

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra ochrany rostlin



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

Prostředky biologické ochrany proti *P. cactorum* na jahodníku

Bakalářská práce

**Aleš Hanáček
Obor studia Rostlinolékařství**

Vedoucí práce doc. Ing. Miloslav Zouhar, Ph.D.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Prostředky biologické ochrany proti *P. cactorum* na jahodníku" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 3. 5. 2021

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval doc. Ing. Miloslavovi Zouharovi, Ph.D. za vedení mé práce, ochotu a trpělivost při experimentální části, ale také cenné rady a informace, které byly zahrnuty do literární rešerše. Další poděkování směřuje Ing. Marii Maňasové, Ph.D. a Ing. Janě Wenzlové za spolupráci a konzultaci laboratorní práce. Nakonec bych rád poděkoval své rodině a blízkému okruhu přátel za motivaci a podporu.

Prostředky biologické ochrany proti *P. cactorum* na jahodníku

Souhrn

Phytophthora cactorum spadá mezi nejvýznamnější patogeny z rodu *Phytophthora* škodící širokému okruhu hostitelů a vyskytující se na globální úrovni. Jedním, nichž takových hostitelů jsou právě jahodníky, u kterých je tento patogen důvodem vysokých ztrát na výnosech. V současnosti se zemědělci snaží upřednostnit látky přírodní povahy před ochranou chemickou, to hlavně z důvodu jejich dopadu na životní prostředí. Přípravky biologické ochrany spadají mezi jednu z přírodních metod s širokým využitím v této problematice. Prostředky biologické ochrany dokážou svým působením výrazně negativně ovlivnit patogen.

Práce se zabývá účinností devíti volně dostupných prostředků biologické ochrany na mortalitu *P. cactorum*.

Klíčová slova: jahodník, *Phytophthora cactorum*, bioagens, ochrana rostlin

Phytophthora cactorum is one of the most important pathogens of the genus *Phytophthora*, which harms a wide range of hosts and occurs on a global scale. One of such hosts is *fragaria* plants, for which this pathogen is the cause of high losses. Currently, farmers are trying to prioritize substances of a natural nature over protection by a chemical products, mainly because of their impact on the environment. Biological protection products are one of the natural methods with a wide use of this issue. Bioagens, due to their natural nature, are able to negatively influence the pathogen.

My thesis is focused on the effectiveness of nine freely available biological protection agents on the mortality of *P. cactorum*.

Keywords: *Fragaria*, *Phytophthora cactorum*, bioagens, plants protection

Obsah

1 Úvod	7
2 Vědecká hypotéza a cíl práce	8
3 Literární rešerše	9
3.1 Rod <i>Phytophthora</i>	9
3.1.1 Taxonomie <i>P. cactorum</i>	9
3.1.2 Původ a historie <i>P. cactorum</i>	9
3.1.3 Morfologie <i>P. cactorum</i>	10
3.1.4 Vývoj <i>P. cactorum</i>	10
3.1.5 Zastoupení rodu <i>Phytophthora</i>	13
3.1.5.1 Ve světě	13
3.1.5.2 V České republice.....	14
3.2 Jahodník (<i>Fragaria L.</i>)	15
3.2.1 Historie a původ.....	15
3.2.2 Taxonomie <i>Fragaria L.</i>	16
3.2.3 Anatomie rostliny	17
3.2.4 Podmínky pro pěstování jahodníku	17
3.2.5 Fytoftorová krčková hniloba jahodníku (<i>P. cactorum</i>)	18
3.2.5.1 Infekce jahodníku	18
3.2.5.2 Příznaky fytoftorové krčkové hniloby	19
3.2.5.3 Ochrana před <i>P. cactorum</i>	20
3.3 Bioagens	23
3.3.1 Bioagens a rostlina.....	24
3.3.2 Bioagens a patogen	24
3.3.3 Aplikace bioagens.....	25
3.3.4 Zástupci bioagens	26
3.3.5 Bioagens a <i>Phytophthora cactorum</i>	26
3.3.5.1 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	26
3.3.5.2 <i>Bacillus subtilis</i>	27
3.3.5.3 <i>Clonostachys rosea</i>	27
3.3.5.4 <i>Trichoderma spp.</i>	28
3.3.5.5 <i>Clonostachys spp. a Trichoderma Spp.</i>	29
3.3.5.6 <i>Coniothyrium minitans</i>	29
3.3.5.7 <i>Pseudomonas spp.</i>	30
3.3.5.8 <i>Pythium oligandrum</i>	30

4	Materiál a metody	31
4.1	Úvodní charakteristika	31
4.2	Příprava živného média.....	31
4.3	Vzorky <i>P. cactorum</i> z území ČR	32
4.4	Test účinku bioagens na růst <i>P. cactorum</i>	33
5	Výsledky	36
5.1	Izoláty z České republiky	36
5.2	Živné medium	36
5.3	Účinek bioagens na <i>P. cactorum</i>	36
5.3.1	Výsledná měření Tukeyovým HSD testem	38
5.3.2	Reprezentativní vzorek	43
5.3.3	Účinnost mezi bioagens	45
6	Diskuse	46
7	Závěr	49
8	Literatura	50
9	Přílohy	60
9.1	Seznam tabulek	60
9.2	Seznam grafů	60
9.3	Použité vzorce	60
9.4	Fotodokumentace	I

1 Úvod

Rod *Phytophthora* je jedním z nejvíce problémových skupin patogenů, které škodí v zemědělství, ale i ve volné přírodě, kde mají zásluhu na vymření různých druhů rostlin. Nejznámějším patogenem z rodu *Phytophthora* je pravděpodobně *Phytophthora infestans*, který způsobil Velký irský hladomor roku 1845, a při kterém zahynuly až 2 miliony lidí. V této práci jsme se zaměřili na *P. cactorum*, který je schopen napadnout až 250 různých druhů rostlin po celém světě. V České republice se jedná převážně o ovocné stromy, konkrétněji jabloně a hrušně, dále také jahodníky, ale i lesní dřeviny či okrasné rostliny v podobě rododendronů a dalších. Pěstování jahod v České republice je známo už po mnoho generací, ale díky neustále měnícím se podmínkám se zvyšuje výskyt chorob. Tyto choroby způsobují vysoké ztráty, a tak pěstitelům snižují výnosy. Jeden z hlavních problémů představuje právě fytoftorová hniloba jahodníku, která způsobuje poškození rostliny během celého procesu pěstování, což zvyšuje riziko poškození rostlin jahodníku a následného šíření patogenu mezi zdravými rostlinami. Projevem jsou náhlá vadnutí až nekróza celých rostlin, které se primárně objevují v krčku rostliny. Napadení se může projevit jak pouze na zelené rostlině, ale i v květech či samostatných plodech měknutím až hnilobou.

Jedna z dalších hrozeb je schopnost patogenu přetrvat nepříznivé podmínky v klidovém stádiu zvané spora. Současný systém ochrany před patogenem je spatřován v integrované ochraně rostlin, kdy je potřeba použití správných agrotechnických opatření a střídání chemických a biologických ochrany. Zvýšené odolnosti rostlin jahodníku proti chorobám lze docílit i pěstováním více rezistentních druhů. Z praxe víme, že na chemickou ochranu vzniká rychlá rezistence patogenu, a proto upřednostňujeme alternativní způsoby ochrany rostlin. Výzkum v rozvoji biologické ochrany rostlin se jeví jako nejvhodnější metoda pro kontrolu ochrany rostlin (Bleša 2019).

2 Vědecká hypotéza a cíl práce

Vědecká hypotéza:

Existuje konvenční či experimentální prostředek biologické ochrany, který bude mít negativní vliv na životaschopnost *P. cactorum* v *in vitro* podmínkách.

Cíl práce:

Získat nové informace o účinnosti prostředků biologické ochrany proti *P. cactorum* v *in vitro* podmínkách.

3 Literární rešerše

3.1 Rod *Phytophthora*

Rod *Phytophthora* je skupina živých organismů zařazena mezi obligátně parazitické oomycety, které spadají převážně mezi rostlinné patogeny. Do příchodu molekulární techniky bylo známo okolo 50 druhů (Alexopoulos et al. 1996), ale později pomocí molekulárně genetických metod bylo získáno více než 150 druhů rodu *Phytophthora* (Jung et al. 2016). Nejznámější ze svého rodu je pravděpodobně *Phytophthora infestans*, která je také nejvíce prostudovaným druhem, díky svému ekonomickému dopadu na agrokulturu a historii lidstva (Trigiano 2007). Zástupci rodu *Phytophthora* jsou rozšířeni po celém světě.

3.1.1 Taxonomie *P. cactorum*

Taxonomické určení zkoumaného patogenu *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn 1870) bylo stanoveno dle National Center of Biotechnology Information (2020).

Doména: *Eukaryota*

Říše: *Chromista*

Podříše: *Sar*

Kmen: *Stramenopiles*

Třída: *Oomycetes*

Řád: *Peronosporales*

Čeleď: *Peronosporaceae*

Rod: *Phytophthora*

Druh: *Phytophthora cactorum*

3.1.2 Původ a historie *P. cactorum*

První izolát *P. cactorum* byl získán z čeledi *Cactaceae* v Bratislavě z Jacobovy zahrady, následně byl H. Lebertem & F. Cohnem (1870) popsán a pojmenován *Peronospora cactorum*. De Bary (1881) pozměnil označení patogenu na *Phytophthora cactorum*. V literatuře se tento druh uvádí i pod odlišnými názvy, které sepsal Cline et al. (2008) jako *Peronospora fagi* (Hartig 1876), *Phytophthora fagi* (Hartig 1876), *Phytophthora paeoniae* (Cooper & Porter 1928), *Peronospora sempervivi* (Schenk 1875).

3.1.3 Morfologie *P. cactorum*

Dle morfologie je patogen *P. cactorum* často chybně označován jako houba. Hlavním odlišujícím se znakem je proces rozmnožování (Erwin & Ribeiro 1996). Mezi další odlišnosti u rodu *Phytophthora* můžeme zařadit bičíkaté stádium, které houby nemají. Na rozdíl od hub, které mají zásobní látku chitin, *Phytophthora* získává energii z mykolaminaranu. Na řadu nesrovnalostí lze poukazovat i ve směru biochemických dějů, například rozdíl v syntéze lipidů (Mrázková et al. 2012).

Mycelium *P. cactorum*, obsahující glykoglyukany a celulózu, tvoří takzvané nepřehrádkované hyfy, které odborně nazýváme coenické mycelium (Agrios 2005). Průměrná velikost hyf patogenu se dle různých zdrojů liší. Waterhouse & Waterson (1966) publikuje rozsah do 6 μm , zároveň Blackwell (1943) udává velikost 2–14 μm . Erwin & Ribero (1996) také poukazují na fakt, že se u hyf často nachází nepravidelná zduření. U větvení mycelia jsou hyfy u základu tenčí a tvarem znázorňují pravý úhel. Každá hyfa má diploidní jádro, jež se nachází převážně u báze hyfy (Mass 1998). U zakončení se hyfy protahují do špičky, která tak díky své tenké a flexibilní stěně zaujímá výhodnou pozici pro příjem živin. Mladé hyfy tvoří příčné stěny, které oddělují reprodukční část hyf, na rozdíl od starých, u kterých se příčné stěny mohou vytvořit kdekoliv. Střed starých hyf je vyplněn vakuolou a buněčná stěna je tvořena vrstvou protoplazmy (Blackwell 1943).

Prostředí, tedy kultivační médium, ve kterém patogen pěstujeme, ovlivňuje morfologii hyf. Při použití vodného média pro kultivaci fytoftorové hniloby můžeme pozorovat úzké, málo větvené, a do délky protáhlé hyfy. Při kultivaci patogenu v prostředí bohatém na živiny jsou hyfy široké, maximálně rozvětvené a krátké (Blackwell 1943). Tvar vzrostlých mycelií fytoftorové hniloby jahodníku připomíná svým vzhledem strukturu okvětních lístků. Množství ponořeného mycelia je přibližně stejné jako vzrostlé mycelium nad agarem. I přestože hyfa není hlavním vývojovým stádiem tohoto patogenu, je poměrně odolná vůči vnějším vlivům (Blackwell 1943).

3.1.4 Vývoj *P. cactorum*

Patogen během svého života mění podobu z diploidní (dvě sady chromozomů) na haploidní (obsahuje pouze jednu sadu chromozomů) formu, kdy převládá diploidní typ (Dick 1973).

Haploidní fázi lze pozorovat u rodu *Phytophthora* pouze při pohlavním rozmnožování. Výsledkem pohlavního rozmnožování je těleso zvané oospora (Goodwin 1997). Oospora svou stavbou těla připomíná obvykle široko stěnné kulovité útvary o rozměru 24–30 μm , které dobře

odolávají neblahým podmínkám (Maas 2004). Část druhů rodu *Phytophthora* spadá mezi homothalické, které hned po kolonizaci hostitelského pletiva přechází v dormanci (Goodwin 1997). Typický pro tento způsob je produkce obou pohlavních orgánů uvnitř samostatného izolátu (Ko 1978). Druhá část, zvaná heterothalická, vyžaduje ke vzniku oospor dva fyziologicky odlišné typy orgánů, v myceliu se tedy vyskytují buď samčí (antheridia) nebo samičí (oogonia) orgány (Goodwin 1997).

P. cactorum se prezentuje tvorbou oogonia i antheridia, která jsou obecně nazývána gametangia, což dokazuje, že hovoříme o homothalickém typu (Erwin & Ribeiro 1996). Oogonia jsou tvořena hladkou stěnou širokou 2 μm (Waterhouse & Waterston 1966) a jejich celkový vzhled je čirého, kulovitého charakteru o velikosti v průměru 19–38 μm (Abad 2019). Antheridia se nachází v těsné blízkosti stopky oogonia (paragenní uspořádání), které svým tvarem připomínají klubko, jež dosahuje rozměrů 8,5–21 \times 12–21 μm (Waterhouse & Waterston 1966).

Splynutím obou gametangií vzniká z oosféry oogonia diploidní oospora. Propojení probíhá pomocí plazmogamií (spojení cytoplazmy) a následným splynutím jader (Judelson 2009). Dle Blackwella (1943) si oospora zachovává obal oogonia a ke své ochraně vytváří 2 μm tlustou buněčnou stěnu. Vyplnění oogonia je buď plerotické (celkové) nebo aplerotické (částecné), dohromady je vytvořen 20–26 μm kulatý útvar (Abad 2019). Judelson (2009) udává, že takto vzniklé oospory zvládnou překonat extrémně nevyhovující podmínky jako jsou teploty pod bodem mrazu či naopak nedostatek vlhkosti zapříčiněny vysokými teplotami. Dlouhá životnost spor je podpořena také vysokou odolností proti mikrobům. Aby mohla spora vyklíčit, musí projít dormancí (Blackwell 1943).

