah grafických prací:

Rozsah průvodní zprávy:

Seznam odborné literatury:

1. Esser K., Lemke P.A. 2002: The Mycota XI.-Agricultural Applications. *Springer, Verlag Berlin Heidelberg*, pp 388.
2. Butt T.M., Jackson C., Magan N. 2001: Fungi as biocontrol agents – progress, problems and potential. *CAB International, Wallingford, UK*, 23-69
3. A., Mukerji K.G. 2008: Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria, Vol. 3. *Springer Science and Business Media B.V.*, pp. 419.

Publikace získané retrospektivní a průběžnou rešerší v bibliografické databázi CAB

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Andrea Bohatá, PhD.

Datum zadání bakalářské práce:

Únor 2010

Datum odevzdání bakalářské práce:

Duben 2011

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Vedoucí katedry

Prof. Ing. Miloslav Šoch, Csc.

Děkan

V Českých Budějovicích dne 26. dubna 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Studium suprese fytopatogenní houby *Sclerotinia sclerotiorum* pomocí mykoparazitické houby *Coniothyrium minitans*“ vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a materiálů uvedených v seznamu bakalářské práce

Duben 2011

.....  
Jana Bílková

Děkuji své vedoucí bakalářské práce Ing. Andree Bohaté, Ph.D. a prof. Ing. Zdeňku Landovi, CSc. za metodické a odborné vedení, podnětné připomínky a cenné praktické rady, které mi poskytovali v průběhu zpracování této práce.

Dále děkuji pracovním katedry rostlinné výroby, oddělení ochrany rostlin Marii Nýdlové a Olze Divišové za nezištnou pomoc při zakládání pokusů a vytvoření vhodných pracovních podmínek.

## Obsah bakalářské práce:

1	Úvod	1
2	Literární přehled	2
2.1	Biologická ochrana	2
2.2	Strategie biologické ochrany	3
2.3	Využití biologické ochrany v různých kulturách	4
2.4	Metody biologické ochrany	5
2.5	Mykoparazitické houby	8
2.6	<i>Coniothyrium minitans</i>	9
2.7	Houby rodu <i>Trichoderma</i>	13
2.8	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	14
2.9	Biopreparáty na bázi mykoparazitických hub registrovaných v ČR	17
3	Materiál a metodika	19
3.1	Mykoparazitická houba <i>C.minitans</i>	19
3.2	Fytopatogenní houba <i>S.sklerotiorum</i>	20
3.3	Standartní umělé živné půdy	20
3.4	Kultivace matečných kultur	21
3.5	Příprava pyknospor suspenzí	21
3.6	Laboratorní testy „in vitro“	21
3.7	Interakční „in vitro“ testy na agarových plotnách	22
3.8	Statistika	22
4.	Experimentální část a výsledky	23
5.	Diskuze a závěry	35
6.	Seznam literatury	38
	Příloha-grafické list	

## 1. Úvod

S rostoucí intenzitou pěstování vzrůstá hospodářský význam škodlivých organismů, jakožto jejich ochrany a prevence před těmito chorobami. Celosvětovým trendem se dnes stávají nově zaváděné přešlechtěné odrůdy, slibující na jedné straně vysoké výnosy a na straně druhé sníženou obranyschopnost, související s rychlým vývojem a šíření škůdců. Další negativní skutečností je i nadměrné používání neselektivních pesticidů vedoucí k indukci přemnožení sekundárních škůdců a oživení populací cílových parazitů. V globálním měřítku však chemická ochrana stále dominuje v područí slepé vidiny relativně snadného použití, rychlého nástupu účinku a v raných stádiích ošetření, také vysokých výnosů. Tento pohled je ovšem krátkozraký a po čase se setkáváme s problémy neodborných aplikací, vedoucí k hospodářským a ekologickým škodám či vytvořením silně resistantních druhů škodlivých organismů. Za jednoho z viníků je považován stále se zvětšující trh s potravinami a zemědělskými komoditami. Snaha o co největší zisky a uspokojení vysoké poptávky vede ke zjednodušení osevních postupů, což samozřejmě zkracuje interval mezi pěstováním stejné plodiny. Dále zde můžeme zařadit minimalizaci pěstební technologie či koncentrace jednoho druhu plodiny do velkých ploch. Značné rozdíly v zachování zdraví rostlin jsou patrné i na zřízení a systému hospodaření daného státu. Vyspělé státy si mohou dovolit řešit ekologické a kvalitativní otázky produkce, zatímco rozvojové země se často potýkají s problémy nedostatku potravin a řeší přednostně snížení ztrát v rámci nepříznivých vlivů. Finanční stránka věci se řadí mezi jeden z nejdůležitějších faktorů. Neochota pěstitelů dobrovolně ze svých zdrojů hradit náklady spojené s ochranou životního prostředí. Dostáváme se tedy do rozporu mezi ekonomické zájmy pěstitelů a ekologické zájmy společnosti. Požadavky konzumentů na levné a kvalitní potraviny ostře hraničí s nákladným využitím jiných nechemických metod hospodaření. Určitou hnací silou však mohou být cílené finanční dotace od státu pro relativně nové možnosti integrované ochrany rostlin a to především pro biologickou ochranu, která se dnes u nás i ve světě těší velké oblibě. Jistou nevýhodou je potřebná hlubší znalost aplikace přípravku na škodlivý organismus, jakožto i správné načasování použití. Výsledkem je pak odměna ve formě zdravého životního prostředí a dlouhodobě udržitelná kontrola nad nebezpečnými škůdci.

Cílem práce je objektivně posoudit a ověřit možnost využití mykoparazitické houby *C. minitans* v ochraně rostlin proti hlízečce obecné *S. sclerotiorum*. Realizovat modelovou studii polyfaktoriální charakteristiky vybraných kmenů mykoparazitické houby *C. minitans* se zaměřením na hodnocení růstových a produkčních vlastností kmenů na umělých živných půdách a přirozených substrátech.

## 2. Literární přehled

### 2.1 Biologická ochrana rostlin

Biologická ochrana je systém, který využívá přirozených antagonistů nebo jejich produktů za účelem regulace populací škodlivých organismů. Moderní prostředky biologické ochrany jsou vysoce a dlouhodobě účinné a zároveň jsou šetrné k lidskému zdraví a životnímu prostředí a mají nízkou nebo vůbec žádnou toxicitu k necílovým druhům. Tím zvyšují bohatost, diverzifikaci a stabilitu přírodních systémů v zemědělské krajině a umožňují kvalitní produkci (Anonym 1 - Biocont Laboratory spol s.r.o., 2008).

První použil v roce 1919 termín biologická ochrana k označení použití přirozených nepřátel k boji proti hmyzím škůdcům H. S. Smith. Tato teze byla pak později upřesněna De Bach (1964), který definoval biologickou ochranu jako činnost přirozených nepřátel (parazitů, predátorů nebo patogenních mikroorganismů) udržet populační hustotu škodlivého organismu na nižší úrovni, než by tomu bylo při jejich absenci.

Celkově jsou na světě v současné době k dispozici prostředky využívané v biologické ochraně na bázi téměř sto druhů a kmenů mikroorganismů, více než padesát druhů makroorganismů, asi padesát druhů přírodních produktů a stejný počet semiochemikálií (Bagar 2007). V přísném ekologickém duchu může být použití biologické ochrany rostlin považováno za strategii, která podporuje nebo zcela obnovuje biologickou diverzitu v agroekosystémech a to prostřednictvím klasické a/nebo augmentativní strategie biologické ochrany rostlin (Altieri, 1994). Výhodou používání biopreparátů na bázi mikroorganismů nebo makroorganismů je hlavně nezatěžování životního prostředí, z čehož vyplývá, že se dají upotřebit zejména v chráněných oblastech či v ochranných pásmech vod. Nevýhodou však může být pomalý nástup účinnosti biopreparátu, často omezená doba skladovatelnosti, nutná znalost bionomie jak patogena, tak i užitečného organismu (parazitoid, predátor, entomopatogen, mykoparazit) (Bagar 2007).



## 2.2 Strategie biologické ochrany rostlin

### Strategie inokulativní introdukce

Inokulativní metoda (tzv. *klasická biologická ochrana*) spočívá ve vysazení malého počtu endemického nebo neendemického druhu přirozeného nepřítele nebo druhu patogenního mikroorganismu do prostředí, kde je rozšířen škodlivý organismus. Může se jednat i o reintrodukcii bioagens do areálu, ve kterém se již dříve vyskytovalo. Cílem *inokulativní introdukce* je zajistit dlouhodobý efekt, kterého lze dosáhnout v případě úspěšného uchycení se nově (re)introdukovaného druhu bioagens (adaptace, reprodukce a namnožení, přirozené šíření v novém areálu...). Bioagens snižuje výskyt škodlivého organismu na nízkou, hospodářsky akceptovatelnou úroveň a následně se mezi nimi vytvoří dlouhodobá rovnováha. Takto vyvážený systém dlouhodobě brání kalamitnímu namnožení škodlivého organismu (Bagar 2007; Landa 2002).

### Strategie augmentativní introdukce

Strategie augmentativní (augmentace – zvětšení, zesílení, rozšíření) - hlavním principem této strategie je přímá manipulace s populacemi endemických nebo neendemických druhů přirozených nepřátel (mykoparazitických a antagonistických organismů) s cílem zvýšit jejich supresivní účinnost. Augmentativní strategie využívá praktické realizace této strategie ve velkokapacitních biotechnologiích produkce mikroorganismů a jejich komerční dostupnost ve formě standardních biologických biopreparátů (mikroorganismy).

a) Inundativní introdukce (inundace – zaplavení, překrytí) – jednorázové nebo opakované introdukce zpravidla velkého množství bioagens s cílem dosáhnou okamžité suprese šíření a vývoje chorob.

b) Sezónní inokulativní introdukce – opakované introdukce přirozených nepřátel a bioagens s cílem dosáhnout jak okamžité suprese původců onemocnění rostlin, tak i po celou dobu pěstitelského cyklu. V porovnání s inundativní metodou je hlavní rozdíl sezónní inokulace v tom, že struktura programu biologické ochrany není směřována pouze na jednorázovou supresi vývojového cyklu fytopatogenního mikroorganismu, ale na navození stavu, ve kterém ani při více infekčních cyklech fytopatogenní houby nedojde k překročení tolerovatelné úrovně (ekonomický práh škodlivosti). Touto metodou jsou realizovány velmi efektivní komplexní programy biologické ochrany různých druhů zelenin (zejména plodových) pěstovaných ve sklenících a folivnicích.

## Strategie podpory a konzervace přirozených nepřátel

Podpora přirozených antagonistů, kdy nejde o použití prostředků biologické ochrany jako takových, protože žádné bioagens do systému nedodáváme. Snahou je podporovat přirozené přírodní systémy, dlouhodobou stabilitou a vyvážeností. V principu je tato strategie zaměřena na podporu a konzervaci autochtonních populací přirozených nepřátel. Využíváme tedy přirozeně se vyskytující antagonisty jako nástroj vnitřních regulačních mechanismů. K obecným prvkům strategie podpory a konzervace přirozených nepřátel patří řada agroekologických a agronomických opatření (např. záměrné zakládání stabilních biokoridorů, diverzifikace hostitelských rostlin pěstovaných v polních podmínkách, minimalizace agrotechnických zásahů) (Bagar 2007; Landa 2002).

### 2.3 Využití biologické ochrany v různých kulturách

Ve skleníkách mohou být využívány velmi různorodé druhy bioagens. Skleník poskytuje příznivé podmínky pro tento způsob ochrany rostlin. Poskytují stabilní a regulované podmínky prostředí (teplota, vlhkost vzduchu a půdy), relativně dlouhé pěstování kultury a ohraničený prostor, který brání škůdcům migrovat dovnitř, a naopak bioagens opustit chráněný prostor.

U sadů a vinic je výhodou jejich dlouhodobé pěstování na jednom stanovišti. V sadech i vinicích dochází často ke vzniku rovnovážného vztahu mezi bioagens a škodlivým organismem. Tento ekosystém je vhodný pro podporu přirozeně se vyskytujících užitečných organismů.

Na orné půdě u polních plodin je vzhledem k rozloze dosud relativně málo využívána biologická ochrana rostlin. Je to dáno velmi málo stabilními podmínkami prostředí, zejména kolísavá teplota a vlhkost. V těchto podmínkách se uplatňuje spíše metoda inundativní, kdy se biologický přípravek aplikuje v širokém měřítku a nepředpokládá se dlouhodobé působení. V dnešní době se ale velmi rozrůstá používání biopreparátů určených proti houbovým a bakteriálním onemocněním. Na trhu v České republice se využívají přípravky Contans WG, Supresivít a Polyversum (Bagar 2007).

## 2.4 Metody biologické ochrany

### a) Introdukce antagonisty do prostředí

Metoda záměrné introdukce patogena do prostředí je nejvíce prostudovaná a v současné době v praxi nejčastěji používaná metoda biologické ochrany rostlin proti fytopatogenním mikroorganismům. Biologická ochrana rostlin proti původcům onemocnění rostlin může být definována jako redukce množství inokula nebo patogenní aktivity patogena pomocí jednoho nebo více mikroorganismů s mykoparazitickou nebo antagonistickou aktivitou (Landa 2002). Tyto mikrobiální interakce, které se vyskytují mezi organizmy v přirozeném prostředí, slouží jako základní mechanismy, na jejichž principech dochází pak k úspěšné regulaci fytopatogenních organizmů mykoparazity. Metody biologické ochrany proti původcům onemocnění rostlin lze rozčlenit na metody přímé a nepřímé (Alabouvette, Lemanceau 1999). Vzhledem ke složitosti vazeb mezi organizmy v prostředí je toto členění značně teoretické a jednotlivé metody vykazují řadu modifikací a vzájemně se prolínají (Landa 2002). Antagonistické projevy mezi mykoparazity zahrnují antibiózu, kompetici a parazitismus (Alabouvette, Lemanceau 1999). Antagonismus je vlastně jevem vzájemného vztahu mezi různými organismy, při kterém jeden organismus částečně nebo úplně inhibuje růst organismu druhého nebo jej usmrcuje (Kůdela et al. 1989).

### Antibioza

Antibioza vytváří reakce mezi organizmy, jež vyvolávají tvorbu nízkomolekulárních difúzních látek nebo antibiotik. Díky těmto metabolitům dochází k úplné destrukci či inhibici růstu a vývoje jiného organismu (Handelsman, Parke 1989). Tato antibiotika byla definována jako organické látky produkované mikroby, které jsou v nízkých koncentracích škodlivé pro růst nebo metabolismus jiných mikroorganismů (Gottlieb, Shaw 1970). Jiná definice omezuje antibiózu jen na vylučování kyseliny mléčné, etanolu, enzymů nebo jích podobných látek (Goldberg 1959). Ovšem antibioza může být i důsledkem produkce alkoholu nebo změny pH prostředí. Příkladem antagonistické houby, která produkuje důležitá antibiotika je například *Trichoderma virens* (Howell a Stipanovic 1983). Velmi zajímavé je i rozdělení kmenů *Trichoderma virens* podle jejich antibiotického profilu, na skupinu kmenů produkující gliotoxin usmrcující patogena *Rhizoctonia solani* a skupinu produkující gliovirin, který je například schopný usmrcovat houbu *P. ultimum* (Howell 1999).

## Kompetice

Tento pojem si můžeme vysvětlit jako nadřazenost jednoho organismu nad druhým při získávání a využívání nutričních zdrojů nebo též omezení přístupu k těmto zdrojům (Chet et al. 1997). O kompetici se může jednat v souvislosti s kyslíkem, živinami i prostorem (Baker, Cook 1974). Co se týče vody, schopnost příjmu je daná vodním potenciálem a tak mikroorganismy významně neovlivňuje. Množství kyslíku pro jakoukoliv buňku umístěnou v půdě či u kořenů je velmi důležité, a tak ve vlhkých půdách se tento faktor může stát limitující (Griffin, 1968). Živiny, jakožto produkty semen, kořenů a organických substrátů se pak dostávají do půdy skrz koncentrační spád či difúzy. Prostorová kompetice je pak přímo úměrná růstové rychlosti organismu a odráží tu skutečnost, že pokud jeden organismus osídlí substrát, pak si již tuto svou pozici udrží i v případě konfrontace s jiným agresivnějším organismem (Baker a Cook 1974).

## Mykoparazitismus

Byl poprvé popsán Weinlingem (1932), který zaznamenal mykoparazitismus houby *Trichoderma lignorum* na několika fytopatogenech rostlin. Mykoparazitismus můžeme definovat jako nutriční závislost jednoho druhu houby na jiném, kdy dochází k přímému napadení za účelem využití živin. Tento vztah byl popsán u všech skupin hub počínaje oddělením Chytridiomycota až po oddělení Basidiomycota (Jeffries, 1997). Proces získávání živin může probíhat nejdříve rozpoznáním hostitele pokračujícím řízeným růstem k jeho hyfám. Mykoparazit se přimkne k hyfám hostitele a následně do nich proniká nebo začne hyfy hostitele omotávat infekčním myceliem. Omotávání hyf hostitele místo penetrace, může být považováno za projev rezistence hostitele (Veselá 1986). Mykoparazitismus můžeme klasifikovat na nekrotrofní a biotrofní parazitismus (Barnett a Binder 1973). Nekrotrofní mykoparazit, jak už název napovídá, své hostitelské buňky nejdříve usmrtí a pak do nich pronikají. Jsou často velmi agresivní a napadají široké spektrum hostitelů (Manocha 1990, Jeffries 1997). K usmrcování dochází degradací buněčných stěn skrze produkci hydrolytických enzymů (chitináza,  $\beta$ -1,3 glukanázy, celulázy), toxinů nebo antibiotik. Produkce enzymů je velmi důležitá v biologické ochraně rostlin (Lewis a Papavizas 1987). Biotrofní parazit se určitou dobu vyvíjí na živém hostiteli, aniž by ho usmrcovali. Biotrofní mykoparazit ovlivňuje hostitele, tím, že hostitel pomalu roste a špatně se vyvíjí. K usmrcení dochází až po utilizaci živin (Jeffries 1995). Typické pro biotrofní mykoparazity je úzké spektrum hostitelů, tvorba specifických infekčních struktur (Manocha 1990) a v porovnání s nekrotrofními mykoparazity nulová produkce exotoxinů (Jeffries 1997)

## Klasifikace mykoparazitů podle hostitelsko-parazitických interakcí (Jeffries 1997)

---

### ***Nekrotrof***

kontaktní nekrotrof	mykoparazit rostoucí v úzkém kontaktu s hostitelskými hyfami, aniž by do nich penetroval
invazivní nekrotrof	hyfy mykoparazita penetrují do hyf hostitele, rostou v nich a způsobují jejich nekrózu a rozklad

---

### ***Biotrof***

haustoriální biotrof	proniká do hyfy hostitele pomocí krátkých hyfálních větví (haustorií)
vnitrobuněční biotrof	penetruje do hyfy hostitele a obnažený protoplast ze stélky mykoparazita proniká do napadené cytoplazmy
fúzijící biotrof	stěny hyf hostitele a parazita se v místě dotyku těsně spojují, hyfa hostitele není hyfou parazita zjevně penetrována, ale vytvářejí se mezibuněčné kanálky propojující protoplasty hostitele a parazita

---

### b) Introdukce avirulentních a hypovirulentních kmenů fytopatogenních organismů

Principem této metody je záměrné využívání kmenů patogenů s výrazně oslabenou patogenní aktivitou. Při praktickém využívání této metody jsou využívány nepatogenní kmeny nebo hypovirulentní (tj. slabě patogenní) kmeny fytopatogenních hub. Oslabené kmeny nemají schopnost vyvolat onemocnění rostliny nebo mají tuto schopnost sniženou, a i při vhodných podmínkách prostředí nedochází ke vzniku infekce (Landa 2002). Nepatogenní kmen druhu *Fusarium oxysporum* se využívá v biologické ochraně rostlin proti patogenním kmenům *Fusarium oxysporum* (Edel-Hermann et al. 2009).

### c) Indukce resistance rostlin

Indukovanou rezistenci rostlin můžeme chápat jako nepřímou metodu ochrany rostlin a patří mezi důležitou metodu (Sequeira 1983, Kuae 1987, Kloepper et al. 1992). Indukovaná resistance je fyziologický „stav zvýšené obranné schopnosti“ vyvolaný specifickými vnějšími

stimuly, pomocí něhož jsou vrozené obrany rostlin zesíleny následnými biotickými změnami (van Loon et al., 1998). Rezistence rostlin může být navozena lokálně nebo systemicky (ISR). Systemická indukovaná rezistence může být navozena různými mikroorganismy za účelem ochrany rostliny proti půdním či listovým patogenům (Paulitz and Matta 1999). Rostliny mají potenciální nebo faktickou schopnost využívat různé přirozené obranné mechanismy, které limitují infekci patogenem. Obranné mechanismy rostlin mohou být indukovány biotickými a některými abiotickými faktory (tzv. elicitory). Biotickými elicitory mohou být jak vlastní patogenní a nepatogenní organizmy, tak i jimi produkované metabolity. Nejznámějšími obrannými reakcemi rostlin je například zesilování buněčných stěn (depozice a akumulace ligninu, celulózy, fenolytických látek, aj.), produkce antibiotických molekul (fytoalexinů), odumření hostitelské buňky v místě infekce (hypersenzitivní reakce) a produkce reaktivních kyslíkatých látek, spojená se zvýšenou peroxidázovou aktivitou a polymerizací buněčných fenolů (Hammerschmidt a Kuae 1982; Lamb et al. 1989; Kuc 1995). Rostliny jsou také schopné vyvíjet rezistenci proti následnému šíření a vývoji fytopatogenů v neinfikovaných pletivech. Obranné mechanismy rostlinného organismu indukují dlouhotrvající, širokospektrální systémovou rezistenci k dané infekci (Ryals et al. 1994). Patogen *Coletotrichum orbiculare* je využíván jako elicitor. Patogen je aplikován na děložní listy nebo první pravý list, vlivem jeho patogenezise navozuje rezistenci na svrchních listech téže rostliny. Některé bioagens využívané v biologické ochraně rostlin mohou být využity jako elicitory. Příkladem je druh bakterie *Pseudomonas* sp. a mykoparazitická houba *Trichoderma* sp.. Tyto bioagens jsou schopny navodit obranné mechanismy v rostlinách (Haas and Defago 2005, Harman 2004).

#### d) Využití supresivních půd

Pojem supresivita se vztahuje k půdě a jsou jí označovány půdy, ve kterých je výrazně potlačena možnost napadení rostliny patogeny. Většinou se patogen není schopen v supresivní půdě usídlit a pokud se usídí je ovlivněn přirozenými nepřáteli. Vlastnost supresivních půd je pravděpodobně dána jak souborem abiotických (fyzikálních, chemických), tak i biotických (antagonistické mikroorganismy) faktorů (Chytilová a Dušek 2007).

### 2.5. Mykoparazitické houby

Mykoparazitické houby jsou přirozenými nepřáteli fytopatogenních hub, které způsobují různá onemocnění rostlin. Svoji aktivitu neprojevují na větší vzdálenost, ale jen při

těsné asociaci hostitele a mykoparazita (Okrouhlá 1993). Mykoparazitické houby byly poprvé popsány roku 1800 mykology, kteří se zajímali o choroby rostlin (Veselá 1986). V současné době je popsáno okolo 1000-2000 druhů mykoparazitických hub, které napadají přibližně 2500 druhů jiných hub (Prokinová 1996). Vztahy mezi mikroorganismy a patogeny rostlin byly známy již v třicátých letech, ovšem zájem o ně vzrostl až v posledních letech po důsledcích neuváženého používání chemických pesticidů. O biologickou ochranu se tedy začalo masově zajímat až na konci sedmdesátých let (Nesrsta 1991). Mykoparazitické houby lze rozdělit na parazity napadající půdní patogen, zejména druhy rodu *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* a na parazity hub napadající patogeny na nadzemních částech rostlin, příkladem *Ampelomyces quisqualis* parazitující na patogenu způsobující padlí rostlin. Některé mykoparazitické houby mají i pozitivní účinky i na růst a vývoj rostlin (Sejketov 1982).

2.6 *Coniothyrium minitans* W.A. Campb. 1947 (= *Paraconiothyrium minitans* (W.A. Campb.) Verkley 2004)

#### Morfologická charakteristika

Mykoparazitická houba *C. minitans* vytváří na ovesné živné půdě (oat meat agar) variabilní kultury. Zpočátku se tvoří chomáčkovité, slabé mycelium, které se postupně stává hustější a zrnitější díky začátku tvorby pyknid. Barva kultury je zpočátku světle žlutá a přechází přes světle hnědou barvu až do barvy olivové. Na konci sporulace kultura mění barvu na tmavě hnědou až černou. V myceliu se tvoří velký počet pyknid, které jsou uspořádány v řetízcích nebo jsou volně rozmístěny mezi hyfami. Konidiomata pyknidy jsou také tmavě hnědé až černé a jsou kulovité i oválné, v průměru 150-600 µm. Pyknidy se buď vnořují do živné půdy, nebo se vyvíjí na povrchu mycelia, oba typy pyknid mají otvor ostiolum. Stěna pyknidy je tvořena pseudoparenchymem, a je složena z několika vrstev. Vnější vrstva je tvrdá a silně pigmentovaná, vnitřní vrstva je měkká a hyalinní. Konidiogenní buňky jsou hyalinní, jednotlivě uspořádané, elipsoidní. Tvoří se enteroblasticky, phialidicky. Vyrůstají z vnitřní stěny pyknidy. Pyknospory jsou tmavé, vejčité až elipsoidní nebo mohou být i krátce cylindrické až téměř kulovité s hladkým povrchem. Velikost pyknospor je 4-7 x 3-4 µm. Na sklerociu fytopatogenní houby *Sclerotinia sclerotiorum* se tvoří pyknidy. Pyknidy se tvoří většinou na povrchu, někdy jsou vnořené do sklerocia. Tvar pyknid je kulovitý v průměru 150-700 µm. Barva pyknid je hnědá až černá.

## Historie

Campbell (1947) poprvé izoloval mykoparazitickou houbu *C. minitans* ze sklerocií fytopatogenní houby *S. sclerotiorum* v USA. Následně byla houba *C. minitans* izolována ze sklerocií v půdě ze všech kontinentů kromě Antarktidy (Bennett et al. 2006; Sandys-Winsch et al. 1993.; Whipps a Gerlagh 1992). Mnoho studií ukazuje velký potenciál použití tohoto mykoparazita jako bioagens v ochraně rostlin proti chorobám způsobených patogenem *S. sclerotiorum* (Yang et al. 2007, 2010). Mezi jednotlivými izoláty byly nalezeny nejen morfologické rozdíly, ale i odlišnosti v jejich biologické aktivitě, nicméně schopnost všech izolátů parazitovat sklerocia je klíčová vlastnost (Jones a Stewart 2000; Bohata et al. 2006). Některé izoláty byly charakterizovány i pomocí genetických metod jako je náhodná amplifikace polymorfni DNA – RAPD; jednoduchá repetitivní sekvence (SSR- Single Sequence Repeats, mikrosatelity) a rRNA genová sekvenace (Ridgway a Stewart 2000; Goldstein et al. 2000).

Verkley et al. (2004) překvalifikoval *C. minitans* na *Paraconiothyrium minitans* pomocí metody ITS a SSU nrDNA sekvencí. Nový název se neuchytil, neboť se dnes stále vyskytuje v bibliografických databázích starší název pro tuto houbu, tj. *Coniothyrium minitans*.

## Hyfové interakce

Povrch pyknozor hraje důležitou roli v časném rozpoznání infekce houbou *C. minitans* a přichycení na povrch hostitele. Pyknozory *C. minitans* jsou hydrofobní a obsahují lektin, který napomáhá k rozpoznání hostitele (Smith et al. 1999). Hyfové interakce mezi *C. minitans* a *S. sclerotiorum* lze sledovat v in vitro testech velmi snadno. V systémech in vivo se projevuje na infikovaných rostlinách kompetice mezi druhy, a zároveň je zaznamenán zjevný mykoparazitismus houby *C. minitans* na myceliu *S. sclerotiorum*. Mykoparazitický efekt byl zaznamenán i na interakci mycelia *C. minitans* se sklerociem houby *S. sclerotiorum* (Whipps et al. 2008). Do mycelia patogena produkuje mykoparazitická houba *C. minitans* lytické enzymy endo- a exo-  $\beta$ -1,3 glukanázu, chitinázu, a celulózu, které způsobují degradaci buněčné stěny hyfy hostitele (Kaur et al. 2005). V elektronovém mikroskopu lze zaznamenat, že interakce mezi hyfami *C. minitans* a *S. sclerotiorum* jsou nahodilé, nebyl zaznamenán žádný trofismus. Do hostitele proniká *C. minitans* pomocí penetračních hrotů, které se formují z vrcholové části hyfy a zároveň se formují i z postranních větví hyfy (Vrije et al. 2001). Po



penetraci *C. minitans* do hostitele, dochází ke granulaci jeho cytoplazmy a následně dochází ke kolapsu hyfy hostitele. Mykoparazit přijímá z rozpadlých hyf živiny a následně formuje pyknidy, z nichž se uvolňují pyknospory v mucilagenní hmotě (Bennett et al. 2006). Když jsou obě houby pěstovány společně na živné bramborové půdě, kolonie *C. minitans* zastavuje růst mycelia *S. sclerotiorum* a následně se rozrůstá do její kolonie. Napadené hyfy *S. sclerotiorum* jsou degradovány a v blízkosti se vyvíjejí pyknidy (Vrije et al. 2001).

Do sklerocií proniká mykoparazitická houba buď přímo pigmentovou vrstvou, nebo nepřímo v místě poškození sklerocia. Následně *C. minitans* proniká ve sklerociu i do nepigmentované kůry a dřene sklerocia. Na penetraci se podílí jak lytické enzymy, tak mechanický tlak penetračního hrotu. Po kolonizaci kůry i dřene houbou *C. minitans* dochází k úplné degradaci sklerocia. Svrchní pigmentová vrstva buněk sklerocia je odolnější vůči působení *C. minitans*, proto si degradované sklerocium zachovává tvar. Uvnitř takto degradovaného mycelia je masa pyknospor. Na povrchu infikovaných sklerocií se tvoří pyknidy, z kterých dochází k výronu pyknospor v mucilagenní hmotě (Bennett et al. 2006).

## Ekologie

Houba *C. minitans* je úzce specializovaný mykoparazit, který infikuje a degraduje sklerocia hub z oddělení Ascomycota, rodu *Sclerotinia*. *C. minitans* má schopnost parazitovat sklerocia fytopatogenních druhů hub *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, *S. minor* a *S. cepivorum*, není však schopna infikovat sklerocia hub náležejících do oddělení Basidiomycota (Chitrampalam et al. 2010; Whipps, Gerlagh 1992). Gerlagh et al. (1996) prokázal, že houba *C. minitans* je schopna infikovat i sklerocia houby *Botrytis cinerea*.