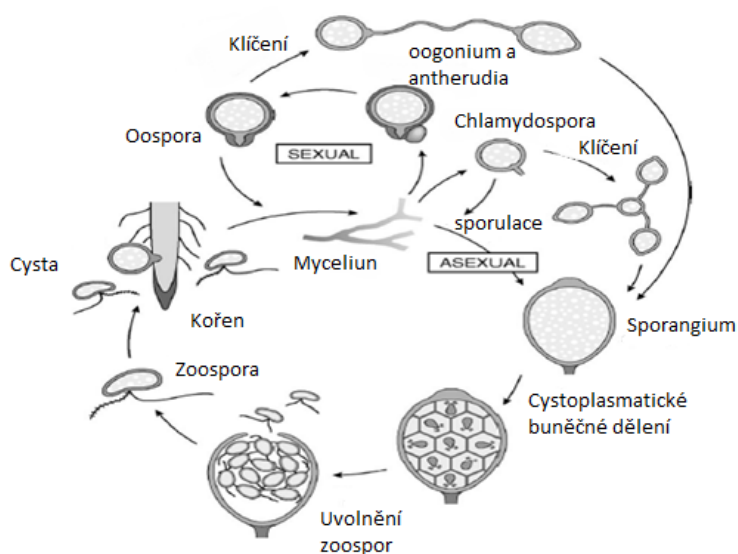
Při výskytu správných podmínek oospora klíčí pomocí sporangioforu. Sporangiofor je popisován jako hyfa, jež je nositelkou sporangia taktéž zvaná jako zoosporangium dle zoospor, které se z nich postupně uvolňují (Ko 1978). Za nejlepší podmínky pro správný růst sporangií se považuje mycelium, které je ovlhčováno během 3–24 hodin při teplotě v rozmezí 15–25 $^{\circ}\text{C}$. Největší nárůst sporangií byl dosažen při ovlhčení mycelia po dobu 16 hodin za konstantní teploty 20 $^{\circ}\text{C}$ (Grove et al. 1985). Erwin & Ribeiro (1996) uvádějí, že sporangiofor roste nejčastěji jednotlivě.

Sporangia se vytvářejí terminálně (na vrcholu) nebo interkalárně (podél hyfy) na sporangioforech. Sporangiofor svým vzhledem připomíná oválný až hruškovitý, vejčitý nebo sférický tvar. Rozměry sporangia jsou 31,4 \pm 4,8 \times 26,4 \pm 4,0 μm (Erwin & Ribeiro 1996, Blackwell 1943). Erwin & Ribeiro (1996) ve svých pracích udávají, že tvar sporangií závisí na okolních podmínkách. Nejčastěji se vyskytují sporangia, jejichž tvar je více protáhlý,

připomínající tvar citronu (Heffer et al. 2002). Obsah jednoho zralého sporangia činí až 50 zoospor (Maas 2004). Sporangium dozrává nejdříve za 6 hodin od jeho vzniku. Následně, pokud jsou vhodné podmínky, sporangium vyklíčí nebo praskne a spory se rozšíří do okolí. Typu spor, které se šíří do okolí po prasknutí sporangia říkáme zoospory (Heffer et al 2002).

Zoospory mají obvykle protáhlý tvar, připomínající tvar citronu či hrušky (Blackwell 1943). Zoospory mají pouze jedno jádro a postrádají buněčnou stěnu. K aktivnímu pohybu používají zoospory dva protilehlé bičíky, které se liší délkou, ale shodují se funkcí (Blackwell 1943). Kratší bičík s mastigonematy (vlášení) je umístěn ve směru pohybu, jemu protilehlý je delší hladký bičík (Erwin & Ribeiro 1996). Zoospory využívají ke svému pohybu vodní prostředí (Maas 2004). Pokud voda, ve které se zoospory vyskytují, není čerstvá nebo je znečištěna, dochází k usmrcení zoospor (Blackwell 1943). Zoospory k nalezení svého hostitele využívají chemotaktické strategie (pohyb buněk směrem chemickému podnětu), a proto aktivně detekují chemické látky hostitele a plavou jeho směrem (Goodwin 1997). Organické látky, které zoospory přitahují, jsou převážně sacharidy a aminokyseliny, které rostliny vylučují do okolí (Heffer et al. 2002). Po nalezení vhodného hostitele zoospory encystují (oddělí bičíky) a začnou tvořit buněčnou stěnu společně s klíčícím vláknem, ze kterých později vyrůstají nové hyfy (Ploetz 2003, Blackwell 1943).

Při mimořádných podmínkách jako je například vysoká teplota nebo výrazně zvýšená vlhkost vytváří *P. cactorum* formu k přežití, vzniklou nepohlavním rozmnožováním, zvanou chlamydoospora (Blackwell 1943). Chlamydoospor stejně jako oospor vyrůstají buď na vrcholu nebo podél hyfy (Abad 2019), ale narozdíl od nich mají buněčnou stěnu tvořenou pouze z jedné vrstvy (Blackwell 1943). Celý životní cyklus můžeme vidět přehledněji na obrázku č. 1.



Obr. č. 1: Životní cyklus *Phytophthora cactorum* (upraveno autorem)

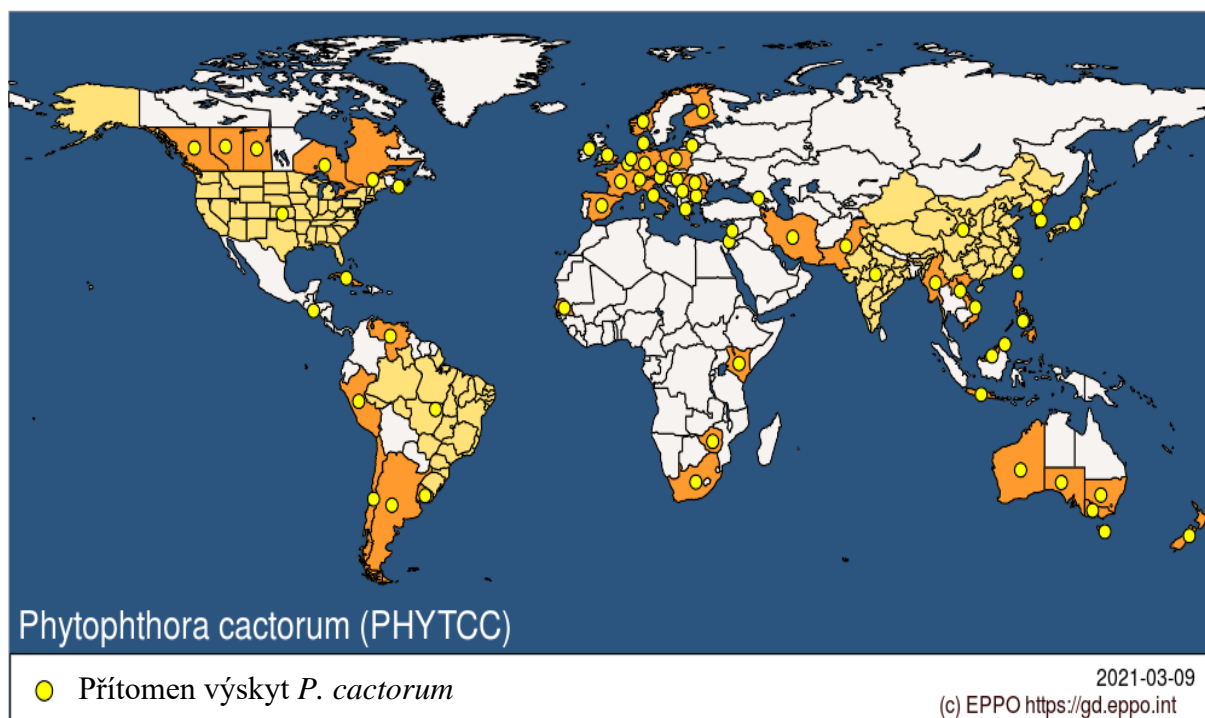
3.1.5 Zastoupení rodu *Phytophthora*

Patogenní druhy z rodu *Phytophthora* jsou příčinou ničivých onemocnění u mnoha různých druhů rostlin od sazenic jednoleté zeleniny a víceletých bylin, přes okrasné rostliny až na ovocné a lesní stromy. Většina zástupců z rodu *Phytophthora* se na rostlinách projevuje hnilobou kořenů, tlumením růstu sazenic a hnilobou spodních stonků, jiné druhy rodu *Phytophthora* způsobují rostlinám hnilobu pupenů později plodů, puchýře na listech, mladých větvích nebo přímo na plodech (Agrios 2005). Obecně lze o nich říct, že škodí jak v půdních kořenových systémech, tak i v nadzemních částech rostlin (Goodwin 1997).

3.1.5.1 *Ve světě*

Mezi nejznámější zástupce tohoto rodu řadíme druh *Phytophthora infestans*, který je původcem onemocnění brambor zvané plíseň bramboru. Druh *P. infestans* napadá i další hostitele, a to nejen z rodu Solanaceae (Agrios 2005). Plíseň bramboru je známá také jako důvod Velkého irského moru v letech 1845–1849, při kterém zahynuly až 2 miliony obyvatel Irska (Saville et al. 2016). Papriky a tykvovitě plodiny trápí převážně *P. capsici*, která způsobuje jejich hnilobu (Agrios 2005). Někteří zástupci z rodu *Phytophthora* zapříčinili snížení výskytu původních druhů rostlin z různých částí světa. Patogen *P. cinnamoni* v 70. letech 20. století zničil více než 20 % eukalyptových stromů. Důvodem vymírání dubů napříč Evropou, Jižní, Střední a Severní Amerikou v posledních letech je připisována taktéž druhu *P. cinnamoni*. Naopak choroby na cypřiších a tisech způsobuje zřejmě *P. lateralis*. Obávaným druhem, který se projevil nejvíce na přelomu tisíciletí, je *P. ramorum*, která způsobila tzv. náhlou smrt dubů v Kalifornii a Oregonu (Agrios 2005).

Momentálně je popsáno více než 150 druhů rodu *Phytophthora* (Jung et al. 2016) jako například *P. cryptogea*, *P. megasperma* a *P. parasitica*, které způsobují kořenové a stonkové hniloby mnoha druhům zeleniny, okrasných rostlin, polních plodin a některých dřevin. Za hniloby kořenů, nižších částí stonku, mladých větví a plodů dřevitých okrasných rostlin, zeleniny, bylin a stromů může převážně *P. cactorum*, *P. cambivora*, *P. citrophora*, *P. fragariae*, *P. palmivora* a *P. syringae* (Jung et al. 2016). Na obrázku č. 2 můžeme zaznamenat rozšíření podrobněji zkoumané *P. cactorum* ve světě.



Obr. č. 2: Rozšíření druhu *Phytophthora cactorum* po světě (upraveno autorem)

3.1.5.2 V České republice

V oblastech České republiky byl monitoring rodu *Phytophthora* zahájen okolo roku 2000, kvůli vysokému výskytu onemocnění lesních porostů. Studovány byly hlavně druhy *P. alni* a *P. plurivora*, které způsobily největší škody (Černý et al. 2015). Dalšími významnými druhy z rodu *Phytophthora* ohrožující české lesy jsou *P. cambivora* a *P. citriola* (Mrázková et al. 2012). Důležité je zmínit i druh *Phytophthora cactorum*, který způsobuje rozsáhlé škody na jahodách, ovocných a okrasných dřevinách po celé České republice, a samozřejmě *Phytophthora infestans*, která škodí v zemědělství během celé historie České republiky. V ČR existuje 21 taxonů, z toho jsou 4 původní evropské (*P. gallica*, *P. lacustris*, *P. polonica*, *P. taxon oaksoil*) a 17 zavlečených z jiných světadílů, z nich jsou 3 nepůvodní druhy, 2 hybridogenní (kříženci) a 12 neobjasněného původu (Černý et al. 2013).

3.2 Jahodník (*Fragaria L.*)

Jahodník pod latinským názvem *Fragaria L.* je zařazen do čeledi růžovitých (*Rosaceae*) (Pilát & Ušák 1963). Jako kulturní plodina je jahodník pěstován ve většině oblastí světa. Jahody lze nalézt jak v mírném pásu, tak i v subtropickém a tropickém podnebí (Hancock et al. 1991). Rod *Fragaria L.* roste v nadmořských výškách od hladiny moře až do 600 metrů nad mořem (Reed & Hummer 1995).

Rod *Fragaria L.* zahrnuje 43 druhů (Harant 1986). Momentálně neexistuje žádný ohrožený druh jahodníku (Reed & Hummer 1995). Nejvíce prozkoumaným druhem je jahoda lesní (*Fragaria vesca.*), která se pěstuje v Evropě a Severní Americe, a jahodník truskavec (*Fragaria moschata*), který se vyskytuje v Evropě (Reed & Hummer 1995). Naopak nejvíce vysazovaným a pěstovaným druhem je jahodník velkoplodý (*Fragaria x ananassa Duch.*), což je kříženec dvou amerických druhů jahodníku, a to jahodníku čilského (*Fragaria chiloënsis L.*), který je původním druhem jihoamerické republiky Chile, a jahodníku viržinského (*Fragaria virginiana D.*), který pochází ze střední části Severní Ameriky (Pilát & Ušák 1963). Jahodník velkoplodý řadíme mezi ekonomicky významnou plodinu se světovou produkcí téměř 2 milionů tun (Hancock & Scott 1988). Původními druhy České republiky jsou jahodník obecný (*Fragaria vesca*), jahodník truskavec (*Fragaria moschata*) a jahodník trávniční (*Fragaria viridis*). Všechny původní druhy ČR můžeme vidět jako divoce rostoucí rostliny ve volné přírodě (Pilát & Ušák 1963).

3.2.1 Historie a původ

Za vznik kultivovaného druhu *F. x ananassa* může křížení dvou rodičů z rodu *Fragaria L.*. Rodičovský kmen jahodník čilský dovezl do Francie z chilského Concepcionu podplukovník Amedee Francois Frezier, který byl vyslán králem Ludvíkem XIV.. Frezierova úloha byla převést živé rostliny jahodníku do Francie (Wilhelm & Sagen 1974). Výběr sazenic jahodníku byl zaměřen na rostliny, u kterých narostly největší plody. Z důvodu neznalosti vlastnosti rostliny, přežilo pouze 5 sazenic jahodníku, které zvládli odolat 6měsíční plavbě po moři. Po dokončení cesty byly sazenice jahod vysázeny v královských zahradách ve Francii (Wilhelm & Sagen 1974). Svoji úrodou plodů jahod druh *Fragaria chilöensis* zaujal jak široký okruh odborníků, tak i veřejnost po celé Evropě. Jahodník viržinský byl převezen z Ameriky už koncem 15. století sirem Francisem Drakem do Anglie, kde se z botanických zahrad rozšířil do celé Evropy.

Křížení těchto dvou druhů jahodníku navrhl v roce 1766 Antoin Duchense. Zahradník po zkřížení pylu z *F. virginiana* se samičími orgány *F. chiloensis* dokázal vytvořit nové odrůdy jahodníku, které se ze začátku označovali jako Carolina strawberry, ale později byla tato odrůda jahodníku přejmenována na *F. ×ananassa* (Wilhelm & Sagen 1974).

3.2.2 Taxonomie *Fragaria L.*

Zařazení rodu *Fragaria L.* bylo stanoveno dle National Center of Biotechnology Information (2020).

Doména: *Eukaryota*

Říše: *Viridiplantae*

Podříše: *Streptophyta*

Podříše: *Embryophyta*

Podříše: *Tracheophyta*

Podříše: *Spermatophyta*

Třída: *Magnoliopsida*

Podtřída: *Eudicotyledons*

Podtřída: *Gueneridae*

Podtřída: *Pentapetalae*

Podtřída: *Rosids*

Podtřída: *Fabids*

Řád: *Rosales*

Čeleď: *Rosaceae*

Podčeleď: *Rosoideae*

Tribus: *Potentilleae*

Podtribus: *Fragariinae*

Rod: *Fragaria L.*



Obr. č. 3: *Fragaria vesca*

3.2.3 Anatomie rostliny

Rostliny rodu *Fragaria L.* jsou zařazeny mezi vytrvalé byliny se šikmým oddenkem, který se dále větví. Z oddenku vyrůstá přízemní růžice, ze které vychází až dvacet centimetrové lodyhy. Chlupatá lodyha, která se na vrcholku lehce větví, je zakončena sadou bílých květů, které vytvářejí chudokvětý okolíkovitý vrcholík. Na lodyhu navazují dlouze řapíkaté listy, které jsou svým vzrůstem vyšší než původní lodyhy. Přízemní listy jahodníku jsou složeny z vejčitých lístků, které jsou řapíkaté a trojčetné, z nichž prostřední z listů je svěšený směrem dolů. Okraje listů jsou ozubené. Barva listu je na povrchu tmavě zelená s přitisklými chlupy a spodní strana je zbarvena bílo zeleně, na které je ochlupení výrazně větší než u povrchové strany listu (Pilát & Ušák 1963).