Přítomnost mykoparazita *C. minitans* v půdě je obvykle indikována izolací z infikovaných sklerocií (Winsch et al. 1993), nicméně houba byla izolována i přímo z půdy pomocí metody ředění (Whipps et al. 1993) a zároveň pomocí metody prekolonizace, kde se využívá jako návnada celoplošná kultura *S. sclerotiorum* na živné půdě (Sandys-Winsch et al. 1993). McQuilken a Whipps (1995) prokázali, že houba *C. minitans* je schopna přežít v půdě více než 1 rok po její aplikaci. McQuilken et al. (1995) zaznamenali, že houba *C. minitans* je schopna přežít v půdě infestované vysokým počtem sklerocií houby *S. sclerotiorum* po dobu více než dvou let. Infikovaná sklerocia slouží jako rezervoár pro přežívání houby *C. minitans* v půdě (Bennett et al. 2006) a zároveň infikované sklerocium sehrává důležitou ochrannou úlohu v dlouhodobém přežívání mykoparazita v půdě (Tribe 1957). Vitální pyknospory se do půdy uvolňují z degradovaných sklerocií a pomocí sekundárních kolonizátorů mohou být roznášena do okolí (Jones, Stewart 2000). Houba se

v půdě může šířit i růstem mycelia. Bennett et al. (2006) zdůrazňují schopnost *C. minitans* přežít v půdě bez hostitele tj. sklerocia, nicméně toto tvrzení není stále potvrzeno. Stále není objasněno zda pyknostry přežívají v půdě jednotlivě nebo v pyknidách popřípadě na povrchu organického materiálu (Whipps et al. 1991). Williams (1996) uvádí, že houba není schopna růst v neobdělané půdě a získávat živiny z organického substrátu v půdě, čímž je tento druh klasifikován jako obligátní mykoparazit (Yang et al. 2010). Teplota hraje velmi důležitou roli v přežívání houby *C. minitans* (Yang et al. 2010). Houba *C. minitans* je schopna přežít v půdě během zimy, kdy teplota půdy klesá daleko pod 0°C (Huang, Erickson 2002). V laboratorních podmínkách je životnost houby *C. minitans* kultivované na přirozeném substrátu delší v 5 a 15°C než ve 30°C (McQuilken, Whipps 1995). V suchých podmínkách většina konidií *C. minitans* vyloučených z pyknidy na povrchu sklerocia ztrácí životnost po 10 měsících (Bennett et al. 2006).

Houba *C. minitans* byla zjištěna v asociaci sklerocií fytopatogenní houby *S. sclerotiorum* formovaných na rostlině nebo uvnitř rostliny a zároveň produkovala houba *C. minitans* pyknidy na kořenech slunečnice, které byly napadeny *S. sclerotiorum*. Na rostlinách bylo prokázáno i to, že houba *C. minitans* neparazitovala jen sklerocia, ale byla zjištěna i tvorba pyknid přímo na mycelium patogena. Díky této parazitaci dochází k redukci tvorby sklerocií na nemocných rostlinách a zároveň účinnost *C. minitans* spočívá i v supresi tvorby apesorií ze sklerocií (Yang et al. 2010; Huang 1977). Yang et al. (2009) uvádí, že nejnižší koncentrace pyknostry pro efektivní supresi karpogenního klíčení *S. sclerotiorum* je  $1 \times 10^3$  v jednom gramu půdy. Houba *C. minitans* nevyvolává po aplikaci suspenze na zdravé rostliny žádné příznaky onemocnění (Turner, Tribe 1976) a dokonce nebyl zaznamenán růst houby na řízcích rostlin (Gerlagh et al. 1996). Houba *C. minitans* byla úspěšně použita pro regulaci životnosti sklerocií *S. sclerotiorum* v ochraně hlávkového salátu, celeru, slunečnice i řepky olejky (Luth 2001). Konidie *C. minitans* aplikované na nadzemní části rostlin řepky olejky zabránily vzniku infekce askosporami *S. sclerotiorum* tím, že na okvětních plácích mykoparazit omezil růst mycelia patogena. Když je na ošetřené listy houbou *C. minitans* naneseno mycelium *S. sclerotiorum*, nedochází k úplnému zabránění infekce listů hostitelské rostliny, ale dochází k redukci počtu sklerocií na ní (Li et al. 2006).

## 2.7. Houby rodu *Trichoderma*

Houby rodu *Trichoderma* jsou vláknité houby běžně se vyskytující v půdě polních i lesních ekosystémů. Ve fyloplánu se nachází v tlejícím dřevě. Nejčastěji se nachází v půdách mírného a tropického pásma. Houby rodu *Trichoderma* jsou antagonistické a mykoparazitické druhy napadající široké spektrum půdních původců onemocnění rostlin. V prostředí jsou schopny konkurovat patogenům jak osidlováním ekologické niky, tak i čerpáním živin z okolí. Současné výzkumy poukazují na jejich schopnost kolonizovat přímo povrch kořenové soustavy, a tím vytvářet avirulentní symbiotické vztahy s rostlinami. Houby rodu *Trichoderma* jsou významní saprotrofové. Patří mezi takzvané celulotické houby, které dokáží rozkládat celulózu. Jsou dobrými dekompozitory organické hmoty (sláma, posklizňové zbytky). Houby rodu *Trichoderma* se vyznačují rychlým růstem mycelia. Po aplikaci snadno kolonizují prostředí. Často jako první kolonizují sterilní substráty po ošetření fumigací nebo chemickou dezinfekcí. Z tohoto důvodu jsou zdatnými konkurenty o živiny dalším vyskytujícím se houbám (Harman et al. 2004).

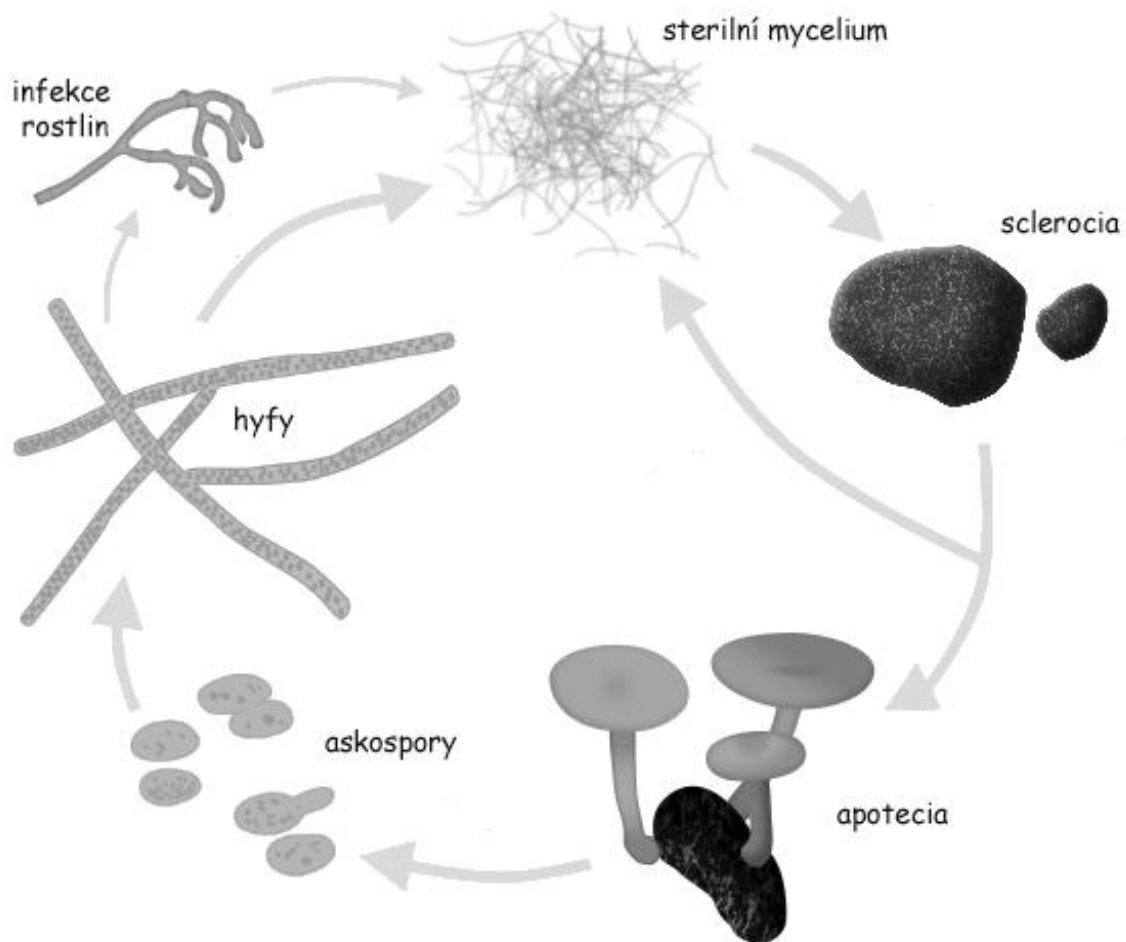
Jako mykoparaziti mají schopnost houby rodu *Trichoderma* růst směrem k hyfám fytopatogenních hub a následně je oplétat a vlivem enzymatické aktivity rozpouštět jejich buněčnou stěnu. Jako prostředek k hyfové interferenci využívají lektiny přítomné ve svých buněčných membránách. Tyto látky bílkovinné povahy obsahují na svém povrchu vazebná místa pro určité sacharidy. Obecně se tyto látky nazývají mitogeny (umožňují aktivaci dělení buněk). Po obsazení vazebných míst sacharidy dochází u fytopatogena k různým morfologickým a fyziologickým reakcím vedoucím k jeho smrti. Tento proces zahrnuje tvorbu apresorií, které pronikají houbovými vlákny do hostitele a vyvolávají tvorbu chitinázy,  $\beta$ -1,3 glukonázy, která rozrušuje chitinovou stěnu hostitelské houby. Získávání živin z parazitovaného hostitele dochází k dalšímu vlastnímu vývoji hub rodu *Trichoderma*. Některé kmeny této houby zastavují růst hostitele i tvorbou antibiotik. Ovšem největší zájem a celkové studie jsou zaměřeny na druh *Trichoderma harzianum* a *Trichoderma virens*.

Některé kmeny hub rodu *Trichoderma* kolonizují jen omezenou část kořenového systému a přežívají zde po omezenou dobu. Existují ale kmeny, které kolonizují celý povrch kořenů po mnoho týdnů nebo měsíců. Houby rodu *Trichoderma*, stejně jako další kořeny kolonizující mikroorganismy zlepšují růst a produktivitu rostliny. Často ovlivňují rostliny vylučováním regulačního hormonu, který může zpětně zvyšovat rychlost růstu nebo využitelnost přijatelných živin. Výzkum i praxe ukazují zlepšený vývoj kořenového systému rostliny. Tento efekt trvá po celý život rostliny a může být vyvolán již velmi malým

množstvím houby aplikované na osivo. Průměrné zvýšení výnosu v běžných agronomických postupech je přibližně 5%. Zvýšený výnos se stává markantní hlavně v nepříznivých či stresujících podmínkách. Lokální nebo systémová rezistence u rostlin se objevuje jako odpověď na napadení patogenními mikroorganismy, fyzikální poškození způsobené hmyzem nebo na přítomnost hlízkových bakterií na kořenech. K indukci rezistence u rostlin dochází ale také působením hub rodu *Trichoderma* na kořenech rostlin. Aplikace těchto hub do kořenového systému rostliny vede ke vzniku asociace kořen-mikroorganismus působící podstatné změny v celé rostlině a jejím metabolismu. Tyto změny pak vedou ke zlepšení růstu kořenů, dostupnosti a využití živin, zvýšení rezistence vůči abiotickým stresům a vůči patogenům (Nesrsta 2005; Kolombet et al. 2001; Okrouhlá 1993).

## 2.8. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary

Fytopatogenní houba *S. sclerotiorum* (Ascomycota: Helotiales) je vřeckovýtrusná houba, která tvoří na živné půdě PDA bílé, někdy světle šedé mycelium, které je přisedlé a vyrovnané, někdy je více chomáčkovitě. Sklerocia se vyvíjejí na povrchu mycelia, hlavně na okrajích Petriho misky v místech, kde mycelium naráží na okraje a hromadí se tam. Sklerocia jsou černá, kulovitá někdy podlouhlá až nepravidelná. V průměru vývoje jsou sklerocia variabilní, někdy mohou dosahovat délky až 1 cm. Povrch sklerocia je hladký nebo je kráterovitý. Buňky na špičce primárních hyf po dosažení okraje Petriho misky jsou tenkostěnné s hustým granulárním obsahem, obvykle 9-14 (-18)  $\mu\text{m}$  široké a dlouhé 300  $\mu\text{m}$ , obvykle s jednou postranní nebo více větvemi. Buňky před špičkou jsou kratší, 30-250  $\mu\text{m}$ . Buňky sekundárních a dalších větví jsou užší než větve vyrůstající z primární hyfy. Sklerocium se začíná vyvíjet opakovaným větvením vzdušných primárních hyf, které navzájem splývají. Zralé sklerocium má zřetelně diferenciovanou pokožku s rovnoměrně ztloustlou silně pigmentovou stěnou.



Pod pokožkou je tenká vrstva kůry složená z 2-3 vrstev stejně dimetrických tenkostěnných buněk. Dřeň sklerocia je tvořena propletenými hyfami přibližně stejného průměru jako jsou primární hyfy. Buňky kůry a dřene mají granulózní obsah zatímco buňky pokožky ne. Na hostiteli se tvoří bílé mycelium, které se rozrůstá po povrchu a větví se intercelulárně i intracelulárně. Sklerocia se vyvíjejí na povrchu vně i uvnitř hostitele. Sklerocia se tvoří ve velké míře, až když dojde k usmrcení hostitelské rostliny. Po dozrání jsou sklerocia v dormantním stavu. Z tohoto důvodu není možné zaznamenat tvorbu apotecii ve spojitosti s nemocnou rostlinou (Anonym X - Mycobank).

#### Charakteristika patogena

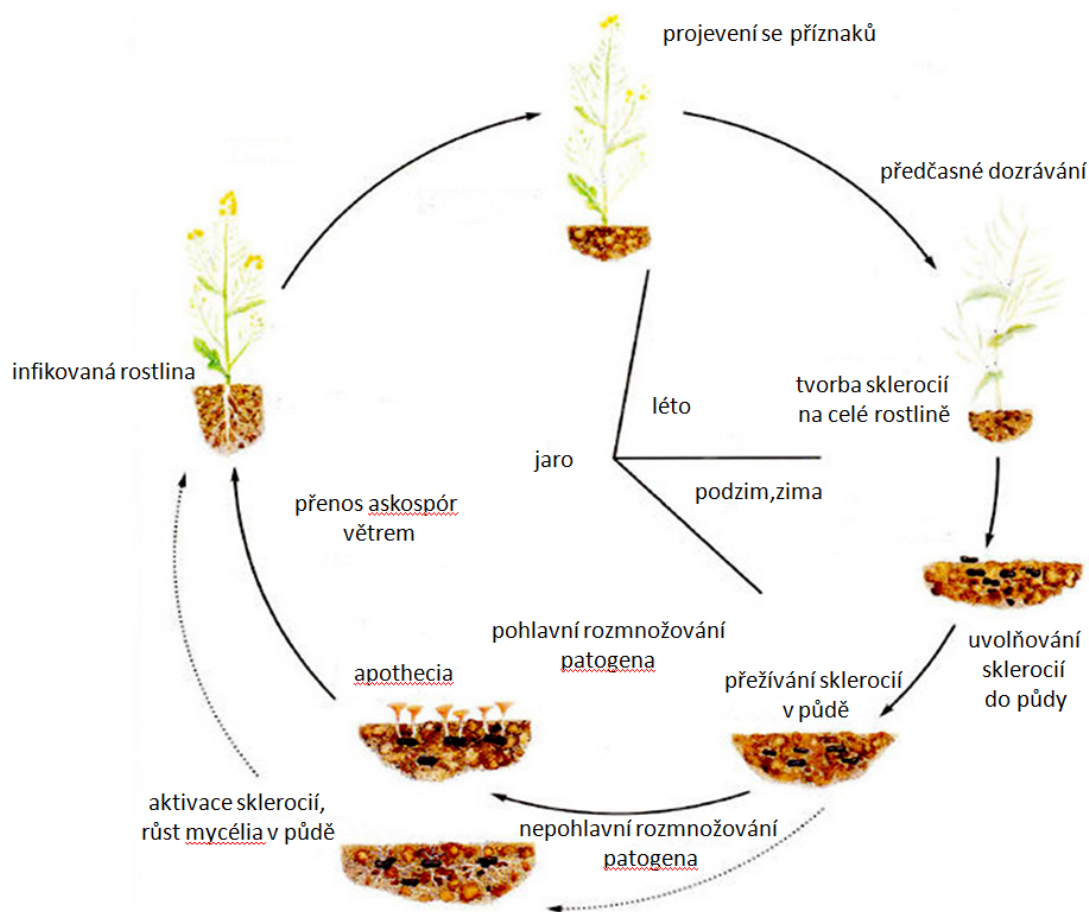
*S. sclerotiorum* je polyfágní patogen a napadá všechny druhy rostlin s výjimkou rostlin čeledi Poaceae. K významným hostitelským rostlinám patří řepka, slunečnice, hořčice, mák, hrách, luskoviny, zelenina (především brukvovitá a listová zelenina) a různé druhy plevelů. Při silném napadení může dojít k redukci výnosu až o 40-60%. Vzhledem k nedodržívání

osevních postupů a rozšiřování ploch pěstování řepky ozimé se zvyšuje riziko této houby jako původce ekonomicky významného onemocnění (Kazda et al. 2010; Rod et al. 2005; Purdy 1979). Na jetelovinách vyvolává podobné příznaky *Sclerotinia trifolium*. Celkově je patogen schopen přežívat v půdě více než 5 let. Zdrojem infekce jsou sklerocia v půdě, špatně zapravené infikované posklizňové zbytky a zdrojem infekce může být i osivo s příměsí sklerocií (Vašák et al. 1997).

Ze sklerocia se regeneruje mycelium, které může následně infikovat zdravé rostliny. Na jaře nebo v časném létě se začínou na sklerociích tvořit plodnice apotecia (tzv. karpogenické klíčení), která jsou velká od 5 do 15 mm. V apotecích jsou uložena vřčka s askosporami. Po dozrání jsou askospory vymrštěny z apotecia do vzduchu v periodě od dvou do tří týdnů. Askospory jsou roznášeny větrem. V případě, že askospory dopadnou na živný substrát, u řepky opadané okvětní lístky, askospory začnou klíčit a dojde k infekci rostliny. Většina druhů hub rodu *Sclerotinia* způsobují infekci tvorbou mycelia ze sklerocií. Regenerované mycelium napadá stonky mladých rostlin. U *S. sclerotiorum* je však infekce primárně iniciována askosporami a je hlavním zdrojem infekce (Boland a Hall, 1994; Korf and Dumont, 1972).

#### Příznaky napadení houbou u řepky

První příznaky se objevují v období kvetení a těsně po odkvětu rostlin řepky. U řepky jsou první známkou infekce napadení protáhlé, vodnaté skvrny na hlavním stonku, které rychle šednou, často mívají stříbřitý nádech a dochází k trhání pokožky rostliny. V místě napadení je často uvnitř stonku a větví bílé vatovité mycelium, ve kterém se následně tvoří sklerocia. Rozvoj choroby závisí na vnějších podmínkách, zejména na vlhkosti a teplotě. Silně napadené stonky se lámou. Pokud jsou napadeny šešule, žloutnou a zasychají. Patogen *S. sclerotiorum* způsobuje nouzové dozrávání řepky. Rovněž i do vnitřku šešulí může prorůst mycelium a tvořit uvnitř sklerocia. Všeobecným primárním znakem napadení je změknutí a zvodnatění pletiva, následné porůstání myceliem houby a hniloba napadených částí vedoucí k odumření celé rostliny. Pozor musí být dán i při používání fungicidních přípravků, které sice mohou zabránit infekci askosporami, avšak vzhledem k obtížnosti při proniknutí postřiku krytem rostlin, se může choroba opět projevit. Na konci vegetace jsou vytvořena sklerocia uvnitř nebo na povrchu infikovaných rostlin. Při sklizni se sklerocia z napadených rostlin uvolňují a dopadají na zem. Důležité je důkladné zapravení posklizňových zbytků do půdy, aby byla sklerocia zapravena do hloubky, kde mohou být díky mikrobiální aktivitě půdy degradována (Kazda et al. 2010; Rod et al. 2005; Boland, 1997).



Pro pěstování rostlin ve sklenících je důležité použít propařenou zeminu, kdy propařením dochází k usmrcení sklerocií resp. mycelia všech půdních patogenů. Citlivé druhy plodin by se neměly pěstovat na přemokřené půdě. V případě pěstování je důležitá i regulace plevelů ve sklenících. Životoschopná sklerocia přežívají v zemi po dobu i více než 5 let, proto musíme počítat, že každá rostlina může být patogenem napadena. Po zjištění infekce by se na poli neměly pěstovat citlivé plodiny. Správnou ochranou se dá chorobám způsobených houbami rodu *Sclerotinia* předejít.

## 2.9. Biopreparáty na bázi mykoparazitických hub registrovaných v ČR

### Contans<sup>®</sup> WG

Biopreparát Contans<sup>®</sup> WG je postřikový fungicidní biopreparát ve formě dispergovatelného granulátu k ochraně řepky olejky, hořčice bílé, slunečnice, zeleniny, okrasných rostlin, tabáku, luskovin, aromatických a léčivých rostlin a čekanky proti hlížečce obecné (*Sclerotinia sclerotiorum*) a hlízence menší (*Sclerotinia minor*).

Účinný mikroorganismus je mykoparazitická houba *Coniothyrium minitans*. Ve 100g biopreparátu je inkorporován kmen CON/M/91-08, kdy v jednom kg přípravku je deklarováno  $1 \times 10^9$  spor CFU.g<sup>-1</sup> přípravku.

Spory houby *Coniothyrium minitans* po aplikaci a zapravení v půdě infikují a parazitují na přítomných sklerociích hub *Sclerotinia spp.* a poměrně rychle je rozkládají. K parazitaci dochází ve vrchní provzdušněné vrstvě půdy cca do 10 cm při teplotách od 1°C. Při zamrznutí půdy *C. minitans* pozastavuje svůj růst, ale nedochází k odumření. Po zvýšení teploty začíná houba opět parazitovat sklerocia, a proto je možné použití přípravku jak na podzim, tak i v jarních měsících. Podmínkou účinnosti přípravku je jeho promísení s půdou a zapravení do hloubky cca 5–10 cm bezprostředně po aplikaci. Podrobnější informace jsou uvedeny v etiketě, která je součástí bakalářské práce k části Přílohy.

#### Supresivit®

Biologický fungicidní přípravek ve formě lehce dispergovatelného práku, k aplikaci zapravením nebo závlivkou výsevních, množenských i pěstebních substrátů před výsevem nebo na počátku vegetace a k moření a inkrustaci osiva proti komplexu půdních patogenů způsobujících padání a choroby mladých rostlin.

Účinný mikroorganismus je mykoparazitická houba *Trichoderma harzianum*. Vzdušné konidie patentovaného kmene houby *Trichoderma harzianum* Rifai aggr. (Patent č.: 281537) jsou inkorporovány v inertním plnidle. Biopreparát obsahuje minimálně  $1,4 \times 10^{10}$  spór.g<sup>-1</sup>, a výrobce uvádí, že klíčivost spor musí být minimálně 70 %.

Konidie mykoparazitické houby *Trichoderma harzianum* obsažené v přípravku za vhodných podmínek v půdě vyklíčí a rostoucí mycelium kolonizuje povrch kořenů rostliny. Mycelium zůstává aktivní na kořenovém systému rostliny po celou dobu vegetace. Svou schopností aktivní parazitace fytopatogenů zabraňuje jejich rozvoji, dočasně váže nadbytečné rozpustné živiny z půdy a stimuluje růst rostliny. Výsledkem tohoto komplexního působení je zdravá rostlina odolná vůči stresům. Vybraný kmen neovlivňuje rozvoj symbiotických bakterií a mykorrhizních hub. Podrobnější informace jsou uvedeny v etiketě, která je součástí bakalářské práce k části Přílohy.




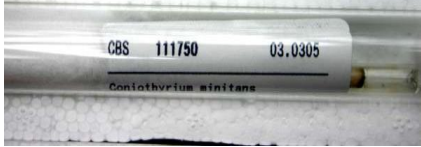


### 3. Materiál a metodika

#### 3.1. Mykoparazitická houba *Coniothyrium minitans*

Kmen z biopreparátu Contans® WG

V pokusech byl výhradně používán kmen CON/M/91-08, který je registrován jako účinná složka komerčního biopreparátu Contans® WG (10% biomasy pykno spor *C. minitans*;  $1 \times 10^9$  CFU.g<sup>-1</sup> přípravku a 90% inertních přísad). Biopreparát obsahuje  $1 \times 10^{12}$  vitálních spor v 1 kg. Přípravek je vyráběn německou firmou PROPHYTA BIOLOGISHER PFLANZENSCHUTZ GMBH. Matečná kultura kmene CON/M/91-08 (dále jen Con) byla získána reizolací kmene z biopreparátu dodaného firmou Agrovita, spol. s r.o..

Další kmeny *C. minitans* použité v pokusech

F-540	Kmen CCM F-540 získaný z české sbírky mikroorganismů (CCM)	
HOLANSKO	Kmen CBS 111750 získaný z holandské sbírky Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)	
PĚNČÍN	Kmen odizolovaný z půdy pomocí metody prekolonizace (Precolonization plate technice) za využití fytopatogenní houby <i>S. sclerotiorum</i>	
1A – 3B	Kmeny odizolované z kořenů mrkve získaných z obchodní sféry, izolace kmenů pomocí prekolonizace (Precolonization plate technice) za využití fytopatogenní houby <i>S. sclerotiorum</i>	

Precolonization plate technice – metoda založena na principu parazitace mycelia hostitele, tj. *S. sclerotiorum*, kdy se analyzovaný vzorek půdy nanese na povrch mycelia *S.*

*sclerotiorum*. Pokud je vzorek půdy pozitivní na výskyt mykoparazitické houby *C. minitans*, po 14 dnech dojde k vizuální parazitaci mycelia hostitele. Obdobný pokus je realizován na kořeni mrkve, kdy se mrkev naočkuje fytopatogenní houbou *S. sclerotiorum*, pokud je mykoparazitická houba *C. minitans* přítomna na zbytcích půdy uchycených na kořenech mrkve, dojde k parazitaci mycelia hostitele. Kmeny se odizolují a po přečištění se kmeny uloží do sbírky.

### 3.2. Fytopatogenní houba *Sclerotinia sclerotiorum*

V pokusech byl použit kmen fytopatogenní houby *S. sclerotiorum*, který byl odizolován z infikovaných rostlin řepky ozimé na poli v lokalitě Lomnice nad Lužnicí. Získaná sklerocia se povrchově sterilovala a položila na povrch zarizovaného 2% vodního agaru. Po oživení sklerocia bylo mycelium patogena převedeno pomocí kličky na živnou půdu PDA. Získaný izolát *S. sclerotiorum* byl následně udržován přenosem mycelia vždy na čerstvou živnou půdu PDA. Kmen tvoří sklerocia na okrajích Petriho misky.

### 3.3. Standardní umělé živné půdy

Zkratka	Úplný název živné půdy	Složení živné půdy (g .1 <sup>-1</sup> litru vody)
PDA	Potato Dextrose Agar	bramborová infuze 200 g; dextróza 20 g; agar 15 g
SDA	Sabouraud Dextrose Agar	dextróza 40 g; pepton 10 g; agar 15 g
SLA	Agar se sladinkovým extraktem	sladinový extrakt
YMA	Yeast Extract Agar	kvasničný extrakt 3g; sladinkový extrakt 3g; pepton 5g; dextróza 10g; agar 20g
CMA	Corn Meal Agar	obilná infuze 50 g; agar 15 g
V8J	V 8 Juice Agar	V 8 juice 8,3 g; L-asparagin 10 g; kvasničný extrakt 2 g; CaCO <sub>3</sub> 2 g; glukóza 2 g; agar 20 g
TSA	Tryptic Soy Agar	tryptický hydrolyzát kaseinu 15 g; sójový pepton 5 g; NaCl 5 g; agar 15 g

### 3.4. Kultivace matečných kultur

Kmeny mykoparazitické houby *C. minitans* byly kultivovány na povrchu agarizované živné půdy PDA (Potato Dextrose Agar) formou separačních čar. Masa pykno spor byla přenesena roztěrem (3 čáry na 1 misce) na plotnu PDA pomocí sterilní inokulační kličky. *S. sclerotiorum* byla na střed agarových ploten inokulována přenosem výřezu agarového bločku o průměru 10 mm z matečné kultury. Kultivace kmenů *C. minitans* a *S. sclerotiorum* probíhaly za stejných podmínek ( $20\pm 1^\circ\text{C}$ , fotoperioda 0/24). Fytopatogenní houba *S. sclerotiorum* byla inkubována pouze po dobu 4-5 dní, zatímco mykoarazitická houba *C. minitans* byla inkubována po dobu 10 – 14 dní. Plně porostlá kultura *S. sclerotiorum* byla následně použita pro párové pokusy. Z kultury byly korkovrtem o průměru 10 mm vyříznuty bločky, které se následně přenášely na experimentální PDA plotny.

### 3.5. Příprava pykno sporových suspenzí

Pykno sporové suspenze mykoparazitické houby *C. minitans* byly získávány smytím plně vysportované kultury sterilním roztokem 0,05% Tween<sup>®</sup> 80. Získaná suspenze každého kmene byla filtrována přes sterilní gázu a v suspenzi byla pomocí počítací komůrky (Neubauer Improved Chamber, Fisher) stanovena koncentrace pykno spor. Pro pokusy byla základní suspenze pykno spor následně adjustována ředěním (sterilní 0,05% Tween<sup>®</sup> 80) na titer  $1,00 \times 10^6$  v 1 ml. Konečná koncentrace spor v adjustovaných suspenzích byla opětovně ověřována odpočtem partikulí pomocí počítací komůrky.

### 3.6. „In vitro“ laboratorní testy

#### Radiální růst

Radiální růst středových kultur slouží k parametrickému hodnocení. Na umělých živných půdách, kde jsou rovnoměrně rozloženy živiny, vytváří mykoparazitická houba *C. minitans* pravidelné kruhové kultury. Cílem testu bylo vedle morfologických rozdílů u jednotlivých kmenů zaznamenat i velikosti středových kultur kultivovaných po dobu 14 dnů na standardní živné půdě při teplotě  $20\pm 1^\circ\text{C}$ . Rozměr kultury byl stanoven měřením dvou na sebe kolmých průměrů, z nichž byla spočítána celková plocha kultury. Plocha kultury následně sloužila pro přepočtení množství pykno spor vyprodukovaných na  $\text{mm}^2$  při hodnocení produkce.

## Produkce spor na umělé živné půdě

Pro porovnání produkce pykno spor byly využity standardní umělé živné půdy (PDA, SDA, CMA, SLA, V8J, TSA, YMA), které se liší poměrem jednotlivých živin potřebných pro růst houby. Složení půdy má výrazný vliv na velikost, vzhled a výtěžnost spor ze středové kultury. Množství spor bylo zjišťováno po důkladné homogenizaci středové kultury v roztoku smáčedla. Po homogenizaci byla získaná suspenze spor, jejíž koncentrace se stanovila pomocí Neubauerovy počítací komůrky. V komůrce byla spočítána koncentrace pykno spor v 1 ml suspenze, která byla následně přepočítána na celý obsah získaného homogenizátu. Po stanovení výtěžnosti pykno spor z celé kultury byla produkce přepočtena na množství pykno spor na 1mm<sup>2</sup> plochy.

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

Interakční test na PDA plotnách byl použit ve studii zaměřené na ověřování supresivních schopností *C. minitans* vůči *S. sclerotiorum*. Model kurativní aplikace byl simulován párovým testem, při kterém byla pykno sporová suspenze jednotlivých kmenů *C. minitans* aplikována ve formě kapky pomocí laboratorní kličky (10 µl) na okraj Petriho misky s předstihem 3 dnů před umístěním patogena *S. sclerotiorum*. Po 3 dnech byl na protilehlý okraj Petriho misky inokulované kmenem *C. minitans* umístěn bloček houby *S. sclerotiorum* (průměr 10 mm) vyříznutý z 5 denní kultury. Kontrolní verzi pro oba modely představovala varianta, ve které byl jak patogen, tak jednotlivé kmeny *C. minitans* inokulovány zvlášť na okraj Petriho misky. Petriho misky byly vloženy v plastických sáčcích do termostatu (20±1°C) a inkubovány. Hodnocení interakcí bylo provedeno 7. den po dodání patogena *S. sclerotiorum* na PDA pomocí fotodokumentace resp. 10 den od inokulace pykno sporové suspenze kmenů *C. minitans*. V každé variantě byla spočítána vytvořená sklerocia, která byla následně zvážena. Dále byla stanovena i výtěžnost pykno spor houby *C. minitans*.