Květy jahodníku jsou tvořeny kalíškem. Pět korunních plátků, které jsou 4-8 mm dlouhé a bělavě zbarvené, mají tvar okrouhle vejčitý. Obvykle se nachází uvnitř květu 20 tyčinek. Na mohutném lůžku sedí ve velkém počtu drobné semenáčky, které zrají do podoby malých peckovitých nažek. Když rostlina plodí, je kalich složen z pěti trojboce vejčitých zašpičatělých lístků, které zůstávají těsně za plodem jahodníku. Při dozrání jahodníku vzniká červený plod příjemné a sladké chuti (Pilát & Ušák 1963).

3.2.4 Podmínky pro pěstování jahodníku

Schopnost přizpůsobit se klimatickým podmínkám umožňuje jahodníku růst jak v nížinách, středních polohách, tak i v podhorských oblastech. Nejčastěji se doporučuje pro pěstování kukuřičná nebo teplejší bramborářská oblast. Výhodná poloha pro růst jahodníku se nachází na jihozápadních svazích, kam dopadá dostatečné množství světla a je zde příznivá vlhkost a teplota (Peiker & Starý 1956). Naopak nevhodná místa k pěstování jahodníku jsou východní a jižní stanoviště, které bývají často obětí sucha (Harant 1986).

Nejvyšších výnosů dosahujeme, když pěstujeme jahodníky v nížinách, ale vhodná jsou i stanoviště ve výškách do 600 m nad mořem (Peiker & Starý 1956). Nejvíce přínosná teplota pro pěstování jahodníku je v ročním průměru 7–8 °C. Vysoké výnosy nám zaručuje dostatečný sluneční svit a průměrný roční úhrn srážek v rozmezí 600–700 mm. (Vachůn 2004). Vachůn (2004) dále uvádí, že pro pěstování jahodníku je ideální pH půdy v rozmezí 5,5 – 6,5 a je doporučována sadba do černozemě, hnědozemě a mladších sprašové půdy. Abychom zamezili vzniku infekce plísní šedou (*Botrytis cinerea*), tak je nutné v době dozrávání jahodníku zabránit přebytné manipulaci s půdou. K pěstování jahodníku se používají dva typy sazenic. Sazenice

nechlazené, které mají klasickou podobu s listy a sazenice chlazené, u kterých se používá stav bezlistý, který je veřejnosti známý jako frigo sadba (Vachůn 2004).

3.2.5 **Fytoftorová krčková hniloba jahodníku (*P. cactorum*)**

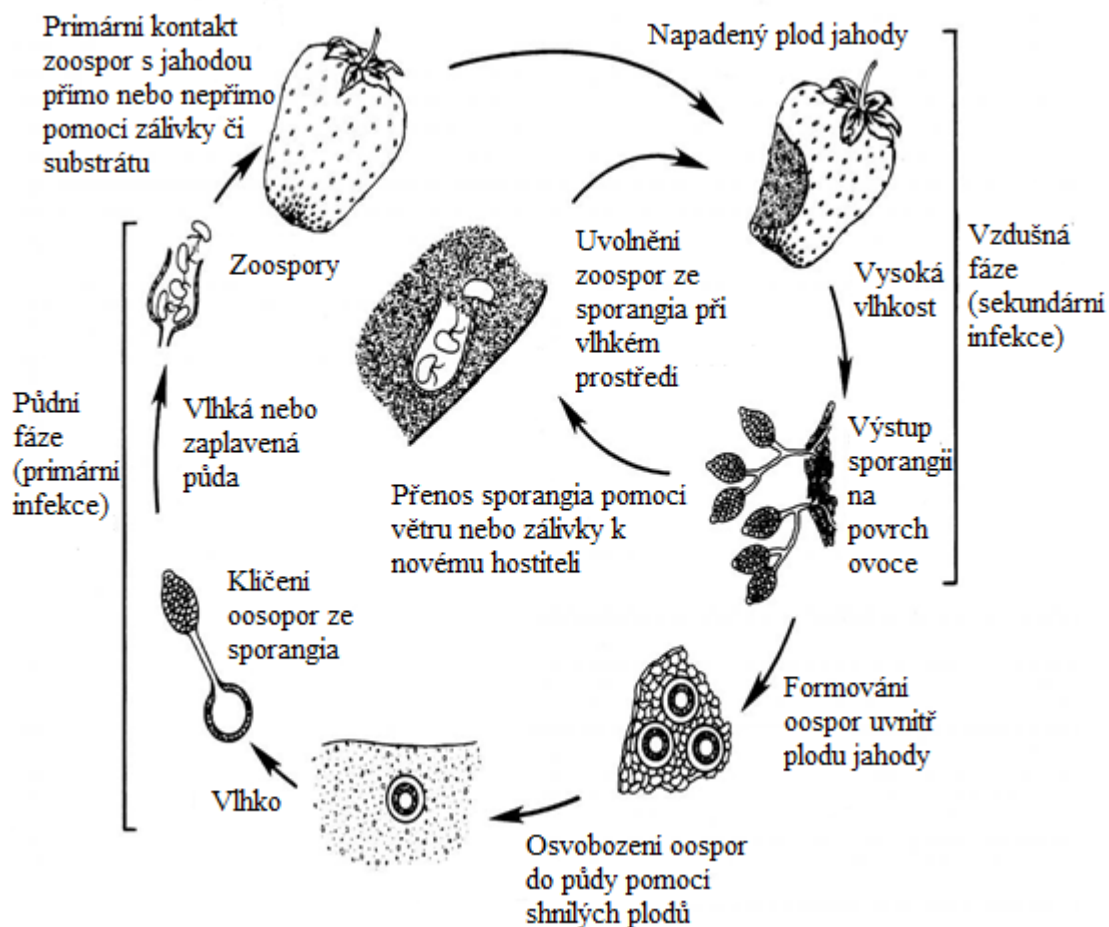
Phytophthora cactorum se řadí mezi nejvíce destruktivní patogeny jahodníku, které způsobují onemocnění zvané fytoftorová hniloba jahodníku. Patogen napadá celou rostlinu jahodníku, a to od kořenů, oddenků, listů až k plodům (Porras et al. 2007). K rychlejšímu šíření fytoftorové hniloby přispívá teplé a deštivé počasí. Nejvyšší ztráty na výnosech jahodníku způsobené *P. cactorum* bývají v teplejších oblastech a při pěstování sadby jahodníku v těžkých a vlhkých půdách. Špatná strategie střídání plodin na pozemku, kde jahody pěstujeme, napomáhá k rozsáhlejšímu šíření fytoftorové hniloby, ke které nejčastěji dochází při absolutní ignoraci všech agronomických doporučení (Kloutvorová et al. 2018). Onemocnění zapříčiněné patogenem *P. cactorum* způsobuje celosvětové ekonomické škody. Pro příklad ekonomických škod se uvádí případ v letech 1996-1997 v Norsku, kde došlo ke ztrátám až 40 % na výnosech jahod a také kauza v roce 1981, která uvedla až 30 % ztrát na jahodových farmách v Ohiu (Nellist et al. 2019).

3.2.5.1 **Infekce jahodníku patogenem**

Phytophthora cactorum přežívá v půdě nebo v infikovaném rostlinném pletivu jako perzistentní, odolná a spící spora. Ve vlhkém prostředí dochází ke klíčení spor ve strukturu zvanou sporangium (viz 3.1.4. Vývoj *P. cactorum*). Fytoftorová hniloba infikuje kořeny a krčky jahodníku pouze v případě, pokud nastane přímý kontakt sporangia s rostlinou. Pokud je půda dlouhou dobu dostatečně nasycena vodou, sporangium *P. cactorum* začne uvolňovat bičíkaté zoospory, které jsou schopny doplavat k dalším zdravým rostlinám a infikovat je. Důsledkem špatně odvodňovaných polí anebo těžkých půd, ve kterých vydrží voda delší dobu, dochází k většímu riziku infekce jahodníku tímto patogenem. Patogen je schopen kontaminovat jak přirozené, tak i umělé vodní nádrže. *Phytophthora cactorum* infikuje zdravé rostliny, pokud zavlažujeme výsadbu z takto infikovaných vodních ploch. (Celetti & Fisher 2015).

První příznaky napadení fytoftorovou hnilobou při přenosu půdou se projeví za 4 týdny po kontaktu zoospor s rostlinou. Pokud použijeme již infikovanou sadbu jahodníku patogenem *Phytophthora*, tak dochází k propuknutí infekce rychleji, a to 1-2 týdny po výsadbě. Pokud nastanou vhodné podmínky ve prospěch patogenu, dokáže fytoftorová hniloba usmrtit rostlinu již za týden, ale v případě nepříznivých podmínek se doba usmrcení jahodníku může prodloužit

i v řádu měsíců (Maas 2004). K pochopení infekčního cyklu nám může napomoci obrázek č. 4 dostupný z Ohio State univerzity.



Obr. č. 4: Infekční cyklus *P. cactorum* na jahodníku (upraveno autorem)

3.2.5.2 Příznaky fytoftorové krčkové hniloby

Příznaky fytoftorové hniloby jahodníku se dokumentují nejčastěji na polích, které jsou dobře zásobeny vodou. Infekce se na rostlině projevuje skvrnitostí, zvadnutím anebo zakrněním růstu (Celetti & Fisher 2015). Po napadení patogenem rostliny náhle vadnou a postupně zasychají (Kloutvorová et al. 2018). Příznaky lze pozorovat v jakékoliv vývojové fázi jahodníku (Maas 2004).

Nejprve jsou zasaženy nejmladší listy a poté infekce přechází na starší listy jahodníku (Nellist et al. 2019). Listy jahodníku se zpočátku infekce často zbarvují do modrozelené barvy. Při závažném onemocnění fytoftorovou hnilobou se objevují hnědě zbarvená nekrotická pletiva podél okrajů a v žilkování listů jahodníku (Celetti & Fisher 2015).

Patogen napadá taktéž plody jahodníku, jak zralé, tak i nezralé, květní stopky i báze řapíků. U plodu jahodníku, který je ještě nezralý, vznikají v místě infekce *P. cactorum* tmavě hnědé skvrny, ale může nastávat i situace, ve které zůstává plod zelený a tmavě hnědá barva lemuje pouze okraje jahodníkového plodu. (Maas 2004). Konzistence napadených nezralých plodů je gumovitá. Zralý plod jahodníku měkne a postupně ztrácí barvu a chuť, která se ze sladké mění na hořkou (Kloutvorová et al. 2018).

V krčku rostliny po rozříznutí nožem můžeme pozorovat známky fytoftorové hniloby nejlépe, a to načervenalým až sytě červeným, ba dokonce v krajních případech až tmavě hnědým zbarvením pletiva. Kořeny, které rostou z infikovaného krčku, jsou často černé v místě splynutí s infikovaným krčkem. Zasažení kořenového systému může mít za následek změnu barvy samotných rhizomů a snížení produkce sekundárních kořenů rostlin jahodníku (Celetti & Fisher 2015). Pokud rozřežeme rostlinu v místě infikovaného krčku, tak můžeme v průřezu zaznamenat nekrotické léze. (Kloutvorová et al. 2018).

Příznaky způsobené *P. cactorum* mohou být zaměnitelné i s jinými patogeny jahodníku, a proto se pro přesné stanovení využívají laboratorní detekční metody (Celetti & Fisher 2015).

3.2.5.3 Ochrana před *P. cactorum*

Zamezit vzniku fytoftorové hniloby zapříčiněné *P. cactorum* je poněkud obtížné, a proto se doporučuje integrovaná ochrana rostlin (Celetti & Fisher 2015). Tento proces je nutno řídit dle kontrolního systému z roku 2014, který vyplývá ze směrnice 2009/128/ES. V roce 2015 bylo nutno pozměnit výklad skrze vyjádření Evropské Komise, od toho roku se musí každoročně předkládat formulář na komplexní pojetí integrované ochrany rostlin. Provedení integrované ochrany je posuzováno pomocí bodového systému a za porušení povinností, které jsou dány zákonem, je udělena pokuta (anonym 2020).

3.2.5.3.1 Agrotechnická ochrana

Ochrana rostlin začíná volbou správného místa pro pěstování. Vhodný výběr pozemku je nezamokřený s lehkou půdou (Kloutvorová et al. 2018). Pokud není k dispozici takto popsaná parcela, volíme sadbu do vyvýšených záhonů (Celetti a Fisher 2015). Důležité je vyhnout se štěrkovitým, jílovitým a podmáčeným místům (Kloutvorová et al. 2018). Samozřejmostí je vyhýbat se polím, kde byl výskyt patogenu *P. cactorum* již zaznamenán, tím předejdeme vysoké pravděpodobnosti znovu vzniku infekce (Celetti & Fisher 2015). Sadbu je vhodné umístit na přímé sluneční světlo. Jahodníky vysazujeme v řádcích ve směru převládajícího větru (Ellis 2008). Aby nedošlo k přehuštění porostu, jsou doporučovány

rozestupy od 20 cm až do 70 cm mezi sazenicemi jahod, kde vzdálenost závisí na zvolené odrůdě (Kloutvorová et al. 2018). Díky těmto uvedeným úkonům napomáháme rostlině k zabránění vzniku infekce způsobené patogenem *P. cactorum* (Ellis 2008).

Velmi důležitý je i výběr správné odrůdy jahodníku (Kloutvorová et al. 2015). V rozhraní pěti let v letech 1998-2002 bylo provedeno testování na odolnost proti *P. cactorum*, ve kterých byly stanoveny jako nejodolnější odrůdy Senga Sengana, Induka, Melody, Glima a Bogota. Naopak mezi nejcitlivější byly zařazeny Tamella, Inga, Evita a Jonsok. Na základě nových znalostí bylo provedeno křížení mezi odolnými druhy, ve kterém byl cíl zvýšit odolnost jahodníků proti fytoftorové hnilobě. Nově vzniklé odrůdy nebyly odolnější, nýbrž citlivější než dosavadní známé odolné odrůdy (Eikemo et al. 2003). Později byly doplněny do skupiny odolných odrůd jahodníku taktéž Korona a do citlivějších odrůd jahodníku Polka, Nobel a Saga (Eikemo & Stensvand 2015). Kloutvorová et al. (2018) uvádí jako odolné odrůdy jahodníku i Kama, Karmen, Zefyr a Tenira.

Pro zamezení kontaktu jahodových plodů s půdou je doporučeno mulčování jahodníku slámou nebo jiným přírodním materiálem (Ellis 2008). Maas (2004) doplňuje ve své studii, že materiál vyrobený z umělé hmoty není vhodný pro mulčování jahodníků, protože by mohl zachycovat nadbytečnou vodu a tím napomáhat k šíření patogenu *Phytophthora cactorum*.

Dodržování rozestupu sadby rostlin v rámci 5 let a správné načasování hnojení je taktéž důležité k zabránění vzniku infekce. Například nadměrná spotřeba dusíkatých hnojiv může mít za následek vysokou produkci listů, které by mohly zakrývat plody a omezit je ve vysychání při nepříznivých podmínkách, které by mohli vést ke vzniku infekce způsobené patogenem *Phytophthora cactorum* (Ellis 2008).

3.2.5.3.2 Chemická ochrana

Mezi hlavní postupy ochrany jahodníku patří také aplikace fungicidů (Porras et al. 2007). Dle aplikace fungicidů je můžeme rozdělit do tří kategorií, a to jako kontaktní, systémové a mezosystémové.

První z nich jsou kontaktní přípravky, které zůstávají na povrchu rostliny a nepronikají přes pletiva do rostliny. Problematikou kontaktních přípravků jsou silné deště, které smyjí prostředek z povrchu jahodníku, naopak výhodou je, že na tyto prostředky nevzniká rezistence (Kloutvorová et al. 2018). Účinnými látkami kontaktních přípravků je používání Captanu nebo Thiramu, ale jelikož neprokazovali vyšší účinnost ve srovnání s jinými přípravky, tak se využívají k chemické obraně jen velmi zřídka (Wedge et al. 2007).

Druhou kategorií jsou systémové přípravky, které pronikají do rostlinných pletiv, čímž zamezíme možnosti odstranění přípravku smytí dešťovými srážkami. Způsobnost systémových přípravků ohrožuje možný vznik rezistence patogenu na účinné látky a z toho důvodu je nutné dodržovat zásady antirezistentní strategie.

Třetí skupinou jsou mezosystémové fungicidy. Tento typ je dosti podobný prvním zmíněným, ale na rozdíl od nich se fungicid po dopadu na rostlinu rozšíří po povrchu. Stejně jako kontaktní prostředky i prostředky mezosystémové nepronikají dovnitř pletiv rostliny. U mezosystémových přípravků je taktéž možný vznik rezistence patogenu na fungicid, tento typ se používá převážně k preventivní ochraně před chorobami a škůdci. Jako hlavní účinné látky mezosystémových prostředků jsou strobilinové povahy (Kloutvorová et al. 2018), a to azoxystrobin a pyraclostrobin, které vykazovaly excelentní ochranu proti *P. cactorum*. Ze stejného testování se jako velmi účinné látky mezosystémových prostředků projeví fosforečnan draselný a mefenoxam. (Rebollar-Alviter & Ellis 2005). Velmi účinná látka proti *P. cactorum* je Methylbromid, který ale svojí toxicitou poškozuje ozonovou vrstvu, a proto na příkaz Evropské unie je od roku 2005 legislativně zakázáno používat tento prostředek (Porrás et al. 2007). Jako chemickou alternativu Methylbromidu byly použity ve španělských jahodárnách v průběhu let 2003-2017 Chlorpikrinové směsi. Tyto směsi dokázaly snížit výskyt *P. cactorum* v uvedeném období, a proto byly tyto prostředky zařazeny jako vhodná náhrada za velmi účinný Methylbromid (Villarino et al. 2021).

Chemická ochrana v České republice není natolik podporována. Jedinou účinnou látkou, kterou lze v rámci chemické ochrany použít, je fosetyl-Al (Aliette 80 WG) (Kloutvorová et al. 2018). Přípravek Aliette 80 WG spadá do skupiny ethyl fosfonátů, který dokáže svými účinky ovlivnit metabolismus aminokyselin a složení bílkovin rostliny. Příjem toho prostředku rostlinou je velmi rychlý, jelikož vniká do rostlinných pletiv přes celý povrch. Rozšíření prostředku probíhá jak přes xylém, tak i přes floém. Hlavní účinností přípravku je aktivní inhibice růstu patogenu a tím je schopen zabránit klíčení sporangií *P. cactorum*. Výhodou přípravku Aliette 80 WG je, že současně zabraňuje rozvoj myceliem, omezuje další sporulaci a stimulací obranných mechanismů také napomáhá nepřímo zvyšovat odolnost rostlin. Přípravek můžeme aplikovat pásovou zálivkou. Pásová zálivka je preferována při sušších podmínkách a vhodná pro frigo sazenice z důvodu šetrnosti k tomuto typu sadby. Fungicid aplikujeme až sazenice zakoření a začnou jí růst počáteční listy (10–14 dní po výsadbě), kde na pás o velikosti 20 cm spadá dávka 1000 l/ha. Druhou možností je máčení rostlin v přípravku, ve kterém se 20 minut sazenice namáčí a poté jsou ihned zasazeny. Kořeny jahodníku a srdéčka rostlin se máčí jednotlivě, nelze použít k máčení celé svazky. Pokud se

blíží suché počasí, je potřeba po aplikaci fungicidu porost zavlažit. Při máčení kořenů jahodníku se často poškodí frigo sazenice, a proto není vhodné tento typ fungicidu pro tuhle sadbu používat. Kvůli možnému vzniku rezistence na přípravek musí být použita antirezistentní strategie. Na porost jahodníku můžeme aplikovat přípravek Aliette 80 WG jen jednou během jedné sezóny (Bayer 2007). Léčba dle Bayer (2007) je rychlá, fungicid by měl účinkovat do dvou dnů po vzniku infekce. Tento prostředek je také doporučován jako vhodná ochrana před plísní chmelovou (*Pseudoperonospora humuli*), u tykvové zeleniny jako regulátor onemocnění plísní okurkové (*Pseudoperonospora cubensis*). Pomocí tohoto přípravku je dokázán vysoký účinek proti onemocnění černou skvrnitostí révy (*Phomopsis viticola*) a růstu penicilinu. V rámci antibaktericidní ochrany se používá fungicid Aliette 80 WG pro ošetření rostlin před bakteriální spálou růžovitých (*Erwinia amylovora*) a rakovinnému odumírání větví peckovin (*Pseudomonas syringae*) (Bayer 2007).

3.2.5.3.3 Biologická ochrana

Pojmem biologická ochrana se zabývá velké spektrum vědních oborů jako jsou například entomologie, fytopatologie, chemie, rostlinná fyziologie, ekologie a další. Ve fytopatologii, je tento způsob ochrany rostlin použit jako mikrobiální antagonismus k potlačení chorob, ale také se dá použít ve vztahu k patogenům, které jsou zaměřeny na redukci plevelů. V praxi se používají přirození nepřátelé škodlivých organismů k jejich úplnému zneškodnění, nebo alespoň omezení jejich výskytu. Strategie ochrany rostlin spočívá v podpoření přirozeného výskytu původních nebo zavlečených prospěšných organismů. Organismus, který má za následek potlačení škůdce či patogenu, je nazýván jako „Biocontrol agent“ či zkráceně „bioagens“. (Bleša 2019).

Z bioagens, které jsou doporučovány k ochraně jahodníku proti *P. cactorum*, je dle registru přípravků nejúčinnější Polyversum, který využívá ochranou strategii pomocí mykoparazitismu *Pythium oligandrum*. Polyversum aplikujeme máčením rostliny v přípravku před zasazením anebo pásovou zálivkou po zasazení. Nejlépe podpoříme účinnost bioagens aplikací do vlhčích půd (Kloutvorová et al. 2018).

3.3 Bioagens

Termín bioagens označuje organismy, které jsou součástí účinné biologické ochrany rostlin. Význam bioagens je také často zaměňován s významem biological warfare agents (prostředek biologického boje), který označuje nebezpečné mikroorganismy, které jsou zakázány kvůli své toxicitě, tedy představují hrozbu pro zdraví člověka (Bleša 2019).

3.3.1 Bioagens a rostlina

Bioagens a rostlina spolu mohou žít pouze takovým způsobem, který je pro oba prospěšný. Tento vzájemný vztah, který by měl mezi rostlinou a bioagens panovat se nazývá symbióza. Z přesné definice tohoto vztahu také vyplývá, že symbióza není omezena pouze na dva nezávislé organismy, nýbrž může vznikat i mezi vícero organismy najednou (Bleša 2019).

Existují různé strategie, jak dosáhnout podpůrného efektu bioagens. Z praktického hlediska nám nejvíce vyhovují organismy, které se ve vhodném prostředí sami rozmnožují a vztah mezi nimi byl mutualistický (Bleša 2019). Mutualismus je definován jako vzájemné prospěšné ovlivňování dvou a více organismů (Lhotský 2015). Velká část zástupců spadá mezi fakultativní mutualisty. Toto označení značí ty organismy, u kterých je efekt prospěšnosti závislý na podmínkách prostředí (Bleša 2019). Obsáhlou početní skupinu tvoří též komenzálové. Komenzalismus je interakce mezi dvěma organismy, ve které jeden z nich není ovlivňován a zároveň přináší prospěch organismu druhému. (Lhotský 2015). Ve vztahu mezi rostlinou a bioagens existuje i neutralismus, který označuje stav, ve kterém na sebe organismy nemají žádný vliv, a jejich soužití je tedy neutrální povahy. Do přípravků s bioagens se pro vytvoření správných podmínek přidávají látky, které napomáhají k rozvoji symbiózy a také posilují vitalitu samotné rostliny (Bleša 2019).

3.3.2 Bioagens a patogen

V případě vztahu mezi bioagens a patogenem se zaměřujeme na symbiotické interakce, které poškodí minimálně jednoho z účastníků symbiotického soužití, v našem případě ideálně jen patogen. Prvním z těchto vztahů je parazitismus (Bleša 2019). V praxi parazitismus znamená, že jeden z přítomných druhů si přilepšuje na úkor druhému druhu (Lhotský 2015). Důležitým vztahem je také predace, kdy se jeden organismus (populace) stává zdrojem energie a výživy pro jiné organismy (populace). Z hojně se vyskytujících používaných typů interakcí mezi rostlinou a patogenem v rámci fytopatologie je antagonismus, což je vztah, kdy vznikají negativní důsledky u jednoho či obou zástupců (Bleša 2019). Příkladem antagonismu může být kompetice, která se zaměřuje na mezidruhovou interakci, kdy jsou postaveny druhy mezi sebe a konkurují si vzájemně o teritorium a potravu (Lhotský 2015), nebo tvorba antibiotik (Bleša 2019).

Mechanismy působení bioagens jsou různorodé. Jedním z nich je mykoparazitismus. V případě bioagens je relevantní hyper parazitismus (parazitické organismy napadají parazity rostlin). Řadíme mezi ně například hypoviry, fakultativní parazity, obligátní bakteriální

patogeny, i některé z predátorů. Často vzniká problém, když vlivem okolních podmínek dojde ke změně strategie parazitického vztahu, která může znehodnotit účinnost bioagens (Bleša 2019).

Dalším způsobem je antibiόza, což je inhibice patogenu za pomoci produkce antibiotických látek druhého organismu (Baker & Griffin 1995). Dle Bleši (2019) je známo množství organismů, které jsou schopny produkovat látky vykazující antibiotickou aktivitu. Mechanismus, jakým tyto antibiotické látky zasahují do životních funkcí daného organismu je často neznámý. Pro fytopatologii je však stěžejní jejich účinnost, která úzce souvisí se sensitivitou nežádoucích organismů. S antibiόzou úzce souvisí produkce sekundárních metabolitů, které mohou škodlivý organismus významně ovlivnit. Řadíme mezi ně látky, které také omezují výskyt a růst patogenu, typu rozkladu enzymů (lytické enzymy), které jsou schopny štěpit chitin, proteiny, polysacharidy a nukleové kyseliny, ale i sloučeniny jako je kyanovodík. Nápomocná může být již zmiňovaná kompetice. Bylo zjištěno, že nepatogenní organismy chrání rostlinu před vznikem infekce (Bleša 2019).

Poslední a nejvíce zkoumanou metodou ochrany rostlin ve fytopatologii je elicitace obranné reakce rostliny, tedy cílené zvýšení rezistence za pomoci bioagens. Jedním ze způsobů, jak toho docílit, je použít bioagens stimulující tvorbu vlastních proteinů schopných rozložit buňky patogenního organismu, navýšit rozměr buněčné stěny, anebo přímo vpravit látky do buněčné stěny, které zapříčiní smrt patogenu. Další způsob, jak donutit rostlinu bojovat proti infekci je takzvaná indukce systematické odolnosti pomocí bioagens. Příkladem takové indukce je jasmonová kyselina (Bleša 2019).

3.3.3 Aplikace bioagens

Metody aplikace bioagens jsou různé, především kvůli infekční strategii patogenu a podmínkám okolí. Jednou z forem aplikace je aplikace přímá. Bioagens se aplikuje na daný patogen či se zapravuje přímo do půdy určené k pěstování rostlin, pro které patogen představuje hrozbu. Další možností přímé aplikace je máčení semen rostliny ve směsích, které obsahují vhodné bioagens. Mezi další metody aplikace můžeme zařadit aplikaci za pomoci kompostovatelného materiálu. Bioagens není nutno zapravovat přímo do půdy, řadu prostředků s bioagens lze aplikovat na nadzemní části rostlin. Forma, v jaké se bioagens aplikují, závisí na životaschopnosti patogenu. Pro patogeny s vysokou životaschopností se volí granulované formy bioagens, pro patogeny, které jsou méně odolné, ale produkují vysokou tvorbu propagulí, obvykle volíme formu spreje či prášku. V závislosti na druhu patogenu se uvádí i frekvence

použití, bioagens můžeme aplikovat jednou, sezonně, opakovaně po určitém intervalu, nebo příležitostně (Bleša 2019).

3.3.4 Zástupci bioagens

Momentálně můžeme v prodeji najít široké spektrum přípravků k ošetření proti škodícím organismům. Výzkum a vývoj bioagens se nyní v rámci průmyslu dostává do popředí. Toho si všímají i velké firmy a snaží se rozšiřovat svou nabídku těchto produktů. Výhodou je, že velké firmy dosahují oproti těm menším rychlejší registrace produktů, a tak menší firmy přípravky z bioagens označují spíše jako rostlinné stimulatory růstu, aniž by zmínily jejich podpůrný účinek vůči patogenům. Všechny biopreparáty v ČR musí být zařazeny v registru pro ochranu rostlin vydaným Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem v zemědělství (Bleša 2019).

Hlavní přípravky jsou na bázi bakterií, a to převážně kmenů rodu *Lactococcus*, *Acetobacter*, *Bacillus cereus* a *Bacillus subtilis*. Další organismy mohou být kvasinky a houby z rodu *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Yarrowia*, *Penicillium*, *Clonostachys* a další (Bleša 2019). Přípravky, které inokulujeme přímo do půdy, obsahují nejčastěji organismy *Pseudomonas putida*, *Trichoderma spp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Burkholderia cepacia*, *Paenibacillus polymyxa*, výše zmíněné rody bakterií a *Pythium oligandrum* (Bleša 2019).

3.3.5 Bioagens a *Phytophthora cactorum*

Během posledních let byly provedeny různé studie, jak na patogen *Phytophthora cactorum* vyzrát. Pro náš výzkum jsme vybraly zástupce, jejichž efektivita napovídá možnému využití těchto bioagens v boji proti druhu *Phytophthora cactorum*. Následující podkapitoly popisují jednotlivé bioagens, které odkazují na výzkum, jenž nám byl nápomocný k výběru vhodného biologického přípravku.

3.3.5.1 *Bacillus amyloliquefaciens*

Bacillus amyloliquefaciens je grampozitivní půdní bakterie blízce příbuzná druhu *Bacillus subtilis*. Bakterie tvořící spory dle Li et al. (2015) mohou docílit toho, aby jeden z jejich proteinů byl fungicidní povahy a účinně inhiboval produkci konidií hub. Dále ve své studii Li et al. (2015) uvádí, že spory dobře odolávají nepříznivým podmínkám. Inhibiční

účinek této bakterie je založen na produkci antibiotik a sideroforů, například surfaktinu, iturinu a fengycinu.

Lee et al. (2015) zasvětil velkou část svého výzkumu druhu *Phytophthora cactorum*, který byl získán z korejského ženšenu (*Panax ginseng*). Na základě jejich studie (Lee et al. 2015) se domnívají, že rod *Bacillus amyloliquefaciens* může potlačit samostatné onemocnění rostliny. Z výsledků práce vyplývá, že tento kmen dokáže vyvolat rezistenci proti *P. cactorum* u ženšenu, při jednorázové aplikaci přímo do promáčené půdy až z 99,1% spolehlivostí a při dvojnásobné aplikaci v raných stádiích infekce dokazovaly 83,9% účinnost.