### 3.8. Statistika

Průměr dat radiálního růstu, produkce pykno spor, počtu sklerocií je zahrnut v tabulkách jako průměr±SEM. Pro následné statistické hodnocení byl použit program Statistica™ version 8 (StatSoft Czech Republic s.r.o.). Základem pro vyhodnocení dat byla jednofaktorová analýza rozptylu („Analysis of Variance“, ANOVA). Průkaznost diferencí mezi jednotlivými hodnotami různých úrovní byla testována prostřednictvím „Post-hoc comparasion“ (Tukey HSD test, p≤0,05)

## 1. Experimentální část a výsledky

### **Pokus 1: Vliv živné půdy na růstové a produkční parametry mykoparazitické houby *C. minitans* kmene Con získaného izolací z komerčního biopreparátu Contans WG**

#### **Postup:**

- Suspense pykno spor adjustovaná na titer  $1 \times 10^6$  v 1 ml
- Nanese ní suspence pykno spor pomocí sterilní laboratorní kličky na střed Petriho misky vybraných živných půd
- Inkubace kmene v termostatu  $20 \pm 1^\circ\text{C}$
- Měření radiálního růstu a stanovení produkce pykno spor po 14 dnech

Tabulka 1. Porovnání radiálního růstu a produkce pykno spor *C. minitans* kmen z biopreparátu Contans při kultivaci na umělých živných půdách

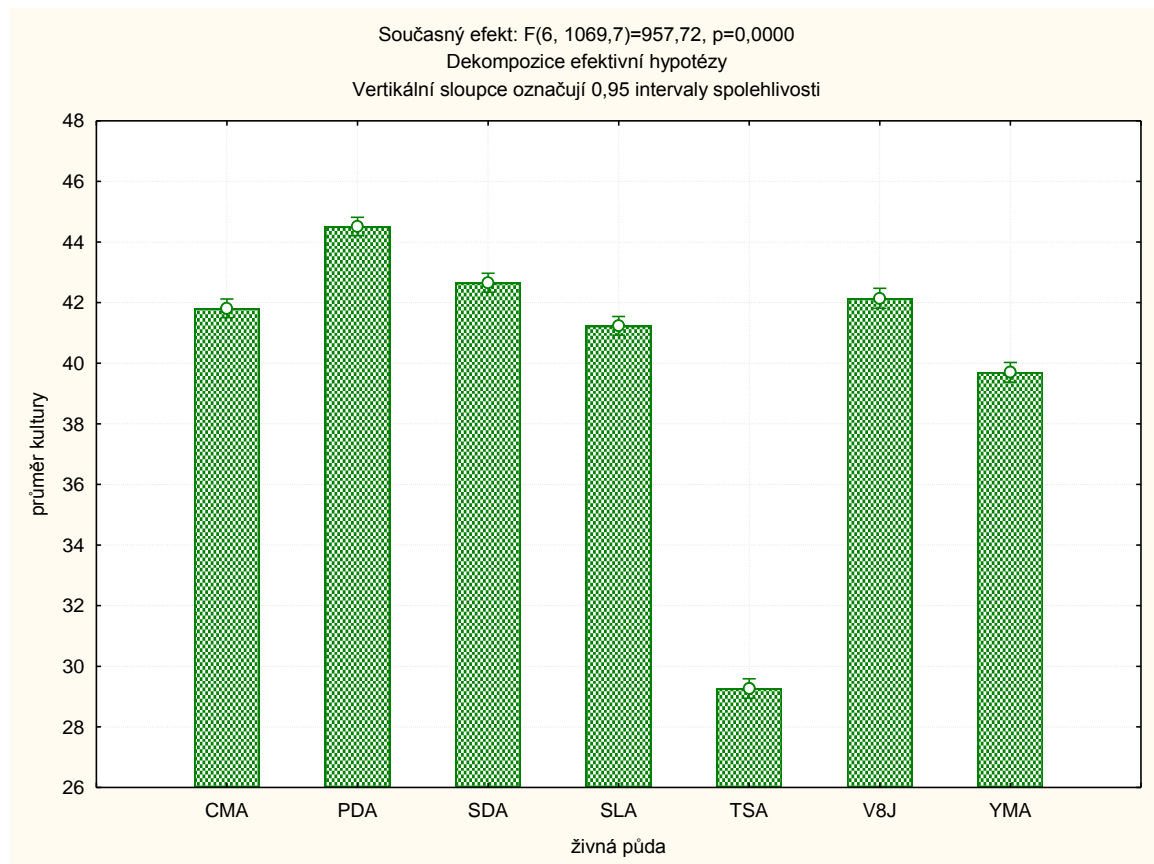
živná půda	parametr kultury		produkce spor			
	průměr (mm)		plocha ( $\text{mm}^2$ )	1 kultura		$\text{mm}^2$
CMA	41,81±0,25	bc	1372,93	1,53±0,04E+08	e	1,12E+05
PDA	44,50±0,27	a	1555,28	2,63±0,16E+08	d	1,69E+05
SDA	42,63±0,68	ab	1427,32	1,31±0,15E+08	e	9,20E+04
SLA	41,25±0,42	bc	1336,40	7,31±0,13E+08	a	5,47E+05
V8J	42,00±0,95	bc	1385,44	3,56±0,16E+08	c	2,57E+05
TSA	29,25±0,27	d	671,96	3,25±0,23E+07	f	4,84E+04
YMA	39,75±0,47	c	1240,98	5,25±0,14E+08	b	4,23E+05

\*a, b, c... průměry ve sloupci se stejným znaménkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda  $\alpha=0,05$ ; Tukey HSD test)

## Zhodnocení pokusu:

Po 14 dnech byla hodnocena produkce pykno spor mykoparazitické houby *C. minitans* kmene Con na vybraných standardních živných půdách. Umělá živná půda měla výrazný vliv nejen na radiální růst kultury *C. minitans* kmene Con ( $F=89,60$ ;  $df=6;105$ ;  $p<0,0000$ ), ale i na produkci pykno spor houby ( $F=378,75$ ;  $df=6;63$ ;  $p<0,0000$ ). Rychlejší růst prokázal kmen Con na umělé živné půdě PDA (průměr kultury 44,50 mm) a nejpomalejší růst byl zaznamenán na živné půdě TSA (29,25 mm). Na živných půdách CMA, SDA, SLA a V8J byl růst kmene vyrovnanější. Průměr kultury kmene dosahoval na těchto živných půdách od 41,25 do 42,63 mm. Největší množství pykno spor na jednu kulturu bylo vyprodukováno na umělé živné půdě SLA ( $7,31 \times 10^8$ ) a YMA ( $5,25 \times 10^8$ ). Nejnižší produkce pykno spor byla zaznamenána opět na TSA, kde houba *C. minitans* vyprodukovala pouze  $3,25 \times 10^7$  pykno spor z jedné kultury.

Graf 1. Radiální růst *C. minitans* kmen Con z biopreparátu Contans® na umělých živných půdách

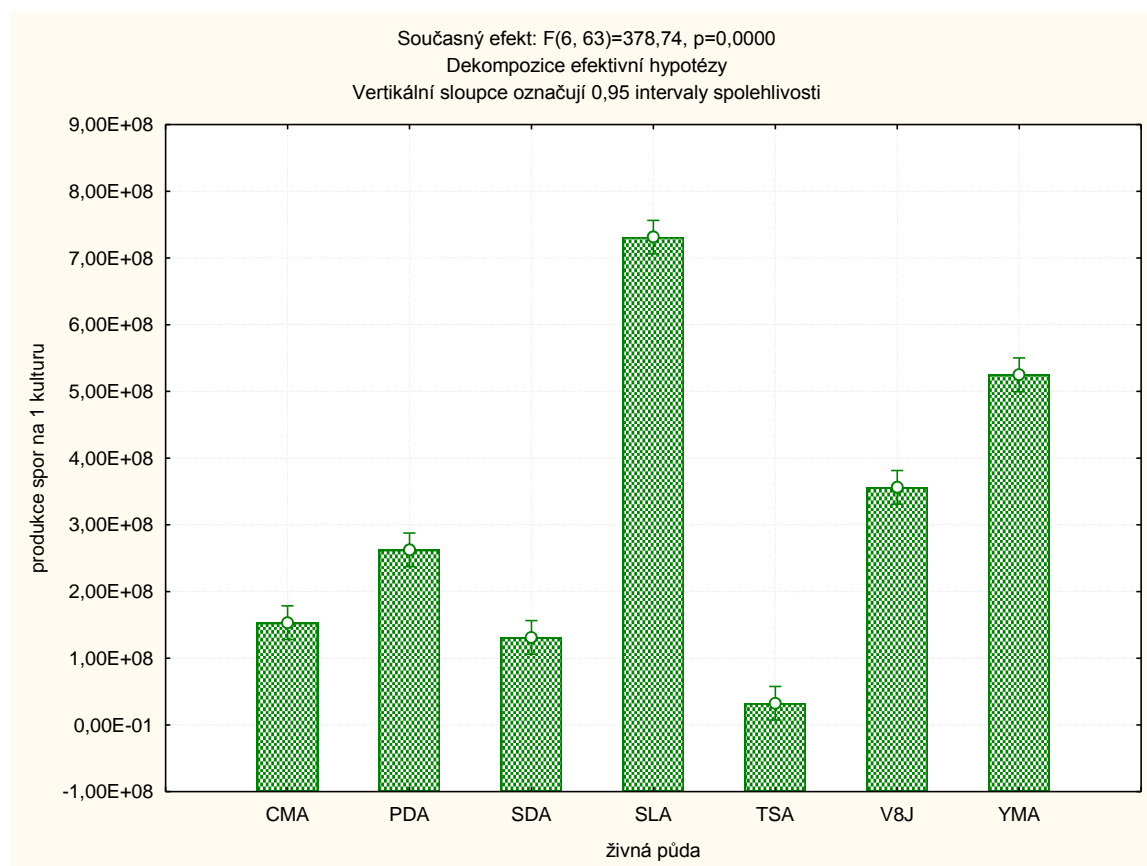


Tabulka 2. Statistická analýza studie radiálního růstu a produkce pykno spor kmene izolovaného z biopreparátu Contans na vybraných umělých živných půdách

	průměr kultury (mm)			produkce spor na 1 kulturu		
	MS	df	F	MS	df	F
intercept	180723,2	1	40102,37***	1	6,864613E+18	4315,192***
živná půda	403,8	6	89,60***	6	6,025074E+17	378,745***
chyba	4,5	105		63	1,590801E+15	

Pozn.: hladina významnosti  $\alpha$ : \*=0,05; \*\*=0,01; \*\*\*=0,001

Graf 2. Produkce pykno spor *C. minitans* kmen Con na umělých živných půdách



**Pokus 2.: Vliv přirozeného substrátu na produkci pykno spor mykoparazitické houby *C. minitans* kmene Con získaného izolací z komerčního biopreparátu Contans WG**

**Postup:**

- Suspense pykno spor adjustovaná na titr  $1 \times 10^6$  v 1 ml
- 25g sterilních ječných krup
- Inokulace sterilních krup adjustovanou suspenzí pykno spor
- důkladné protřepání inokulovaných krup
- Inkubace kmene v termostatu  $25 \pm 1^\circ\text{C}$
- Stanovení produkce pykno spor po 14 dnech

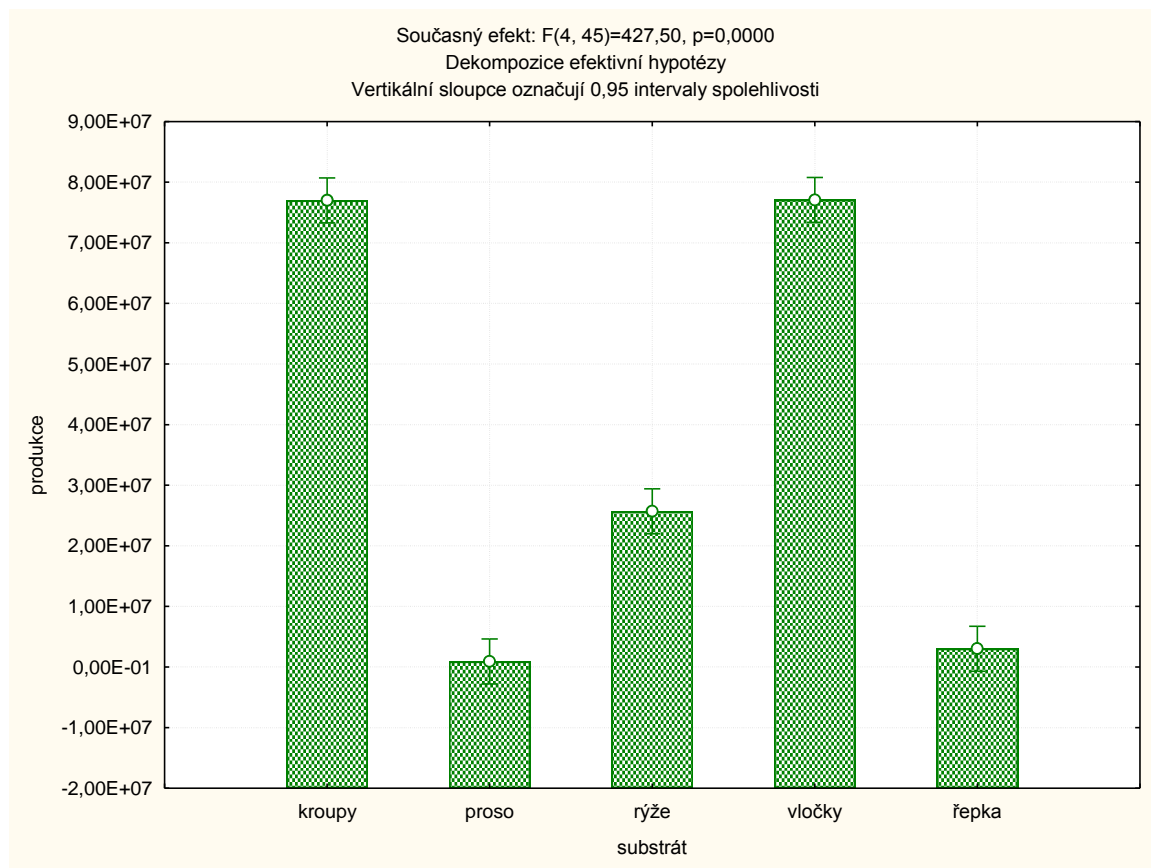
Tabulka 3. Produkce pykno spor *C. minitans* na vybraných přirozených substrátech (kmen Con, inkubace 14 dní)