3.3.5.2 *Bacillus subtilis*

Grampozitivní bakterie *Bacillus subtilis* spadá mezi další organismy, které sporulují. *B. subtilis* byl zkoumán na základě jeho antibakteriálních, fungicidních a růst rostlin podporujících vlastností. Bylo dokázáno, že tento organismus je zdraví neškodný a jeho použití coby bioagens je tedy bez rizika. V Německu již existuje biostimulátor růstu rostlin, jehož hlavní bio složkou je právě *B. subtilis*, který se prodává pod označením FZB24 (Krebs et al. 1998).

Bacillus subtilis byl prokázán jako vhodný bioagens proti *P. cactorum* (Gupta & Utkhede 1987). Dle Utkhede & Smith (1991) mají kmeny AB8, BACT X, NZBI, AB7, AB8 a BACT 2 z *B. subtilis* zásluhu na snížení počtu infikovaných jabloňových stromů. Na základě zjištěné úrovně ochrany, kterou tito antagonisté vykazují v polních podmínkách u jabloní, se tedy můžeme domnívat, že *B. subtilis* je nadějným bioagens proti *P. cactorum*. Pro maximální funkci fungicidních látek vyprodukovaných bioagens je potřeba přidat N a P hnojiva do půdy (Gupta & Utkhede 1987).

3.3.5.3 *Clonostachys rosea*

Clonostachys rosea řadíme mezi půdní houby s mykoparazitickou povahou. Jsou schopny degradovat jiné fytopatogeny i jejich klidová stádia. Další výhodou je, že rozkládají organickou hmotu, zvyšují supresivitu půdy a pomáhají rostlinám odolávat jiným patogenům (Ondráčková 2019).

Clonostachys rosea je označován jako antagonista, který účinně reguluje *Botrytis cinerea* a šedou plíseň na jahodnicích. Výsledky několika studií dokazují, že tento typ bioagens je stejně účinný jako používání chemické obrany u jahodníku.

Clonostachys rosea ovlivňuje zmíněné patogeny převážně svou konkurenční schopností o živiny a substrát, zároveň snižuje schopnost sporulace, což následně vede k redukci inokula

produkovaného v úlomcích plodin. Důležitou se jeví také regulace účinnosti prostředku za pomoci UV záření. Vyšší podíl UV-B ve světelném spektru v místě, kde je prostředek aplikován, má za následek snížení efektivity prostředku založeného na vlastnostech *C. rosea*. Dle vysoké účinnosti ochrany pro jahodník lze uvažovat o *C. rosea* jako o dalším nadějném prostředku v boji proti patogenu rodu *Phytophthora* (Carbú et al. 2016).

3.3.5.4 *Trichoderma spp.*

Trichoderma spp. patří mezi nejvíce prozkoumané mykoparazitické houby. Charakteristickým mechanismem (ovinutím hyf patogenu a následnou penetrací) dokážou znemožnit jeho rozšíření a postupně jej zlikvidovat. Existuje velké množství studií dokazujících jejich schopnost biologické kontroly. Stále jsou však nedostatečné informace o přesném mechanismu antagonismu této houby (Carbú et al. 2016).

Smith et al. (1990) ve svém výzkumu použili rod *Trichoderma spp.* k ovlivnění před *P. cactorum*. Po 14 dnech růstu infikovaných rostlin a 72 hodinovém intervalu zaplevelení byl dokázán výsledek významným snížením poškození kořenů a zvýšením hmotnosti rostlin ve srovnání se sazenicemi infikovanými *P. cactorum* bez zaplevelení.

3.3.5.4.1 *Trichoderma asperellum*

Trichoderma asperellum patří mezi další houby, které jsou používány pro biologickou kontrolu. Typ jejich působení je nejčastěji antagonismus a mykoparazitismus (Segarra et al. 2013)

Segarra et al. (2013) ve své studii popisuje převážně působení kmenu T34. Kuzmanovska et al. (2018) řadí tento kmen jako bio kontrolní činidlo, které cílí převážně na půdní patogeny. Ve své práci objasňuje účinnost *Trichodermy asperellum* proti *Phytophthora drechsleri*, *Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora capsici* a *Fusarium oxysporum*. Další studie zaměřená na *T. asperellum* potvrdila schopnost tohoto kmene bránit rostliny proti napadení okurek patogenem *Rhizoctonia solani*. Zmíněná studie také poukázala na významné snížení výskytu onemocnění způsobené *Pseudomonas syringae*, *lachrymans* u okurek (Segarra et al. 2013). Mbarga et al. (2012) ve své práci popisuje inhibici růstu *Pythium myriotylum* o více než 60 % u kokosu v Kamerunu.

3.3.5.4.2 *Trichoderma harzanium*

Ve výběru u rodu *Trichoderma* schopné biologické kontroly před patogeny při produkci plodů jahodníku uspěl hlavně druh *Trichoderma harzanium* (Carbú et al. 2016). Jeho hybridní

kmen T-22 byl vyvinut tak, aby zlepšil celkovou odolnost vůči chorobám, toleranci prostředí a symbiotickou interakci s napadenou rostlinou. Díky těmto vlastnostem se řadí mezi jedny z neprodávanějších produktů na trhu. Spadá do kategorie hub, které jsou účinné na bázi antagonismu a mykoparazitismu (Concklin 2012).

Prvním registrovaným přípravkem byl kmen T-39, u kterého byla prokázána účinnost proti *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Cladosporium fluvum* a *Celletotrichum acutatum* (Carbú et al. 2016). Freeman et al. (2004) v rámci svého výzkumu zjistil, že *Trichoderma harzanium* je účinný bioagens v jakékoli koncentraci a míře opakované aplikace proti antraknóзовé chorobě jahodníku. Naopak při kontrole šedé hniloby jahod je pro ideální účinnost houby zapotřebí dodržovat přesné postupy aplikace. Concklin (2012) ve své práci doporučuje, že je tato houba užitečná pro potírání běžných chorob ve smyslu omezení růstu a šíření chorob, které jsou přenášeny půdou (například *Fusarium*, *Pythium* a *Rhizoctonia*).

3.3.5.5 *Clonostachys* spp. a *Trichoderma* Spp.

Oba z výše uvedených druhů bioagens spadají mezi saprotrofické půdní houby s mykoparazitickým a antagonistickým účinkem proti jiným patogenům. Kombinace těchto dvou rodů je v některých případech ochrany rostlin efektivnější než použití jednoho z druhů samostatně, ale zatím není objasněno proč. Zdroje se domnívají, že vliv na efektivitu těchto hub mohou mít symbiotické vztahy s dalšími organismy (Ondráčková et al. 2013). Jelikož víme, že jednotlivé rody pozitivně ovlivňují rostliny jahodníku, lze soudit, že kombinace zmíněných rodů může mít taktéž podpůrný efekt, ne-li vyšší.

3.3.5.6 *Coniothyrium minitans*

Coniothyrium minitans spadá mezi coelomycety (konidiální houby) známé po celém světě. Jeho formy dokážou infikovat patogenní houby z *ascomycetes*, ale ne formy *basidiomycetes*. Veřejnosti je *Coniothyrium minitans* známo jako nejčastěji používaná bioagens proti *Sclerotinia sclerotiorum*. *C. minitans* používá nejčastěji mykoparazitismus v boji s patogenem. Další způsoby, které houba používá k ovlivnění patogenu, je antagonismus a antibióza. (Whipps & Gerlagh 1992).

Při zkoumání inhibice *C. minitans* se podařilo dokázat inhibice *S. sclerotiorum* a *S. cepivorum* až se 76% spolehlivostí. Inhibice byla značná také na rostlinných patogenech *Phytophthora nicotianae* a *Pythium ultimum* (Tomprefa et al. 2009), které jsou svou stavbou velmi podobné zkoumané *P. cactorum*.

3.3.5.7 *Pseudomonas spp.*

Pseudomonas spp. spadá mezi aerobní, chemoheterotrofní, gramnegativní bakterie ve tvaru tyčinky. Je známo, že druhy *P. fluorescens*, *P. putida* a *P. aeruginosa* jsou prospěšné pro růst rostlin a omezují šíření chorob způsobené jinými organismy. Počet kmenů, které mají takto pozitivní účinky neustále přibývá. Ochrana, kterou tyto bakterie poskytují spočívá ve tvorbě biofilmu, kterým pokryjí rostlinu a zabrání tak nežádoucí vniknutí škodlivých organismů. Další mechanismus je antibiόza a produkce sekundárních metabolitů (toxinů). Komplexní použití těchto kmenů prospěšně ovlivňuje rostliny převážně v kořenovém prostředí (Siddiqui & Khan 2017).

Berg et al. (2000) uvádějí, že použití bioagens rodů *Pseudomonas spp.* ve sklenicích i terénních podmínkách napomohlo zvýšení produkce jahod a potlačení patogenu *Verticillium*. Toto ošetření zapříčinilo až o 344 % vyšší výtěžek oproti kontrolním sadbám bez ošetření.

Zohara et al. (2016) ve svých pracích uvádí, že při ošetření semen *Pseudomonas spp.* u okurek se zvýší odolnost vůči *Phytophthora capsici*.

Agusti et al. (2011) prokázali účinnost *Pseudomonas fluorescens* proti *P. cactorum* za pomoci bioaktivních metabolitů bakterie. Interakcí těchto dvou druhů se zjistilo, že *P. fluorescens* inhibuje klíčení cyst *P. cactorum* na povrchu kořene jahod. Při skleníkových metodách navíc dokázali, že směs různých kmenů *Pseudomonas* výrazně snižuje závažnost fytoftorové hniloby jahodníku.

3.3.5.8 *Pythium oligandrum*

Pythium oligandrum řadíme do řádu *oomycetes*. Patří mezi mykoparazity, které jsou schopny působit i na organismech stejného řádu z jakého sami pochází. Jejich hlavní strategií je antagonismus. Nepoužívají antibiόzu, což zabraňuje možnému vzniku rezistence před tímto bioagens. Vyskytuje se na povrchu kořene společně s rostlinnými patogeny, kde využívá kořenové exsudáty a houby hyf ke své potřebě růstu (Brožová 2002). U *P. oligandrum* byla po delším zkoumání prokázána vysoká odolnost vůči nevhodným vnějším podmínkám, kterou prezentuje přežití velkého množství antagonistických oomycet v půdě během vegetační doby (duben–září). Výsledky studie prokázaly významné zmenšení populace známého patogenu rajčat *Pythium dissotocum* (Vallance et al. 2009).

Použití *P. oligandrum* ve svém výzkumu na vývoj hniloby patogenem *Phytophthora cactorum* u gerber, cypřišů a tisu zkoumal Orlikowski (2001). Výsledkem pokusů v rámci výzkumu Orlikowského (2001) bylo snížení počtu patogenů pomocí *P. oligandrum*, které

tvořily konidie během 4 týdnů. Pokud bylo *P. oligandrum* aplikováno přímo po výsadbě do zamokřené rašeliny, tak se efekt potlačení rodu *Phytophthora* se ještě zvýšil.

Do prozatímního výzkumu je druh *Pythium oligandrum* řazen mezi neúčinnější prostředky pro ochranu jahodníku v České republice (Brožová 2002).

4 Materiál a metody

4.1 Úvodní charakteristika

Pro mou práci byly využity prostory České zemědělské univerzity na fakultě Agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, přesněji na katedře ochrany rostlin. V laboratoři byly dodrženy podmínky určené pro správný a průběh výzkumu. Také byla dodržena hygiena práce v laboratoři a pravidla pro práci v mikrobiologické laboratoři. Princip výzkumu byl prováděn *in vitro* testováním princip inhibice růstu na médiu V8 v Petriho miskách.

4.2 Příprava živného média

Pro správnou kultivaci a dodržení výhodných podmínek pro růst bioagens i *P. cactorum* byly pokusy prováděny za použití pevného média (agar) V8.

Pomůcky, které byly využity pro zadělání agaru jsou:

Odměrný válec o objemu 1000 ml, plastová lžička, váženka, kádinka o objemu minimálně 1000 ml, centrifugační zkumavky 50 ml, Erlenmayerovy baňky o objemu 500 ml, alobal, Petriho misky, parafilm

Přístroje:

Digitální váha, magnetická míchačka a míchadlo, centrifuga, autokláv, flow box

Materiál:

V8 džus, CaCO₃, živný agar, destilovaná voda

Postup:

Na přípravu media V8 jsme se řídili předepsaným postupem, který doporučuje dávkování, kdy na 100 ml V8 džusu připadá 1 g CaCO₃. Směs těchto dvou přísad ve velké kádince byla umístěna na magnetickou míchačku a dovnitř bylo uloženo magnetické míchadlo. Aby se uhličitán vápenatý úplně rozpustil, bylo potřeba míchat minimálně 15 minut. Po rozmíchání se

směs přelila do 50 ml falkon (centrifugační zkumavky) a nechala se 10 minut centrifugovat na 4000 RPM. Po ukončení centrifugace se přelila kapalina do odměrného válce a zbylý sediment se odstranil. Z pravidelného opakování jsme zjistili, že z 50 ml směsi bylo možno použít pouze 42 ml a 8 ml bylo zanecháno v sedimentu.

K dalšímu postupu jsme použili 500 ml Erlenmayerovy baňky, do kterých bylo naváženo 4,5 g živného agaru na 60 ml již získané suspenze. Krouživým pohybem baňky se látky promíchaly a následně se doplnily 240 ml destilovanou vodou. Vzniklá 300 ml suspenze byla znovu zamíchána. Následně byla Erlenmayerova baňka uzavřena alobalem, aby nevznikla případná kontaminace média. Takto uzavřená baňka bylo uložena do autoklávu a nechala se autoklávkovat při 121 °C po dobu 30 minut.

Po dokončení sterilizace byla baňka přesunuta do flow boxu, kde se roztok rozlil po objemu 15–20 ml do Petriho misek. Pro ztuhnutí media je zapotřebí minimálně 3 hodin a zpracovat jej lze do konce následujícího dne. Pokud medium nepoužijeme, tak je nutno jej opatřit parafilmem a vhodně jej označit k pozdějšímu užití.

4.3 Vzorky *P. cactorum* z území ČR

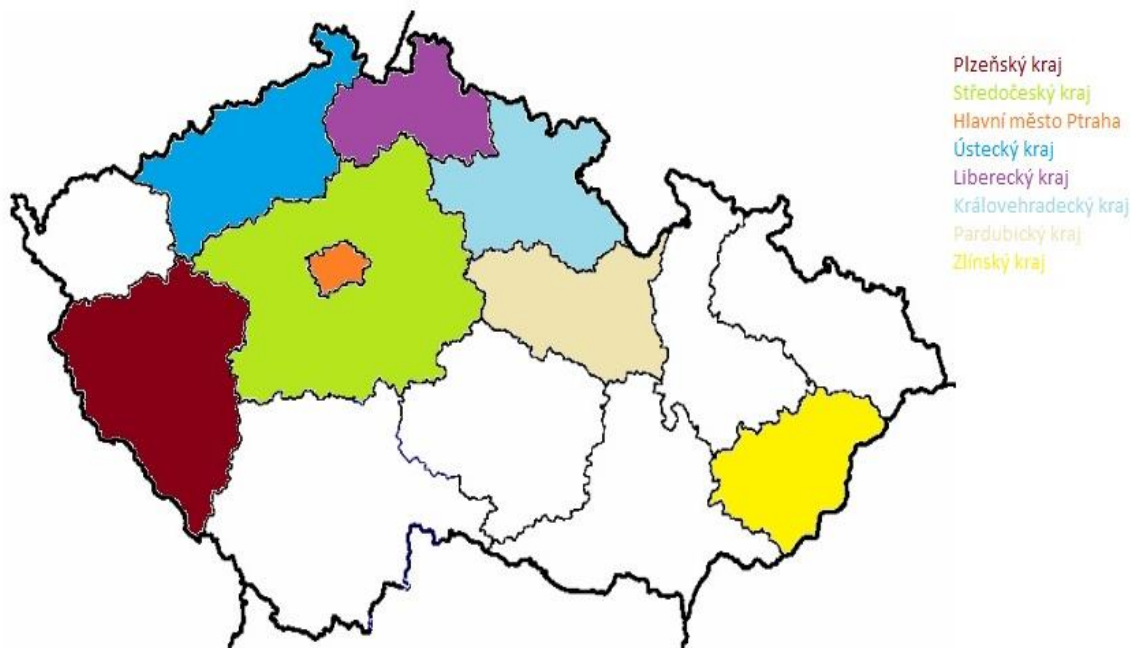
Odběr vzorků byl proveden v prostředí, kde je známo pravidelné pěstování jahod po dobu minimálně deseti let. Z těchto pozemků byly odebráno 10 vzorků v množství odpovídajícímu rozloze území (200 g na 0,1 ha). Za pomoci kultivační lopatky byly odebrány vzorky z hloubky 15 cm, který představoval reprezentativní vzorek. Následně byla vytvořena velká směs z daných lokalit, která byla sušena 21 dní. Byla dodržena opatření zamezující potenciální kontaminaci mezi lokalitami. K odběru půdních vzorků bylo odebráno i 10 rostlin na 0,1 ha, které svým vzhledem napovídaly napadení *P. cactorum*.

Vzorky byly odebrány v celé České republice viz obrázek č. 5, skrze anonymitu producentů jahod byly označeny pouze kraje odkud byly vzorky odebrány.

K vytvoření izolátu z půdy bylo využito metody tzv. leaf bait. Označení určuje použití hostitelských rostlin a odebrání *P. cactorum* z nich. Získání izolátu bylo provedeno kolegy z VÚRV, kdy pro mé stanovení stačilo pouze namnožení *P. cactorum* na kultivačním mediu V8 v dostatečném množství.

Skrze obsáhlost výzkumu byla potřeba vzorky průběžně přeočkovávat na nové misky s mediem a zajistit jejich vitalitu, která byla potřebná ke správnému stanovení inhibice patogenu bioagens. Přeočkování preparátů bylo provedeno z dosavadních izolátů vždy po posouzení jejich stavu v 10 opakováních. Očkovalo se vždy ve flow boxu, ve sterilních podmínkách a na

stejném kultivačním médiu V8 (za pomoci korkovrtu a skalpelu). Nové vzorky byly uzavřeny v Petriho miskách, zaizolovány parafilmem a uloženy k dalšímu užití.



Obr. č. 5: Mapa původu vzorků *P. cactorum* (Hanáček 2021)

4.4 Test účinku bioagens na růst *P. cactorum*

K celkovému testování byly zapotřebí sterilní podmínky s regulovanou teplotou. K posouzení vlivu na růst *P. cactorum* jsme hodnotili inhibiční účinek jednotlivých bioagens, které byly dostupné z komerčních přípravků v zemědělství.

Pomůcky:

Skalpel, korkovrt, Petriho misky, parafilm, posuvné měřítko

Přístroje:

Flow box, plynový kahan, počítač (software Statistika 11.0, Microsoft excel, Word)

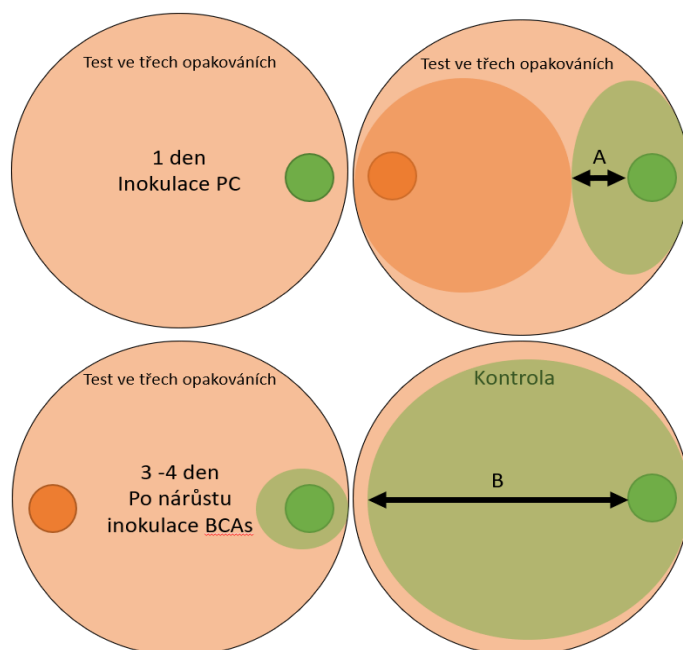
Materiál:

V8 medium, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Clonostachys rosea*, *Clonostachys spp.* a *Trichoderma spp.*, *Trichoderma asperellellum*, *Trichoderma harzanium*, *Coniothyrium minitans*, *Pseudomonas spp.*, *Pythium oligandrum*, *Phytophthora cactorum* (viz Tabulka 1).

Postup:

Jako první byly připraveny izoláty z různých lokalit do flow boxu. Z každé lokality byly přeočkovány vzorky v 15 opakováních do nových Petriho misek, které obsahovaly V8 medium. Deset izolátů bylo připraveno na inhibici s bioagens a 5 z nich bylo užito jako kontrolní vzorky. Přeočkování bylo provedeno otevřením zachovalých vzorků, ohněm ošetřeným korkovrtem bylo navrtáno 15 oček a sterilním skalpelem precizně přeneseno na okraj Petriho misky viz obrázek č. 6. Izolát byl šetrně uzavřen parafilmem v Petriho misce, aby nedošlo k předčasné kontaminaci celého média a popsán kódem a datem očkovaní. Preparát byl poté uložen po dobu tří dnů v laboratorních podmínkách za účelem rozmnožení *P. cactorum*. Určená doba tří dnů byla stanovena podle prvních příznaků nákazy na rostlině. Po 3 dnech bylo 10 preparátů znovu přeneseno do flowboxu a 5 izolátů zůstalo zachováno k dalšímu růstu.

Preparáty ve flowboxu byly otevřeny a připraveny k infekci bioagens. Vzorky bioagens byly naočkovány stejným způsobem jako *P. cactorum* a vloženy k protější straně jako na obrázku č. 6. V případě použití bakteriálních bioagens, byla bakteriální kultura přenesena pomocí mikrobiologického laboratorního očka, kterým se natřela bioagens dvěma tahy na protilehlou stranu. Následně bylo všechno opatřeno izolací ve formě parafilmu a na Petriho misku bylo připsáno označení a datum očkovaní bioagens. Po dalších třech dnech byly okometricky vyhodnoceny vzorky ke stanovení inhibice. Ta se prováděla posuvným měřítkem a stanovením přesné velikosti narostlé kultury *P. cactorum*. Tato hodnota, dále označovaná jako hodnota růstu *P. cactorum*, byla zaznamenána do tabulky a porovnána s hodnotami růstu kontroly, která byla změřena ve stejný den. Pomocí statistického programu Statistika 11.0, byly vyhodnoceny výsledky.



Obr. č. 6: Test účinku inhibice biological agents (BCAs)

Tabulka č. 1: Lokality sběru izolátů *P. cactorum* a jejich příslušné označení pro identifikaci

Lokalita	Označení
Zlínský kraj	vzorek č. 1
Hlavní město Praha	vzorek č. 2
Pardubický kraj	vzorek č. 3
Středočeský kraj	vzorek č. 4
Královehradecký kraj	vzorek č. 5
Plzeňský kraj	vzorek č. 6
Liberecký kraj	vzorek č. 7
Ústecký kraj	vzorek č. 8
Plzeňský kraj	vzorek č. 9
Ústecký kraj	vzorek č. 10

Tabulka č. 2: Zkratky pro bioagens ve výzkumu

Označení ve výzkumu	Bioagens (BCAs)
A	<i>Clonostachys spp. a Trichoderma spp.</i>
B	<i>Clonostachys rosea</i>
C	<i>Trichoderma Asperelum</i>
D	<i>Trichoderma Harzanium</i>
E	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
F	<i>Pseudomonas spp.</i>
G	<i>Bacillus subtilis</i>
H	<i>Pythium oligandrum</i>
I	<i>Coniothyrium minitans</i>

5 Výsledky

5.1 Izoláty z České republiky

Ke zkoumání účinnosti bioagens bylo použito 10 izolátů (Tab. 1) z celé České republiky. Každý zemědělec používá jiné odrůdy a jiné praktiky ve výsadbě rostlin, navíc každá z lokalit dominuje jinými podmínkami. Tyto důvody by mohly mít vysoký podíl na změny růstu jahodníku a interakce patogenu s rostlinami.

5.2 Živné médium

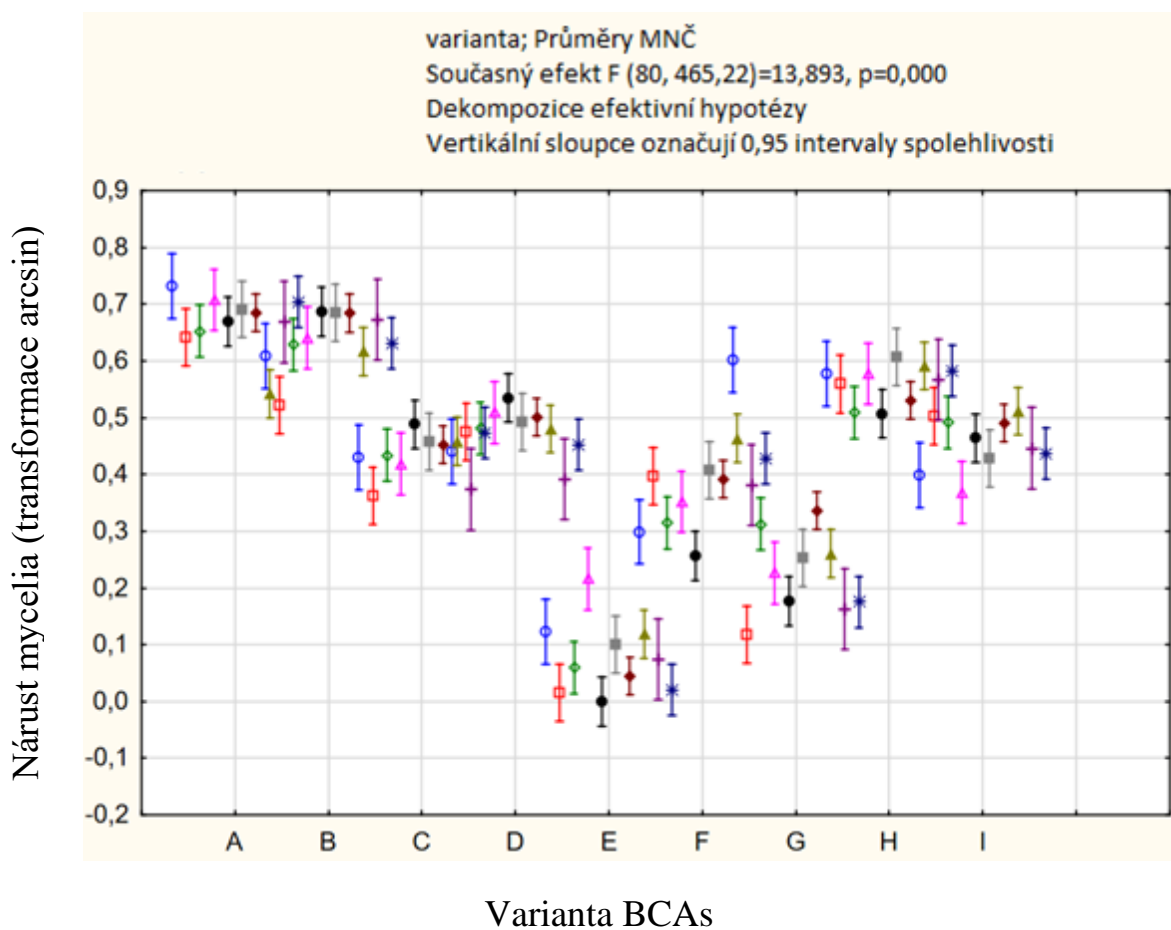
Živné médium bylo použito kvůli výhodnému růstu *P. cactorum* a následné výhodě k porovnání výsledků. Tento krok mohl způsobit narušit optimální podmínky pro konfrontaci s bioagens, jelikož u některých z testovaných bioagens se vyskytly problémy s růstem v přípravných izolátech.

5.3 Účinek bioagens na *P. cactorum*


Pro testování bioagens bylo použito 10 izolátů *P. cactorum* z různých lokalit, k nim bylo inokulováno 9 odlišných druhů bioagens. Testování bylo provedeno *in vitro*. Účelem testování bylo zjistit, zda bioagens inhibují růst patogenu *P. cactorum* za sterilních podmínek a optimálních teplot. Kvůli měření v odlišných dnech byla provedena úprava naměřených dat za pomoci funkce arcsin a následně takto přeměněná data byla použita ve statistickém programu Statistika 11.0.

Schopnost inhibice růstu patogenu byla dokázána u všech z použitých bioagens, přičemž výrazně dominovaly prostředky s organismy *Clonostachys spp.* a *Trichoderma Spp.* (**A**), *Pythium oligandrum* (**H**) a *Clonostachys rosea* (**B**), u kterých byla dle zpracovaných dat dokázána vyšší účinnost oproti ostatním bioagens.

Graf č. 1: Boxplot – vliv bioagens na růst *P. cactorum* mezi všemi lokalitami



Tabulka č. 3: Legenda grafu č. 1

Označení v grafu	Výzkumné značení
 1	1 vzorek
 2	2 vzorek
 3	3 vzorek
 4	4 vzorek
 5	5 vzorek
 6	6 vzorek
 7	7 vzorek
 8	8 vzorek
 9	9 vzorek
 10	10 vzorek

5.3.1 Výsledná měření Tukeyovým HSD testem

Tabulka č. 4: Tukeyův HSD test statisticky významných rozdílů mezi bioagens a 1. vzorku

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná nárůstu mycelia vzorku 1 (arcsin transformace). Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: mezi skupinami PČ = ,00820, sv = 81,000									
	Varianta BCAs	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}
		,73198	,60872	,43046	,44075	,12237	,29903	,60199	,57762	,39845
1	A		0,072967	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132	0,047110	0,007904	0,000132
2	B	0,072967		0,001137	0,002636	0,000132	0,000132	1,000000	0,997473	0,000175
3	C	0,000132	0,001137		0,999999	0,000132	0,042768	0,001972	0,013784	0,996901
4	D	0,000132	0,002636	0,999999		0,000132	0,020705	0,004557	0,029340	0,980145
5	E	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132		0,001298	0,000132	0,000132	0,000132
6	F	0,000132	0,000132	0,042768	0,020705	0,001298		0,000132	0,000132	0,269805
7	G	0,047110	1,000000	0,001972	0,004557	0,000132	0,000132		0,999588	0,000218
8	H	0,007904	0,997473	0,013784	0,029340	0,000132	0,000132	0,999588		0,001058
9	I	0,000132	0,000175	0,996901	0,980145	0,000132	0,269805	0,000218	0,001058	

Vzorek č. 1 byl odebrán ze Zlínského kraje, u tohoto vzorku bylo možné k vidění vyšší účinnosti inhibice růstu *P. cactorum* všemi bioagens než u jiných lokalit. Mezi nejvíce účinné se prokázaly prostředky s organismy *Clonostachys spp.* a *Trichoderma Spp.* (A), *Clonostachys rosea* (B), *Bacillus subtilis* (G) a *Pythium oligandrum* (H). Naopak *Bacillus amyloliquefaciens* (E) a *Pseudomonas spp.* (F) v inhibici růstu patogenu zastával za ostatními.