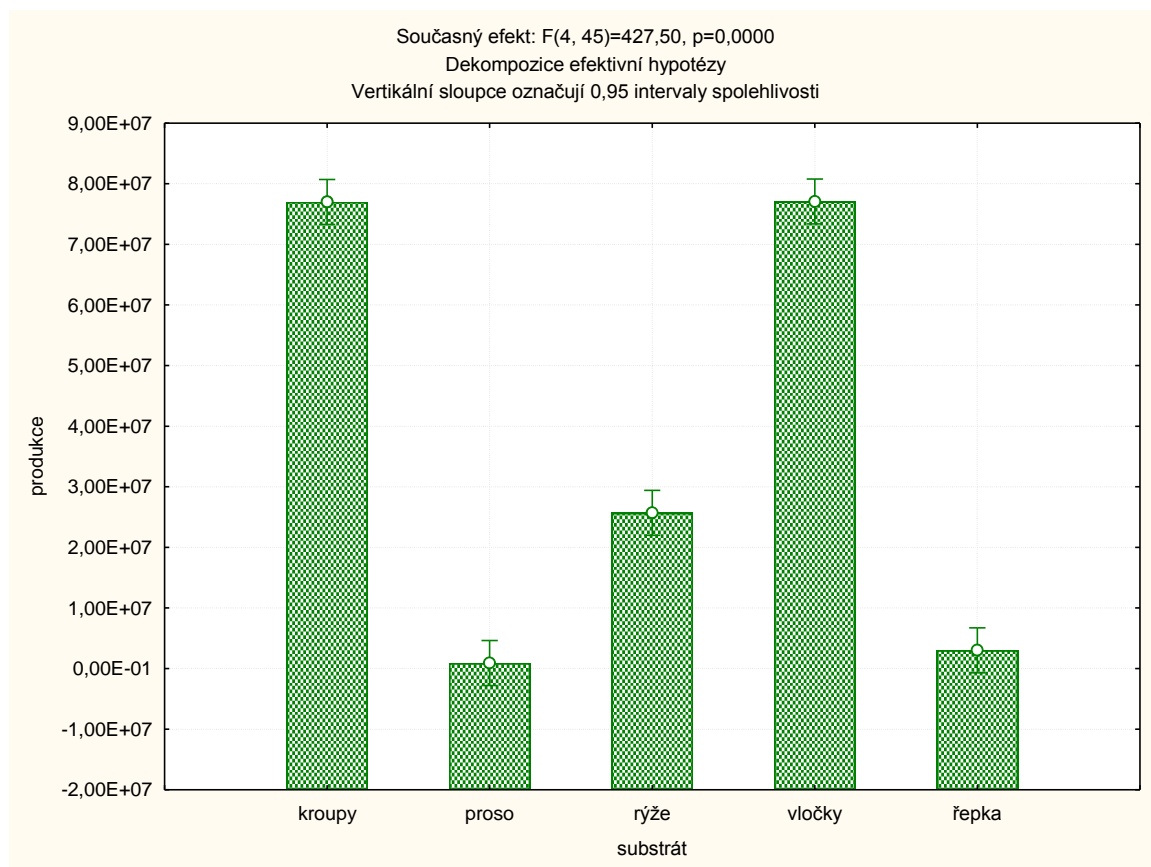
Substrát	Produkce spor z 1 g	
kroupy	$7,70 \pm 0,260\text{E}+07$	a
proso	$9,25 \pm 0,134\text{E}+05$	c
rýže	$2,57 \pm 0,015\text{E}+07$	b
vločky	$7,71 \pm 0,318\text{E}+07$	a
řepka	$3,02 \pm 0,039\text{E}+06$	c

\*a, b, c... průměry ve sloupci se stejným znaménkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda  $\alpha=0,05$ ; Tukey HSD test)



Graf 3. Produkce pykno spor *C. minitans* kmen Contans® na vybraných přirozených substrátech





Tabulka 4. Statistická analýza studie produkce pyknospor na vybraných přirozených substrátech

Produktce pyknospor			
	df	MS	F
Intercept	1	6,751220E+16	1993,849***
substrát	4	1,447522E+16	427,499***
chyba	45	3,386024E+13	

Pozn.: hladina významnosti  $\alpha$ : \*=0,05; \*\*=0,01; \*\*\*=0,001

### Zhodnocení pokusu:

Po 10 dnech byla hodnocena produkce pyknospor mykoparazitické houby *C. minitans* kmene Con na různých přirozených substrátech. Ze studie je patrné, že druh přirozeného substrátu měl vliv na množství vyprodukovaných pyknospor *C. minitans* ( $F=427,50$ ;  $df=4;45$ ;

$p < 0,0000$ ). Největší množství pykno spor bylo vyprodukováno na ovesných vločkách ( $7,71 \times 10^7$ ) a na kroupách ( $7,70 \times 10^7$ ). Naopak nejnižší produkce byla zaznamenána na prosu, kde houba *C. minitans* vyprodukovala pouze  $9,25 \times 10^5$  pykno spor.

### **Pokus 3.: Polyfaktoriální charakteristika vybraných kmenů mykoparazitické houby *C. minitans***

#### **Postup:**

- Suspense pykno spor adjustovaná na titer  $1 \times 10^6$  v 1 ml
- Nanesení suspense pykno spor pomocí sterilní laboratorní kličky na okraj Petriho misky s živnou půdou PDA
- Vyříznutý bloček fytopatogenní houby *S. sclerotiorum* je umístěn na protilehlý okraj Petriho misky s živnou půdou PDA tři dny po inokulaci petriho misky suspenzí pykno spor *C. minitans*
- Měření radiálního růstu kultury *C. minitans* v interakci s houbou *S. sclerotiorum* a produkce pykno spor a sklerocií proběhlo po 10 den od umístění bločku fytopatogenní houby na živnou půdu PDA

Tabulka 5. Porovnání radiálního růstu, produkce pykno spor a účinnosti kmenů *C. minitans* na produkci sklerocií fytopatogenní houby *S. sclerotiorum* (10 dní po dodání *S. sclerotiorum* na PDA)

kmen	parametr kultury		průměrná produkce		
	průměr (mm)	plocha (mm <sup>2</sup> )	spor na 1 kulturu		sklerocií
<i>S. sclerotiorum</i>	90,00	6361,72	-	-	24,50±0,50
Contans	27,75	604,81	2,40±0,100E+08	c	15,00±1,00
1A	30,25	718,69	2,41±0,488E+08	c	12,50±0,50
1B	34,25	921,32	5,16±0,863E+08	a	15,50±0,50
2A	29,00	660,52	3,88±0,025E+08	abc	12,00±1,00
2B	30,75	742,64	3,35±0,600E+08	abc	15,50±1,50

3A	29,50	683,49	4,85±0,400E+08	ab	12,00±2,00
3B	29,50	683,49	2,70±0,525E+08	bc	8,50±0,50
Pěňčín	29,00	660,52	4,04±0,088E+08	abc	13,50±0,50
F-540	36,00	1017,88	5,03±0,175E+08	ab	13,00±0,00
Holandsko	43,00	1452,20	3,65±0,250E+08	abc	9,50±0,50

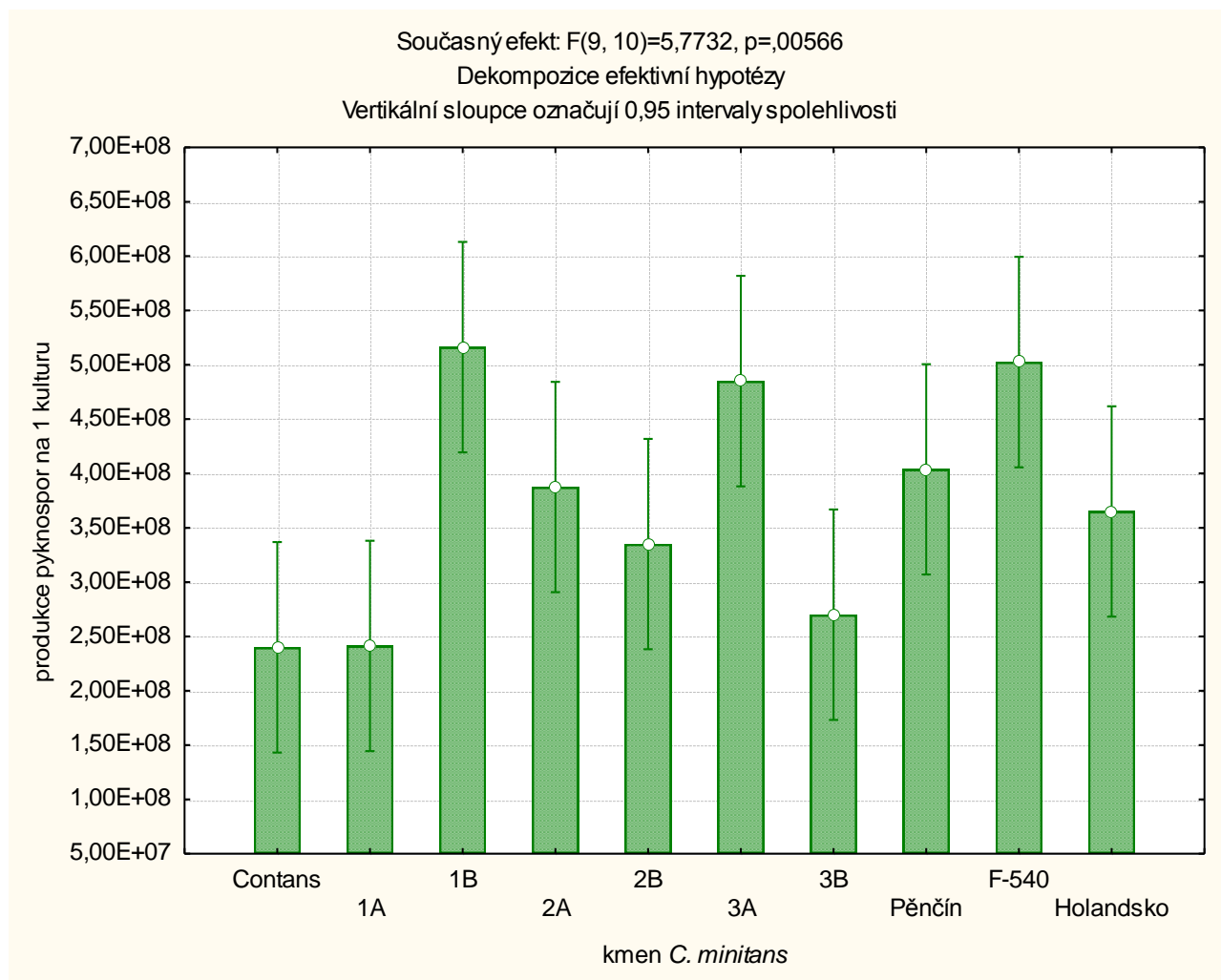
\*a, b, c... průměry ve sloupci se stejným znaménkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda  $\alpha=0,05$ ; Tukey HSD test)

Tabulka 6. Statistická analýza studie radiálního růstu, produkce pykno spor *C. minitans* a jejich účinnosti na fytopatogenní houbu *S. sclerotiorum*

	produkce spor na 1 kulturu			produkce sklerocií		
	MS	df	F	MS	df	F
intercept	1	2,806878E+18	743,1132***	1	4173,136	2354,077***
živná půda	9	2,180628E+16	5,7732**	10	35,436	19,990***
chyba	10	3,777188E+15		11	1,773	

Pozn.: hladina významnosti  $\alpha$ : \*=0,05; \*\*=0,01; \*\*\*=0,001

Graf 4. Produkce pykno spor jednotlivých kmenů *C. minitans* na umělé živné půdě PDA

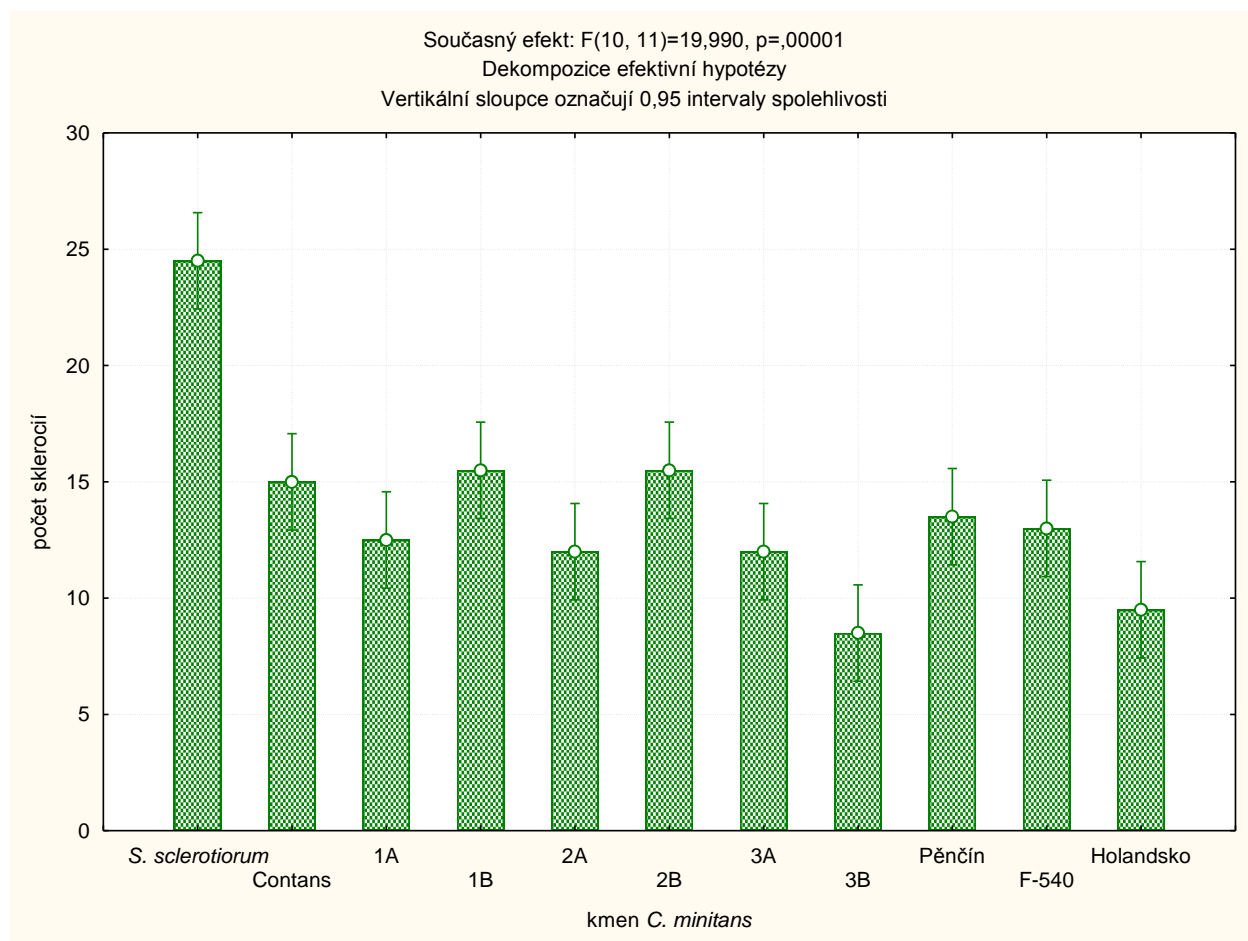


### Zhodnocení pokusu:

Po 10 dnech od dodání bločku *S. sclerotinia* na PDA byla hodnocena produkce pyknospor, radiální růst a superese tvorby sklerocií pomocí mykoparazitické houby *C. minitans* vybraných kmenů. Ze studie je patrné, že byl zaznaenán statisticky průkazný rozdíl v produkci pyknospor jednotlivých kmenů houby *C. minitans* ( $F=5,7732$ ;  $df=9,10$ ;  $p=0,0056$ ) a zároveň bylo prokázáno, že jednotlivé kmeny vykazovaly rozdílné supresivní účinky na tvorbu sklerocií fytopatogenní houby *S. sclerotiorum* ( $F=19,990$ ;  $df=10,11$ ;  $p>0,0000$ ).

Největší supresi tvorby sklerocií vykazoval kmen 3B izolovaný z mrkve a kmen Holandsko získaný ze sbírky CBS, Holandsko. Kmen 3B snížil tvorbu sklerocií o 16 kusů a kmen Holandsko o 15 kusů v porovnání s kontrolní variantou, kde fytopatogenní houba *S. sclerotiorum* vytvořila 24,5 sklerocií na 1 Petriho misku.