Tabulka č. 5: Tukeyův HSD test statisticky významných rozdílů mezi bioagens a 2. vzorku

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná nárůstu mycelia vzorku 2 (arcsin transformace). Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: mezi skupinami PČ = ,00642, sv = 81,000									
	Varianta BCAs	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}
		,64221	,52167	,36191	,47444	,01555	,39673	,11820	,55927	,50361
1	A		0,030738	0,000132	0,000477	0,000132	0,000132	0,000132	0,346137	0,006604
2	B	0,030738		0,000951	0,923118	0,000132	0,021536	0,000132	0,979619	0,999890
3	C	0,000132	0,000951		0,056821	0,000132	0,987464	0,000132	0,000143	0,004986
4	D	0,000477	0,923118	0,056821		0,000132	0,436102	0,000132	0,316273	0,996192
5	E	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132		0,000132	0,113331	0,000132	0,000132
6	F	0,000132	0,021536	0,987464	0,436102	0,000132		0,000132	0,000737	0,085212
7	G	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132	0,113331	0,000132		0,000132	0,000132
8	H	0,346137	0,979619	0,000143	0,316273	0,000132	0,000737	0,000132		0,826681
9	I	0,006604	0,999890	0,004986	0,996192	0,000132	0,085212	0,000132	0,826681	

U vzorku č. 2 odebírán z hlavního města v Praze, lze taktéž zdůraznit účinnost všech bioagens, ve které se mezi nejlépe působí proti patogenu projevily organismy *Clonostachys spp. a Trichoderma Spp.* (A), *Clonostachys rosea* (B) a *Pythium oligandrum* (H). Nově se objevila vyšší účinnost *Coniothyrium minitans* (I), mezi méně účinné v této lokalitě se projevil znovu *Bacillus amyloliquefaciens* (E), ale i další z bakterií, a to *Bacillus subtilis* (G).

Tabulka č. 6: Tukeyův HSD test statisticky významných rozdílů mezi bioagens a 3. vzorku

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná nárustu mycelia vzorku 3 (arcsin transformace). Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: mezi skupinami PČ = ,00536, sv = 81,000									
	Varianta BCAs	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}
1	A	,65225	,62921	,43387	,48131	,05986	,31473	,31233	,50953	,49201
2	B		0,998655	0,000132	0,000170	0,000132	0,000132	0,000132	0,001307	0,000279
3	C	0,998655		0,000133	0,000776	0,000132	0,000132	0,000132	0,012872	0,002281
4	D	0,000132	0,000133		0,874855	0,000132	0,013540	0,010781	0,347733	0,697262
5	E	0,000170	0,000776	0,874855		0,000132	0,000198	0,000181	0,994338	0,999996
6	F	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132		0,000132	0,000132	0,000132	0,000132
7	G	0,000132	0,000132	0,013540	0,000198	0,000132		1,000000	0,000133	0,000148
8	H	0,000132	0,000132	0,010781	0,000181	0,000132	1,000000		0,000133	0,000144
9	I	0,001307	0,012872	0,347733	0,994338	0,000132	0,000133	0,000133		0,999827
		0,000279	0,002281	0,697262	0,999996	0,000132	0,000148	0,000144	0,999827	

Vzorek č. 3 z Pardubického kraje, také nadále ukazuje účinnost inhibice patogenu všemi použitými bioagens. Nejvyšší schopnost inhibovat *P. cactorum* dosáhly bioagens *Clonostachys spp. a Trichoderma Spp.* (A), *Clonostachys rosea* (B) a *Pythium oligandrum* (H), nejhůře znovu *Bacillus amyloliquefaciens* (E).

Tabulka č. 7: Tukeyův HSD test statisticky významných rozdílů mezi bioagens a 4. vzorku

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná nárustu mycelia vzorku 4 (arcsin transformace). Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: mezi skupinami PČ = ,00751, sv = 81,000									
	Varianta BCAs	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}
1	A	,70761	,64021	,41830	,50934	,21616	,35208	,22647	,57746	,36806
2	B		0,720500	0,000132	0,000191	0,000132	0,000132	0,000132	0,031105	0,000132
3	C	0,720500		0,000136	0,029494	0,000132	0,000132	0,000132	0,791420	0,000132
4	D	0,000132	0,000136		0,325969	0,000170	0,739227	0,000249	0,003005	0,929524
5	E	0,000191	0,029494	0,325969		0,000132	0,003533	0,000132	0,708788	0,013264
6	F	0,000132	0,000132	0,000170	0,000132		0,020173	0,999999	0,000132	0,005553
7	G	0,000132	0,000132	0,739227	0,003533	0,020173		0,043151	0,000135	0,999976
8	H	0,000132	0,000132	0,000249	0,000132	0,999999	0,043151		0,000132	0,012947
9	I	0,031105	0,791420	0,003005	0,708788	0,000132	0,000135	0,000132		0,000149
		0,000132	0,000132	0,929524	0,013264	0,005553	0,999976	0,012947	0,000149	

Ze Středočeského kraje se odebral vzorek č. 4, na který byly neúčinnější v inhibici růstu patogenu bioagens *Clonostachys spp. a Trichoderma Spp.* (A), *Clonostachys rosea* (B) a *Pythium oligandrum* (H). Vysokou schopnost omezit růst *P. cactorum* prokazoval i bioagen *Trichoderma Harzanium* (D), nejméně účinné v inhibici růstu patogenu se zde stále objevují bakteriální rody *Bacillus amyloliquefaciens* (E) a *Bacillus subtilis* (G).

Tabulka č. 8: Tukeyův HSD test statisticky významných rozdílů mezi bioagens a 5. vzorku

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná nárůstu mycelia vzorku 5 (arcsin transformace). Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: mezi skupinami PČ = ,00465, sv = 81,000									
	Varianta BCAs	{1} ,66936	{2} ,68670	{3} ,48826	{4} ,53481	{5} 0,0000	{6} ,25667	{7} ,17686	{8} ,50728	{9} ,46400
1	A		0,999728	0,000134	0,001097	0,000132	0,000132	0,000132	0,000157	0,000132
2	B	0,999728		0,000132	0,000235	0,000132	0,000132	0,000132	0,000134	0,000132
3	C	0,000134	0,000132		0,839740	0,000132	0,000132	0,000132	0,999463	0,996757
4	D	0,001097	0,000235	0,839740		0,000132	0,000132	0,000132	0,992262	0,341566
5	E	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132		0,000132	0,000135	0,000132	0,000132
6	F	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132		0,195787	0,000132	0,000132
7	G	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132	0,000135	0,195787		0,000132	0,000132
8	H	0,000157	0,000134	0,999463	0,992262	0,000132	0,000132	0,000132		0,887205
9	I	0,000132	0,000132	0,996757	0,341566	0,000132	0,000132	0,000132	0,887205	

Vzorek č. 5 ze stanoviště z Královehradeckého kraje ukazuje velmi dobrou účinnost inhibice růstu patogenu všech z bioagens, kdy mezi předními byly *Clonostachys spp. a Trichoderma Spp.* (A), *Clonostachys rosea* (B), *Trichoderma asperelum* (C), *Trichoderma Harzanium* (D) a *Pythium oligandrum* (H) a méně účinné byly opět bakteriálního zastoupení *Bacillus amyloliquefaciens* (E) a *Bacillus subtilis* (G).

Tabulka č. 9: Tukeyův HSD test statisticky významných rozdílů mezi bioagens a 6. vzorku

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná nárustu mycelia vzorku 6 (arcsin transformace). Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: mezi skupinami PČ = ,00634, sv = 81,000									
	Varianta BCAs	{1} ,69093	{2} ,68521	{3} ,45824	{4} ,49318	{5} ,10021	{6} ,40804	{7} ,25247	{8} ,60668	{9} ,42763
1	A		1,000000	0,000132	0,000141	0,000132	0,000132	0,000132	0,317007	0,000132
2	B	1,000000		0,000132	0,000150	0,000132	0,000132	0,000132	0,412597	0,000132
3	C	0,000132	0,000132		0,986660	0,000132	0,891054	0,000135	0,002464	0,994471
4	D	0,000141	0,000150	0,986660		0,000132	0,303345	0,000132	0,050100	0,655531
5	E	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132		0,000132	0,001730	0,000132	0,000132
6	F	0,000132	0,000132	0,891054	0,303345	0,000132		0,001274	0,000140	0,999788
7	G	0,000132	0,000132	0,000135	0,000132	0,001730	0,001274		0,000132	0,000266
8	H	0,317007	0,412597	0,002464	0,050100	0,000132	0,000140	0,000132		0,000218
9	I	0,000132	0,000132	0,994471	0,655531	0,000132	0,999788	0,000266	0,000218	

Vzorek č. 6 z Plzeňského kraje také potvrzuje pozitivní působení všech bioagens na regulaci růstu *P. cactorum*. Nejvýraznější z nich byly *Clonostachys spp.* a *Trichoderma Spp.* (**A**), *Clonostachys rosea* (**B**), *Trichoderma asperelum* (**C**), *Trichoderma Harzanium* (**D**), *Pythium oligandrum* (**H**) a menší inhibici růstu proti známému patogenu byla bioagens *Bacillus amyloliquefaciens* (**E**) a *Bacillus subtilis* (**G**).

Tabulka č. 10: Tukeyův HSD test statisticky významných rozdílů mezi bioagens a 7. vzorku

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná nárustu mycelia vzorku 7 (arcsin transformace). Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: mezi skupinami PČ = ,00277, sv = 81,000									
	Varianta BCAs	{1} ,68440	{2} ,68421	{3} ,45220	{4} ,50061	{5} ,04493	{6} ,39186	{7} ,33590	{8} ,53022	{9} ,49107
1	A		1,000000	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132
2	B	1,000000		0,000132	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132
3	C	0,000132	0,000132		0,508950	0,000132	0,217970	0,000253	0,035092	0,772919
4	D	0,000132	0,000132	0,508950		0,000132	0,000565	0,000132	0,940144	0,999979
5	E	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132		0,000132	0,000132	0,000132	0,000132
6	F	0,000132	0,000132	0,217970	0,000565	0,000132		0,309662	0,000134	0,002094
7	G	0,000132	0,000132	0,000253	0,000132	0,000132	0,309662		0,000132	0,000132
8	H	0,000132	0,000132	0,035092	0,940144	0,000132	0,000134	0,000132		0,766012
9	I	0,000132	0,000132	0,772919	0,999979	0,000132	0,002094	0,000132	0,766012	

Z Libereckého kraje byl z pozemku odebrán vzorek č. 7. Na *P. cactorum* z této oblasti nejvíce fungovaly bioagens *Clonostachys spp.* a *Trichoderma Spp.* (**A**), *Clonostachys rosea*

(B), *Trichoderma asperelum* (C), *Trichoderma Harzanium* (D), *Pythium oligandrum* (H), ale i *Coniothyrium minitans* (I) působilo značně výrazně. Hůře zabraňovaly růstu *P. cactorum* bioagens z *Bacillus amyloliquefaciens* (E).

Tabulka č. 11: Tukeyův HSD test statisticky významných rozdílů mezi bioagens a 8. vzorku

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná nárustu mycelia vzorku 8 (arcsin transformace). Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: mezi skupinami PČ = ,00447, sv = 81,000									
	Varianta BCAs	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}
1	A	,54197	,61679	,45848	,48023	,11878	,46354	,26086	,59110	,51193
2	B	0,246598		0,000160	0,000668	0,000132	0,000189	0,000132	0,994474	0,020249
3	C	0,133906	0,000160		0,998303	0,000132	1,000000	0,000132	0,001022	0,690153
4	D	0,504150	0,000668	0,998303		0,000132	0,999764	0,000132	0,010966	0,978231
5	E	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132		0,000132	0,000394	0,000132	0,000132
6	F	0,193716	0,000189	1,000000	0,999764	0,000132		0,000132	0,001786	0,792190
7	G	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132	0,000394	0,000132		0,000132	0,000132
8	H	0,778296	0,994474	0,001022	0,010966	0,000132	0,001786	0,000132		0,183875
9	I	0,984468	0,020249	0,690153	0,978231	0,000132	0,792190	0,000132	0,183875	

Vzorek č. 8 byl použit z Ústeckého kraje. Významná inhibice růstu *P. cactorum* byla způsobená bioagens *Clonostachys spp. a Trichoderma spp.* (A), *Clonostachys rosea* (B), *Pythium oligandrum* (H) a *Coniothyrium minitans* (I). Méně se osvědčily *Bacillus amyloliquefaciens* (E) a *Bacillus subtilis* (G).

Tabulka č. 12: Tukeyův HSD test statisticky významných rozdílů mezi bioagens a 9. vzorku

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná nárustu mycelia vzorku 9 (arcsin transformace). Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: mezi skupinami PČ = ,01287, sv = 81,000									
	Varianta BCAs	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}
1	A	,66881	,67336	,37356	,39156	,07435	,38085	,16233	,56663	,44648
2	B	1,000000		0,000134	0,000141	0,000132	0,000135	0,000132	0,478353	0,000911
3	C	0,000135	0,000134		0,999993	0,000134	1,000000	0,002505	0,008065	0,879950
4	D	0,000145	0,000141	0,999993		0,000132	1,000000	0,000778	0,023931	0,975262
5	E	0,000132	0,000132	0,000134	0,000132		0,000133	0,724105	0,000132	0,000132
6	F	0,000137	0,000135	1,000000	1,000000	0,000133		0,001556	0,012664	0,930504
7	G	0,000132	0,000132	0,002505	0,000778	0,724105	0,001556		0,000132	0,000139
8	H	0,538626	0,478353	0,008065	0,023931	0,000132	0,012664	0,000132		0,315797
9	I	0,001219	0,000911	0,879950	0,975262	0,000132	0,930504	0,000139	0,315797	

Z Plzeňského kraje byl použit vzorek č. 9, který nejlépe omezovaly v růstu bioagens *Clonostachys spp. a Trichoderma Spp.* (A), *Clonostachys rosea* (B) a *Pythium oligandrum* (H), naopak ostatní bioagens nebyly tak účinné. Rody bakterií *Bacillus amyloliquefaciens* (E) a *Bacillus subtilis* (G) opět vyšly, jako nejméně účinné v inhibici patogenu.