Graf 5. Produkce sklerocií fytopatogenní houby *S. sclerotiorum* v interakci s jednotlivými kmeny *C. minitans* na umělé živné půdě PDA



#### **Pokus 4: Hodnocení produkce pyknozor mykoparazitické houby *C. minitans* kmene Pěnčín na vybraných přirozených substrátech**

Postup:

- Suspense pyknozor adjustovaná na titer  $1 \times 10^6$  v 1 ml
- 25g sterilních ječných krup
- Inokulace sterilních krup adjustovanou suspenzí pyknozor
- Inkubace krup 24 hodin
- Přenesení propagulí (5x5) na sterilní 2% vodní agar v Petriho misce
- Inkubace propagulé v termostatu  $25 \pm 1^\circ\text{C}$
- Stanovení produkce pyknozor po 14 dnech a stanovení produkce na 1 propaguli

Tabulka 7. Porovnání produkce pyknozor *C. minitans* kmen Pěnčín při kultivaci na vybraných přirozených substrátech

Substrát	Produkce spor na 1 partikuli	
kroupy	1,49±0,029E+09	c
vločky	1,44±0,049E+09	c
rýže	3,44±0,047E+09	a
kukuřice	2,44±0,032E+09	b
proso	5,42±0,128E+08	f
špaldové korneto	1,28±0,058E+09	d
pšeničný bulgur	8,00±0,333E+08	e
pšenice	3,81±0,146E+07	g
oves	9,25±0,125E+07	g
ječmen	5,50±0,182E+06	g
triticale	1,24±0,024E+08	g
žito	3,38±0,138E+07	g
řepka	8,50±0,191E+08	e

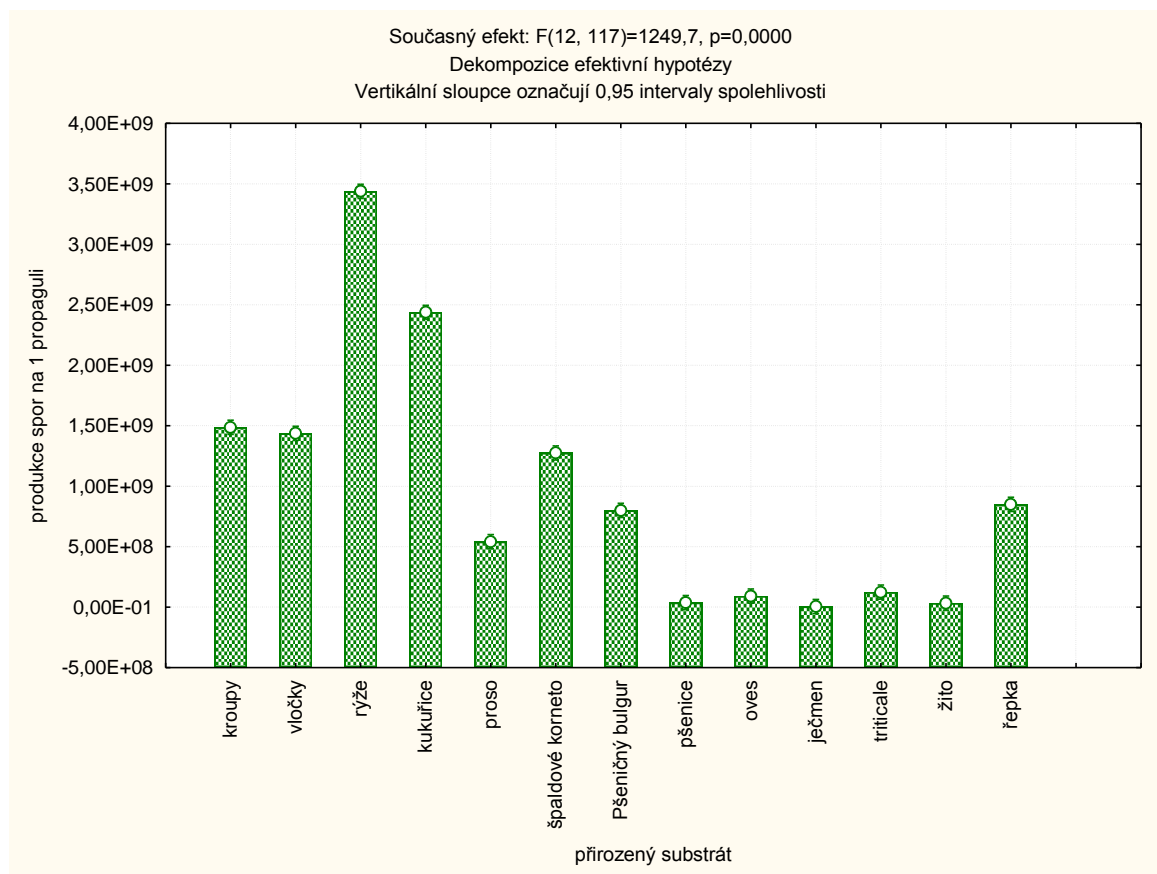
\*a, b, c... průměry ve sloupci se stejným znaménkem nejsou statisticky rozdílné (ANOVA metoda  $\alpha=0,05$ ; Tukey HSD test)

Tabulka 8. Statistická analýza studie produkce pykno spor na kompletní sadě přirozených substrátech.

	Produkce spor z 1 propagule		
	df	MS	F
Intercept	1	1,213666E+20	13779,29***
Přirozený substrát	12	1,100699E+19	1249,67***
chyba	117	8,807903E+15	

Pozn.: hladina významnosti  $\alpha$ : \*=0,05; \*\*=0,01; \*\*\*=0,001

Graf 6. Porovnání produkce pykno spor mykoparazitické houby *C. minitans* kmen Pěňčín při kultivaci na vybraných přirozených substrátech



### Zhodnocení pokusu:

Všechny substráty byly testovány pomocí standardního postupu, při kterém byl sledován průběh a pravidelnost porůstání povrchu partikulí substrátu myceliem houby a na závěr pokusu (po 14 dnech) byla stanovena průměrná výtěžnost pyknospor z 1 propagule. Tato verze povrchové kultivace představuje optimální kultivaci – celý povrch každé partikule může obrůst a pyknospory jsou produkovány na maximálním povrchu oddělených partikulí. Produkce pyknospor byla dále sledována i na větším sortimentu přirozených substrátů. V této studii byl opět zaznamenán statistický rozdíl v množství vyprodukovaných pyknospor *C. minitans* ( $F=1249,67$ ;  $df=12;117$ ;  $p<0,0000$ ). Produkce pyknospor houby *C. minitans* kmene Pěnčín se pohybovala v rozmezí od  $5,50 \times 10^6$  do  $3,44 \times 10^9$ . Mezi nejproduktivnější substráty patřila rýže, kroupy, kukuřice, vločky a semena řepky. Naopak mezi nevhodné substráty pro kultivaci houby *C. minitans* kmene Pěnčín lze zařadit obilky obilovin.



## 2. Diskuze a závěry

Zavádění biopreparátů na bázi vláknitých mikroskopických hub na trh a jejich využívání v praktické biologické ochraně, představuje obecně velmi složitý problém. Na úrovni producentů a registrantů biologických přípravků konstruovaných na bázi entomopatogenních, mykoparazitických a antagonistických hub jsou sice řešeny klíčové technologické problémy (např. produkce biomasy, formulace), nicméně uživatelé těchto prostředků jsou vystaveni zcela nové situaci v oblasti rozhodování, zda a za jakých okolností tuto formy ochrany rostlin použít. V porovnání s chemickými přípravky představují biologické přípravky na bázi mikroorganismů obecně zásadně odlišný koncept ochrany rostlin, přičemž za hlavní rys této odlišnosti lze označit informační podporu, kterou uživatel přípravků na bázi mikroorganismů potřebuje. Dostupnost velkého množství informací týkajících se mykoparazitické houby *C. minitans* naznačuje literární rešerše, která představuje převážnou část této bakalářské práce a byla vypracována s ohledem na demonstraci dostupnosti informací týkající se i takto specifického tématu.

V porovnání s chemickými přípravky je v případě biopreparátů na bázi hub nutné zvládnout nejen formu aplikace, ale i hlouběji porozumět celému interakčnímu systému „patogen – hostitel“ a s respektem k tomuto systému konkrétní přípravek využívat. Vybraným aspektům interakčního systému „patogen-hostitel“ byla věnována i tato bakalářská práce. Modelovým objektem byla mykoparazitická houba *Coniothyrium minitans*, na jejíž bázi jsou konstruovány a na trh zaváděny biopreparáty, které významným způsobem ovlivňují strategii ochrany rostlin proti houbám rodu *Sclerotinia*. V návaznosti na literární rešerši bylo zpracováno několik experimentálních okruhů, jejichž výběr byl realizován s cílem upozornit na některé významné aspekty, které s používáním biopreparátů na bázi hub souvisejí. Prvé dvě studie byly zaměřeny na prezentaci a zdůraznění fenoménu, který je při aplikaci biopreparátů na bázi hub běžně opomíjen, tj. saprotrofismus. V první studii byl sledován vliv živné půdy na růstové a produkční parametry a ve druhé studii byl sledován vliv přirozeného substrátu na produkci pyknospor mykoparazitické houby *C. minitans* kmene Con získaného izolací z komerčního biopreparátu Contans WG. Z výsledků studií je zřejmé, že mykoparazitická houba *C. minitans* vykazuje obecně velmi široký saprotrofní statut se schopností vytvářet myceliální biomasy a produkovat vitální pyknospory na rozmanitém spektru umělých živných půd, resp. přirozených substrátů. Stejně významné je i zjištění, že

rychlost růstu kultur *C. minitans* se velmi silně ovlivněna složením živné půdy, což je zjevné např. při porovnání velikosti kultur tvořících se na PDA nebo SDA a na TSA, kdy rozdíl v průměru a ploše kultur dosáhl velmi významných rozdílů. Obdobně bylo prokázáno, že jak složení živné půdy, tak i původ přirozeného substrátu výrazně ovlivňují sporulaci. Obě uvedená zjištění lze interpretovat nejen jako příklad klíčových prvků v oblasti umělé kultivace a produkce pykno spor houby *C. minitans*, ale i jako obecný parametr houby v kontextu výše zmíněné schopnosti realizovat se v prostředí i v neparazitickém cyklu, jako saprotrof.

Následující experimentální studie jsou zaměřeny na demonstraci některých významných vlastností, které souvisejí s funkční jednotkou mykoparazitických hub, tj. s kmeny. Všechny biopreparáty na bázi mikroskopických hub jsou konstruovány nejen na bázi konkrétního druhu, ale i na bázi konkrétního kmene, který byl vybrán díky některé z vlastností, která takový kmen upřednostňuje mezi ostatními kmeny téhož druhu. I v případě houby *C. minitans* lze v přírodě poměrně běžně zaznamenat přítomnost lokálních kmenů tohoto parazita. Cílem pokusů uvedených v experimentální části práce bylo demonstrovat významné odlišnosti, které lze pomocí standardních laboratorních testů detekovat i v případě kmenů houby *C. minitans*. V pokusech byly porovnány významné vlastnosti na vybrané sadě 10 kmenů, mezi nimiž byly jak kmeny získané z mykologických sbírek, tak i kmeny získané z přírodních zdrojů. Kmen izolovaný z přípravku Contans byl v této studii použit jako kmen referenční. Z výsledků je zřejmé, že v experimentální sadě kmenů *C. minitans* jsou zastoupeny kmeny s velmi odlišnými vlastnostmi. Navíc lze i konstatovat, že kmen využívaný při výrobě přípravku Contans vykazuje v polyfaktoriálním hodnocení poměrně vysokou produkční a růstovou kvalitu, ale ani v jednom z hodnocených parametrů jej nelze označit za jednoznačně špičkový. Velmi zajímavé výsledky byly získány při porovnání úrovně supresivity jednotlivých kmenů v antagonistickém testu na *S. sclerotiorum*. Pomocí tohoto orientačního biotitu bylo zjištěno, že v sadě kmenů vykazoval kmen z přípravku Contans de facto nejmenší účinnost, což je z hlediska praktického využití poněkud překvapivé.

S ohledem na některá zjištění získaná ve studii polyfaktoriální charakterizace kmenů *C. minitans* byla doplňkově realizována i produkční studie týkající se vybraného nativního kmene této houby. V tomto experimentu byla hodnocena produkce pykno spor mykoparazitické houby *C. minitans* kmene Pěnčín kultivovaného na vybraných přirozených substrátech. Tento pokus prokázal, že i přirozeně se vyskytující kmen této houby sice vykazuje významnou závislost na typu nutričního zdroje, nicméně je schopen realizovat kompletní vývojový cyklus na širokém spektru rostlinných substrátů. Navíc bylo prokázáno,

že v parametru produkce pykno spor dosahuje i vyšších hodnot než kmen, který je využíván při produkci preparátu Contans.

Výsledky studií zaměřených na charakterizaci kmene Con houby *C. minitans* a jeho porovnávání s dalšími kmeny této mykoparazitické houby naznačují nutnost respektovat lokální, přirozeně se vyskytující kmeny hub, protože představují kvalitativně velmi významnou složku přirozené supresivity prostředí.

Výsledky bakalářské práce lze zjednodušeně formulovat pomocí závěrů:

1. V odborné literatuře je dostupná řada informací, které jsou z hlediska funkčního využití biopreparátů na bázi houby *C. minitans* klíčové a s ohledem na jejich účinnost zcela nezbytné.
2. Pomocí vybraných literárních zdrojů je možné získat informace týkající se všech významných aspektů z oblasti biologie a ekologické valence houby *C. minitans*.
3. Laboratorní studie prokázaly široký saprotrofní statut vybraných kmenů houby *C. minitans* a schopnost tohoto parazita realizovat kompletní vývojový cyklus na široké škále definovaných živných půd a přirozených substrátů
4. V rámci studie zaměřené na polyfaktoriální charakterizaci vybraných kmenů houby *C. minitans* bylo prokázáno, že i mezi přirozeně se vyskytujícími kmeny této houby jsou zastoupeny kmeny s vysokou produkční a antagonistickou schopností.

## 1. Seznam literatury

- Agrios G. N. (1997): *Plant Pathology*, 4th ed. (New York: Academic Press), 43–62.
- Alabouvette C., Lemanceau P. (1999): Joint Action of Microbials for Disease Control. *In: Hall F.R., Menn J.J. (Eds.): Biopesticides – Use and Delivery. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, 117-135.*
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (1994): *Molecular biology of the cell*. Published by Garland Science, a member of the Taylor & Francis Group.
- Altieri M.A., Rosset P.M., Nicholls C.I. (1997): Biological control and agricultural modernization: Towards resolution of some contradictions. *Agriculture and Human Values*, 14: 303–310.
- Aziz A., Poinssot B., Daire X., Adrian M., Brier A, Lambert B., Joubert J-M., Pugin A. (2003): Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Mol. Plant-Microbe Inter.* 16: 1118-1128.
- Bagar M. (2007): Biologická ochrana rostlin. Metodické listy č. 12, Spolek poradců v ekologickém zemědělství ČR. [http://www.eposcr.eu/files/informac/vyd\\_publ/ML12%20Biologicka%20ochrana.pdf](http://www.eposcr.eu/files/informac/vyd_publ/ML12%20Biologicka%20ochrana.pdf); on-line: 8. 4.2011).
- Bach de P. (1964): The scope of biological control. *In: Biological control of insect Pests and Weeds*. Chapman and Hall Ltd., London. 3-20. cit. sec. Johnson M. W. (2000): *Biological Control of Pests*, ENTO 675. UH-Manoa, 1-5.
- Baker K.F., Cook R.J. (1974): *Biological control of plant pathogens*. The American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota, 196.
- Baker R., Griffin G.J (1995): *Molecular Strategies for Biological Control of Fungal Pathogens*. *In: Rueveni R. (ed.) Novel approaches to integrated pest management*. Lewis, CRC Press, Boca Raton, 369.
- Barnett, H.L., Binder, F.L (1973): The fungal host-parasite relationship. *Annu. Rev. Phytopathol*, 11:273.
- Benhamou N., Picard K. (1999): La résistance induite: une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes. *Phytoprotection*.80: 137-168.

- Bennett A.J., Leifert C., Whipps J.M. (2006): Survival of *Coniothyrium minitans* associated with sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(1): 164-172.
- Blein J.P., Milat M.L., Ricci P. (1991): Responses of cultured tobacco cells to cryptogein, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora cryptogea*. Possible plasmalemma involvement. *Plant Physiol.*, 95: 486-491.
- Bohatá, A., Landa, Z., Leitner, L.: Standard Evaluation of different strains of mycoparasitic fungus *Coniothyrium minitans*. *Agroregion, Collection of Scientific Papers, Faculty of Agriculture in Ceske Budejovice. Series for Crop Sciences*. 2006. 16: 2, 99-106. 13.
- Boland G.J. (1997): Stability analysis for evaluating the influence of environment on chemical and biological control of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) of bean. *Biol. Control*, 9:7-14.
- Boland, G.F., Hall R. (1994): An Index of plant hosts susceptible to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 16: 93-108.
- Cameron, R.K., Dixon R.A., Lamb C.J. (1994): Biologically induced systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 5: 715–725.
- Campbell W.A.A. (1947): New species of *Coniothyrium parasitic* on sklerotia, *Mycologia* 39:190.
- Dahan J., Etienne P., Petitot A.S., Houot V., Blein J.P., Suty L. (2001): Cryptogein affects expression of  $\alpha_3$ ,  $\alpha_6$ , and  $\alpha_1$  20S proteasome subunits encoding genes in tobacco. *J Exp Bot.*, 52: 1947-1948.
- Dangl J.L., Jones J.D.G. (2001): Plant pathogens and integrated defence response to infection. *Nature*, 411: 826-833.
- Denis C., Webster J. (1971): Antagonistic properties of species – groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interaction. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 57: 363 – 369.
- Denis C., Webster J. (1971): Antagonistic properties of species – groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interaction. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 57: 363 – 369.
- Dennis, C., Webster, J.(1971): Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. Hyphal interaction. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 57:363.
- DiPietro A., Lorito M., Hayes C.K., Broadway R.M., Harman G. (1993): Endochitinase from *Gliocladium virens*: isolation, characterization and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. *Phytopathology* 93: 308–313.
- Durrant W.E., Dong X. (2004): Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 42: 185-209.

- Edel-Hermann V., Brenot S., Gautheron N., Aimé S., Alabouvette C., Steinberg C. 2009: Ecological fitness of the biocontrol agent *Fusarium oxysporum* Fo47 in soil and its impact on
- Elad Y., Chet I., Boyle P., Henis Y., (1983): Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinium rolfsii* – Scanning electron microscopy. *Phytopathology* 73: 85-88.
- Gerlagh M., Whipps J. M., Budge S. P., Goossen van de Geijn H. M. (1996). Efficiency of isolates of *Coniothyrium minitans* as mycoparasites of *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum* and *Botrytis cinerea* on tomato stem pieces. *European Journal of Plant Pathology*, 10, 787–793.
- Gerlagh, M., Whipps, J. M., Budge, S. P., & Goossen van de Geijn, H. M. (1996). Efficiency of isolates of *Coniothyrium minitans* as mycoparasites of *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum* and *Botrytis cinerea* on tomato stem pieces. *European Journal of Plant Pathology*, 102, 787–793.
- Gottlieb D, Shaw PD (1970): Mechanism of action of antifungal antibiotics. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 8:371-402.
- Griffin D.M. (1968): A Theoretical Study Relating the Concentration and Diffusion of Oxygen to the biology of organisms in soil. *New Phytol.* 67:561-577.
- Handelsman, J., Parke, J.L. (1989): Mechanisms in biocontrol of soil-borne plant pathogens. Pages 27-61. In: *Plant-Microbe Interactions*, Vol. 3. Kosuge T., Nester E., (Eds.). McGraw-Hill, New York.
- Harman G.E. (2004): Overview of new insights into mechanisms and uses of *Trichoderma* based product. *Phytopathology*, 94(6): S138-S138.
- Hebbar, K.P., Lumsden, R.D.(1999): Biological control of seedling diseases. In: Hall, F.R., Menn, J.J.,(Eds): *Biopesticides-use and delivery*, Humana Press, Totowa, New Jersey, 155-170.
- Howell C.R. (1999): Selective isolation from soil and separation in vitro of P and Q strains of *Trichoderma virens* with differential media. *Mycologia*, 91 (6): 930-934.
- Howell C.R., Stipanovic R.D. 1994: Effect of sterol biosynthesis inhibitors on phytotoxin (viridiol) production by *Gliocladium virens* in culture. *Phytopathology*, 84 (9): 969-972.
- Howell, C.R., Stipanovic, R.D., Lumsden, R.D.,(1993): *Antibiotic production by strains of Gliocladium virens and its relation to the biocontrol of cotton seedling diseases*. *Biocontrol. Sci. Tech.*, 3:435-440. In: Howell, C.R., Stipanovic, R.D., (Eds), 1994: *Effect*

- of sterol biosynthesis inhibitors on phytotoxin (viridiol) production by Gliocladium virens in culture*. Phytopathology. 84:969-972.
- Huang H.C., Bremer E., Hynes R.K., Erickson R.S. (2000). Foliar application of fungal biocontrol agents for the control of white mold of dry bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. Biological Control 18: 270–276.
- Huang, H.C., Erickson, R.S., 2002. Overwintering of *Coniothyrium minitans*, a mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum*, on the Canadian prairies. Australasian Plant Pathology 31, 291–293.
- Chet I., Harman G.E., Baker R. (1981): *Trichoderma hamatum*: its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. Microbial Ecology 7, 29–38.
- Chet I., Inbar J., Hadar Y. 1997: Fungal antagonists and mycoparasites. In: Esser K., Lemke P.A. (Eds.): The Mycota IV—Environmental and Microbial Relationships. Springer, Verlag Berlin Heidelberg. 165-184.
- Chytilová V., Dušek K. (2007): Metodika testování odolnosti brukvovitých plodin k nádorovitosti. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., s. 19.
- Jakab G., Cottier V., Toquin V., Rigoli G., Zimmerli L., Métraux J.P., Mauch-Mani B. (2001):  $\beta$ -aminobutyric acid-induced resistance in plants. Eur. J. Plant Pathol. 107: 29–37.
- Jeffries P. (1995): Biology and ecology of mycoparasitism. *Canadian Journal of Botany*, 73: 1284-1290.
- Jeffries P. (1997): Mycoparasitism. In: Esser K., Lemke P.A. (Eds.): The Mycota IV—Environmental and Microbial Relationships. Springer, Verlag Berlin Heidelberg, 149-164.
- Johnson M. W. (2000): Biological Control of Pests, ENTO 675. UH- Manoa, 1-5.
- Jones D.A., Jones J.D. (1997): The role of leucine-rich repeat proteins in plant defences. Adv. Bot Res. 24?: 89-167.
- Jones, E. E., Stewart, A. (2000). Selection of mycoparasites of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* isolated from New Zealand soils. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 28, 105–114.
- Kazda J., Mikulka J., Prokinová E. 2010: Encyklopedie ochrany rostlin, Profi Press s.r.o., Praha, 399.
- Keen N.T. (2002): A century of plant pathology: a retrospective view on understanding host-parasite interactions. Annu. Rev. Phytopath. 38: 31-48.

- Kloepper J.W., Tuzun S., Zehnder G.W., Wei G. (1997): Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance - Historical precedence. *Phytopathology*, 87(2): 136-137.
- Krauss U., Soberanis W. (2002): Effect of fertilization and biocontrol application frequency on cocoa pod diseases. *Biological Control*, 24: 82–89.
- Kubicek C. P., Eveleigh D.E., Esterbauer H., Steiner W., Kubicek-Pranz E.M., (eds.) (1990): *Trichoderma reesei* cellulases: biodiversity, genetics, physiology and applications. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Kubicek C.P., Eveleigh D.E., Esterbauer H., Steiner W., Kubicek-Pranz E.M., (eds.) (1990): *Trichoderma reesei* cellulases: biodiversity, genetics, physiology and applications. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Kubicek CH. P., Harman G. E. (1998): *Trichoderma* and *Gliocladium*. Basic biology, taxonomy and genetics. 1: 277.
- Kůdela V., Bartoš P., Čača Z., Dirlbek J., Frič F., Lebeda A., Šebesta J., Ulrychová M., Valášková E., Veselý D. (1989): *Obecná fytopatologie. Academica, Praha*, 387.
- Lamb C. J., Lawton M.A., Dron M., Dixon R. (1989): Signals and transduction mechanisms for activation of plant defense against microbial attack. *Cell*, 56 (2): 215-224.
- Landa Z. (2002): Biologická ochrana zahradních rostlin proti chorobám a škůdcům v polních podmínkách, ve sklenících a fóliovnících. In: Demo M., Hričovský I. (Eds.): *Trvalo udržatelné technologie v záhradnictve. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre*, 225-280.
- Lawton, K., Weymann K., Friedrich L., Vernooij B., Uknes S., Ryals J. (1995): Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but no ethylene. *Mol. Plant-Microb. Interact.* 6, 863–870.
- Lewis, J. A., Papavizas, G.C., 1987: *Application of trichoderma and gliocladium in algináte pellets for kontrol of Rhizoctonia damping-off*. *Plant Pathology*, 36:438-446.
- Lumsden R. D., Walter J.F., Baker C.P. (1996): Development of *Gliocladium virens* for damping-off disease control. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 18.
- Lynch J.M., Whipps J.M. (1991): Substrate flow in the rhizosphere. In: Keister DL, Cregan PB, eds. *The Rhizo-sphere and Plant Growth*. Dordrecht: Kluwer, 15-24.
- Lyon G.D., Reglinski T., Newton A.C. (1995): Novel disease control compounds: the potential to “immunize” plants against infection. *Plant Pathol.* 44: 407-427.
- Manocha M.S. 1990: Cell-cell interaction ib fungi. *Journal of Plant Disease and Protection*, 97: 655-669.



- McQuilken MP, Whipps JM (1995) Production, survival and evaluation of solid-substrate inocula of *Coniothyrium minitans* against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Eur J Plant Pathol.*, 101:101–110.
- McQuilken, M. P., Mitchell, S. J., Budge, S. P., Whipps, J. M., Fenlon, J. S., Archer, S. A. (1995): Effect of *Coniothyrium minitans* on sclerotial survival and apothecial production of *Sclerotinia sclerotiorum* in field-grown oilseed rape. *Plant Pathology*, 44, 883–896.
- Mehdy M.C. (1994): Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.* 105: 467-472.
- Meyer S.L.F., Roberts D.P., Chitwood D.J., Carta L.K., Lumsden R.D., Mao WL (2001): Application of *Burkholderia cepacia* and *Trichoderma virens*, alone and in combinations, against *Meloidogyne incognita* on bell pepper. *Nematropica* 31: 75–86.
- Mishra R.C., Singh R., Singh H.B., Dikshit A. (2000): In situ efficacy of *Trichoderma harzianum* as mycoparasite on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Tropical Agriculture* 77: 205–206.
- Molla A.H., Fakhru'l-Razi A., Abd-Aziz S., Hanafi M.M., Roychoudhury P.K., Alam M.Z. (2002): A potential resource for bioconversion of domestic wastewater sludge. *Bioresource Technology* 85: 263–272.
- Navrátilová M. (2000): Možnosti biologické ochrany a její využití v praxi. *Úroda* 2: 42-44.
- Nesrsta M. (1991): Produkce antibiotik a toxinů u rodu *Trichoderma*. *Miscelanea prognostica*. Vol.3, 9-27.
- Nesrsta M. (2005): *Trichoderma* pro biologickou ochranu proti houbovým patogenům rostlin. Sborník abstraktů, Lednice, 22-23.
- Okrouhlá M. (1993): Biologické zdroje pro nechemickou ochranu rostlin. Ústav zemědělských a potravinářských informací Praha, s 5-38.
- Pieterse C.M.J., van Pelt J.A., Ton J., Parchmann S., Müller M.J., Buchala A .J., Métraux J. P., van Loon L.C. (2000): Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57, 123-134.
- Prokinová, E., (1996): Biologická ochrana proti houbovým chorobám rostlin. *ÚZPI, Rostlinná výroba* 7:12.
- Pronese P., Ruiz M.T., Coca M.A., Hernandez-Lopez A., Lee H., Ibe J.I. (2003): In defence against pathogens. Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy. *Plant Physiol.*, 131: 1580-1590.

- Purdy L.H. (1979): *Sclerotinia sclerotiorum*: History, diseases and symptomology, host range, geographical distribution and impact. *Phytopathology* 69, 875 – 880.
- Rigot J., Matsumura F. (2002): Assessment of the rhizosphere competency and pentachlorophenol-metabolizing activity of a pesticide-degrading strain of *Trichoderma harzianum* introduced into the root zone of corn seedlings. *Journal of Env. Science and Health Part B – Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* 37: 201–210.
- Rod J., Hluchý M., Prášil J., Zavadil K., Somssich I., Zacharda M. 2005: *Obrazový atlas chorob a škůdců zeleniny střední Evropy*, Biocont Laboratory, spol s r.o., Brno, 392.
- Rusterucci C., Stallaert V., Milat M-L., Pugin A., Ricci P., Blein J-P. (1996): Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiol.* 111: 885-891.
- Ryals J., Uknes S., Ward.E. (1994): Systemic acquired resistance. *Plant Physiology* 104:1109-1112.
- Ryan, C.A (1992): Search for the proteinase inhibitor inducing factor, PIIF. *Plant Molecular Biology.*, 19:123-133.
- Sandys – Wunsch C., Whipps J. M., Gerlagh M, Kurse M (1993): World distribution of the sclerotial mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *Mycol Res* 97: 1175-1178.
- Sejketov, G.Š. (1982): *Griby roda Trichoderma ich ispolzovanie v praktike*. nauka Kazachskoj SSSR, Alma-Ata, 248.
- Scheel D. (1998). Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1:305-310.
- Simon-Plas.P., Rusterucci C., Milat M-L., Humbert C., Montillet J.L., Blein J.P(1997): Active oxygen species production in tobacco cells elicited by cryptogein . *Plant Cell Environ.*, 20: 1573-1579.
- Smith, S.N., Armstrong, R.A., Barker, M., Bird, R.A., Chohan, R., Hartell, N.A., Whipps, J.M., (1999). Determination of *Coniothyrium minitans* conidial and germling lectin avidity by flow cytometry and digital microscopy. *Mycological Research*, 103 (12):1533-1539.
- Sticher L., Mauch-Mani B., Mettraux J.P (1997): Systemic acquired resistance . *Annu. Rev. Phythopatol.*35:235-270.
- Taylor, A.(1986): Some aspect of the biochemistry and biology of the genus *Hypocrea* and its anamorf *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Proc. N.S.Inst.Sci*, 36:27-58.
- the soil microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 68: 37–45.

- Tribe H. T. (1957): On the parasitism of *Sclerotinia trifolium* by *Coniothyrium minitans*. Trans. Br. Mycol. Soc 40:489-499.
- Turner, G.J., Tribe, H.T. (1976): On the *Coniothyrium minitans* and its parasitism of *Sclerotinia* species. Trans. Brit. Mycol. Soc. 66:97.
- van Loon L.C., van Oosten V.R., Ton J., de Vos M., Pieters C.M.J (2006): Adaptive induced resistance response to pathogens and herbivorous insect. In 8th. Conference of the European Foundation for Plant Pathology & British Society for Plant Pathology Presidential Meeting, 13-17 August KVL, Frederiksberh, Denmark.
- Vána, J.(1996): Systém a vývoj hub a houbových organismů. Univerzita Karlova Praha, Karolinum, 99-112.
- Vašák J., Fábry A., Zukalová H., Morbacher J., Baranyk P. (1997): Systém výroby řepky. Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin, Praha. 74.
- Verkley, G. J. M., da Silva, M., Wicklow, D. T., & Crous, P. W. (2004). *Paraconiothyrium*, a new genus to accommodate the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species. *Studies in Mycology*, 50, 323–335.
- Veselá D. (1986): Biologická ochrana proti chorobám kořenů vzházejících rostlin. Sborník Ref. Z 1. Sem. „Biotechnologie v integrované ochraně rostlin“ – Mykopreparáty československé výroby a jejich využití v ochraně polních kultur., 18.9. 1986, VÚRV Praha-Ruzyně.
- Viard M.P., Martin F., Pugin A., Ricci P., Blein J-P.(1994): Protein phosphorylation is induced in Tobago cells by elicitor cryptogein *Plant Physiol.*104: 145 -149.
- Weindling, R.(1932): *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology* 22:837.
- Whipps J. M., Gerlagh M. (1992). Biology of *Coniothyrium minitans* and its potential for use in disease biocontrol. *Mycological Research*, 96, 897–907.
- Whipps J.M, Lumsden R.D.(2001): Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. In: Butt T, Jackson C, Magan N, eds. *Fungal biocontrol agents—progress, problems and potential*. Wallingford: CAB International.
- Whipps J.M., Budge S.P., Mitchell S.J (1993): Observations on sclerotial mycoparasites of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycol Res.*,97:697–700.
- Yang L., Miao H.J., Li G.Q., Yin L. M., Huang H.C. (2007): Survival of the mycoparasite *Coniothyrium minitans* on flower petals of oilseed rape under field conditions in central China. *Biological Control*, 40(2): 179-186.

Yang R., Han Y.C., Li G.Q., Jiang D.H., Huang H.C. (2007): Suppression of *Sclerotinia sclerotiorum* by antifungal substances produced by the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *Eur J Plant Pathol.*, 119:411–420.