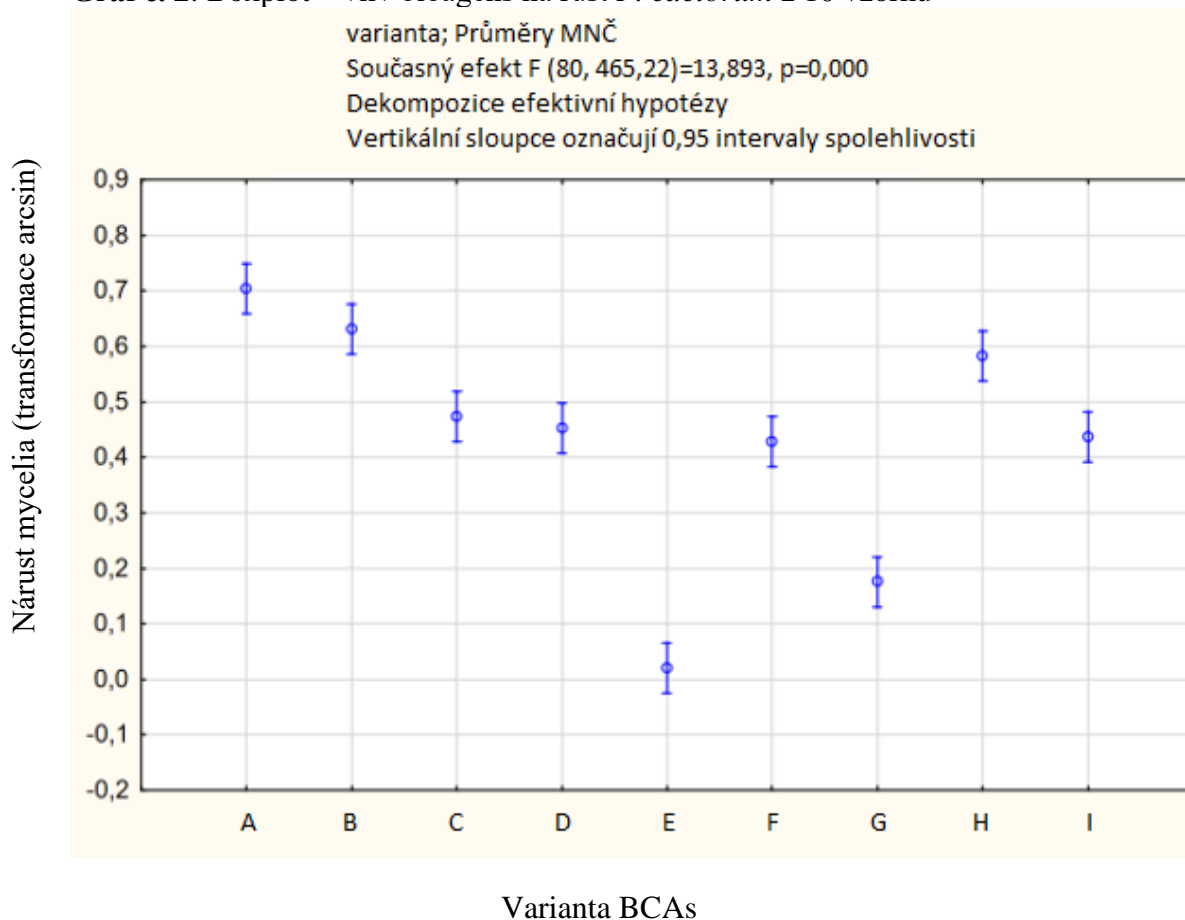
5.3.2 Reprezentativní vzorek

Pro lepší přehled účinnosti regulace růstu patogenu byl vybrán reprezentativní vzorek č. 10 z Ústeckého kraje, který byl znázorněn ve Grafu č. 2.

Tabulka č. 13: Tukeyův HSD test statisticky významných rozdílů mezi bioagens a 10 vzorku z oblasti Ústí nad Labem

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná nárůstu mycelia vzorku 10 (arcsin transformace). Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: mezi skupinami PČ = ,00513, sv = 81,000									
	Varianta BCAs	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}
		,70429	,63062	,47278	,45275	,02031	,42833	,17588	,58206	,43703
1	A		0,354730	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132	0,007803	0,000132
2	B	0,354730		0,000261	0,000141	0,000132	0,000132	0,000132	0,845023	0,000133
3	C	0,000132	0,000261		0,999454	0,000132	0,899393	0,000132	0,026780	0,970232
4	D	0,000132	0,000141	0,999454		0,000132	0,997597	0,000132	0,003801	0,999910
5	E	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132		0,000132	0,000304	0,000132	0,000132
6	F	0,000132	0,000132	0,899393	0,997597	0,000132		0,000132	0,000349	0,999999
7	G	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132	0,000304	0,000132		0,000132	0,000132
8	H	0,007803	0,845023	0,026780	0,003801	0,000132	0,000349	0,000132		0,000755
9	I	0,000132	0,000133	0,970232	0,999910	0,000132	0,999999	0,000132	0,000755	

Graf č. 2: Boxplot – vliv bioagens na růst *P. cactorum* z 10 vzorku

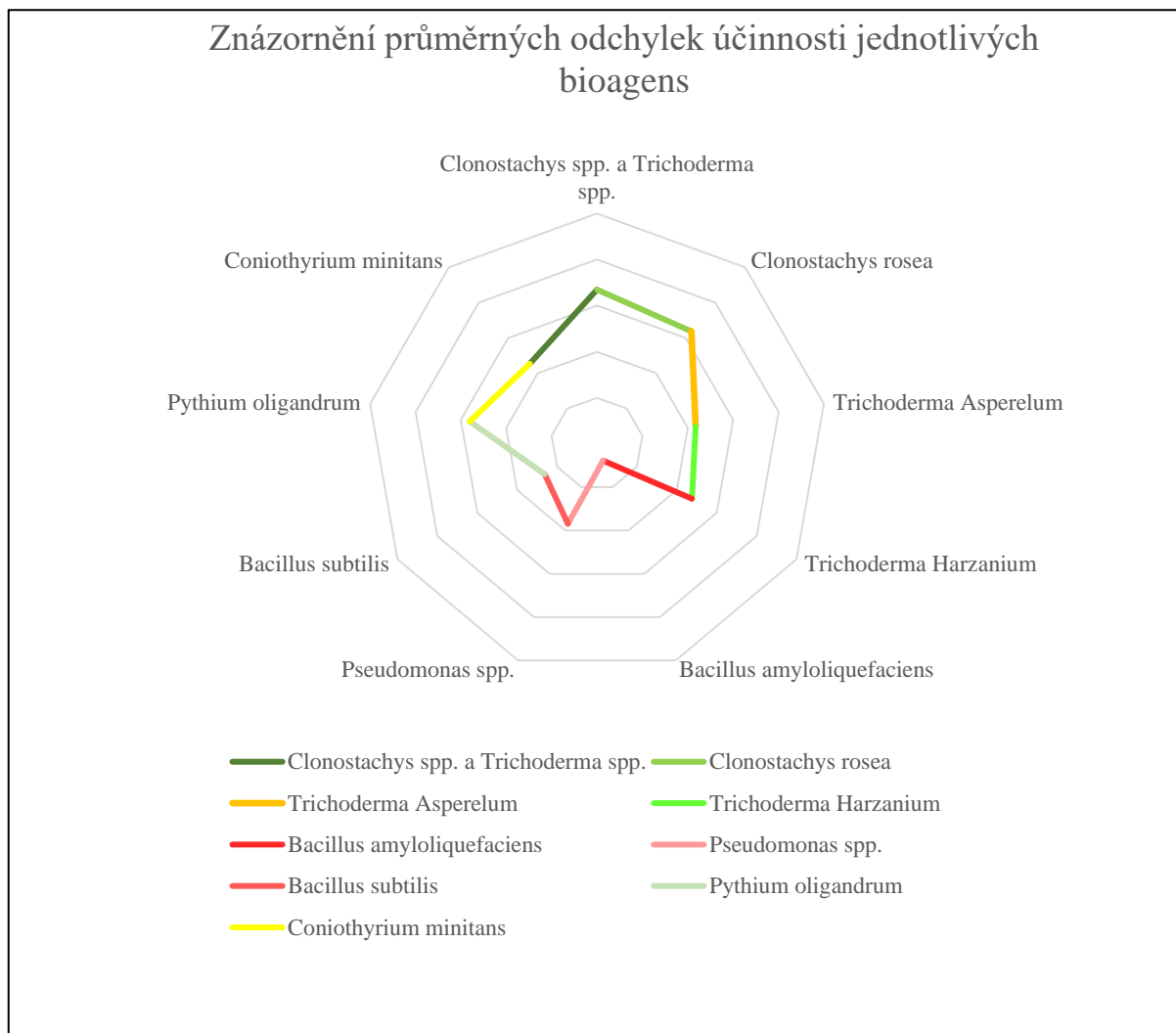


Dle Tukeyova testu, jsme provedli vyhodnocení, které nám ukazuje, že u vzorku č. 10 byla vyšší účinnost inhibice patogenu převážně způsobená bioagens *Clonostachys spp.* a *Trichoderma Spp.* (**A**), *Clonostachys rosea* (**B**) a *Pythium oligandrum* (**H**), naopak bioagens *Bacillus amyloliquefaciens* (**E**), se u toho vzorku neprokázal jako velmi účinný v inhibici proti *P. cactorum* stejně jako u většiny ze zkoumaných preparátů. Z celkového pohledu lze ale říct, že inhibice růstu známého patogenu byla znatelná při použití jakékoliv z výzkumných bioagens.

5.3.3 Účinnost mezi bioagens

Z průměrných hodnot jednotlivých bioagens byl vytvořen graf č. 3, který nám zvýrazňuje účinnost jednotlivých bioagens v potaz celého výzkumu.

Graf č. 3: Znázornění průměrných odchylek účinnosti jednotlivých bioagens



Vyhodnocením grafu bylo zdůrazněno, že se jako hlavní účinná bioagens v inhibice růstu patogenu *Phytophthora cactorum* osvědčila směs rodu *Clonostachys spp. a Trichoderma Spp.* (A), následovala v těsném závěsu bioagens *Clonostachys rosea* (B), jako velmi účinná se i prokázala biologická ochrana za pomoci *Pythium oligandrum* (H). Průměrná inhibice růstu patogenu byla způsobena druhy *Trichoderma asperelum* (C) a *Trichoderma Harzanium* (D), naopak nevhodnou formou bioagens byly označeny rod *Pseudomonas spp.*, který se výrazně pozitivně prokázal jen u jednoho ze vzorků, a bioagens bakteriálního původu, ve kterých byla inhibice růstu patogenu pomocí *Bacillus amyloliquefaciens* (E) a *Bacillus subtilis* (G) natolik neefektivní, že byla vyhodnocena jako nevhodná.

6 Diskuse

Jako vědní obor byla biologická ochrana rostlin dlouho zkoumána, a až v 70. letech 20. století se stal tento obor oficiálním. Dnes je jednou z mála agrotechnických věd, kterou podporují jak farmáři, tak i celková veřejnost. Tento směr se nadále rozvíjí, ale náklady na jeho praktickou aplikaci jsou oproti jiným formám ochrany rostlin vysoké (Bleša 2019).

Cílem našeho výzkumu bylo získat nové informace o účinnosti prostředků biologické ochrany proti *P. cactorum* v *in vitro* podmínkách. Naše studie prokázala, že existují i jiné prostředky k ochraně jahodníku před *P. cactorum*, které jsou dokonce účinnější než u bioagens používaných v současnosti (Polyversum). Nejvyšší inhibiční účinek na patogen *P. cactorum* byl prokázán u bioagens ze směsi organismů *Clonostachys spp.* a *Trichoderma spp.*, a to ve všech testovaných vzorcích. Pomocí Tukeyových testů byla také dokázána vysoká účinnost inhibice *P. cactorum* druhem *Clonostachys rosea* a až poté se umístila komerčně nejvíce používaná bioagens *Pythium oligandrum*.

Dle Lee et al. (2015) byla prokázána vysoká účinnosti inhibice druhem *Bacillus amyloliquefaciens* na *P. cactorum* při zkoumání korejského ženšenu. Výsledky Lee et al. (2015) byly odlišné od výsledků naší práce. V naší práci jsme spolehlivost *Bacillus amyloliquefaciens* jako bioagens nepotvrdili. Z podprůměrných hodnot inhibice patogenu na jahodníku jsme došli k závěru, že se jedná o nejméně účinný ze zkoumaných bioagens (v celkovém porovnání viz fotografie č. 1).

Utkhede & Smith (1991) ve svém výzkumu porovnávali účinnost *Bacillus subtilis* proti *P. cactorum* na jabloních. Gupta & Utkhede (1987) navíc zdůraznili, že pro maximální produkci fungicidních látek je potřeba přidat N a P hnojiva. Toto zjištění může být jedním z vysvětlení, proč jsme v našich vzorcích nebyli schopni prokázat účinnou inhibici tímto bioagens. Obě z bakteriálních bioagens se projevíly jako málo účinné prostředky ochrany proti *P. cactorum* u jahodníku. S přihlédnutím k získaným výsledkům je vyhodnocujeme jako nejméně efektivní (viz fotografie č. 2).

Carbú et al. (2016) dokázali vysokou účinnost inhibice *Botrytis cinerea* u jahodníku pomocí bioagens *Clonostachys rosea*, která využívá konkurenceschopnosti k omezení růstu patogenu. Účinnost bioagens se navíc zvyšuje regulací UV záření. V naší práci se druh *Clonostachys rosea* prokázal jako jeden z nejvíce účinných bioagens (viz fotografie č. 3), a to

i bez regulace UV záření. Jelikož byla u *C. rosea* dokázána vysoká účinnost inhibice *P. cactorum*, můžeme říct, že tato bioagens by mohla nahradit *Pythium oligandrum*.

Kuzmanovska et al. (2018) dokázala za pomoci organismu *Trichoderma asperellum* výrazně ovlivnit a omezit růst rodu *Phytophthora*, konkrétněji proti *Phytophthora drechsleri*, *Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora capsici*. Její výzkum prokázal efektivitu inhibice za použití *Trichoderma asperellum* také proti *Fusarium oxysporum* a *Rhizoctonia solani*. Segarra et al. (2013) k tomu přidal i inhibici růstu u rodu *Pseudomonas*. Mbarga et al. (2012) ukázal omezení růstu *Pythium myriotylum* u kokosu pomocí *T. asperellum*. Výše zmíněné příklady nás vedly k možnosti, že *T. asperellum* je schopna i inhibovat růst *P. cactorum*. Při pohledu na výsledky práce lze potvrdit naši domněnku o účinnosti inhibice tohoto kmene, i na růst *P. cactorum* (viz fotografie č. 4).

Freeman et al. (2004) prokázal ve své práci účinky druhu *Trichoderma Harzanium* na další chorobu jahodníku, a to antraknóзовé onemocnění. Carbú et al. (2016) uvádí účinnost inhibice růstu pomocí *T. Harzanium* u patogenů *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Cladosporium fluvum* a *Celletotrichum acutatum* za pomoci kmenu T-39. Concklin (2012) ve své práci doporučuje *Trichoderma Harzanium* jako prevenci před vznikem infekce způsobené rody *Fusarium*, *Pythium* a *Rhizoctonia*. Z našeho výzkumu jsme prokázaly, že použití bioagens s *T. harzanium* je účinné proti růstu fytoftorové hniloby jahodníku (viz fotografie č. 5). Dokonce se na území České republiky tato bioagens prokázala mezi neúčinnější prostředky biologické ochrany jahodníku ve 4 případech z 10 zkoumaných.

Už roku 1990 Smith et al. dokázaly inhibici růstu *P. cactorum* pomocí rodu *Trichoderma*. Z výše zmíněných bioagens bylo patrné, že *Clonostachys spp.* a *Trichoderma spp.* Silně omezují růst *P. cactorum* samostatně. Překvapením bylo, když jsme použili směs těchto dvou zmíněných rodů, která se prokázala jako nejvíce účinná v potlačování růstu *P. cactorum* ze všech bioagens (viz fotografie č. 6). Nejednalo se pouze o odlišnosti jednoho vzorku, tato dokázaná inhibice *P. cactorum* byla nejvyšší u všech zkoumaných preparátů. Z výsledků naší práce lze tedy vyvodit, že by tento druh biologické ochrany měl být zařazen mezi nejúčinnější metody ochrany proti fytoftorové hnilobě jahodníku.

Tomprefa et al. (2009) objevil vysoce spolehlivou inhibici patogenů *S. sclerotiorum* a *S. cepivorum*s pomocí *Coniothyrium minitans*, později také prokázal účinek tohoto bioagens na *Phytophthora nicotianae* a *Pythium ultimum*. Jak již bylo zmíněno, tyto druhy rodu *Phytophthora* jsou svou stavbou velmi podobné námi zkoumané *P. cactorum*, a proto jsme se

domnívali, že by zde mohla vzniknout významná inhibice růstu prostřednictvím *C. minitans*. Jak je patrné z fotografie č. 7, tuto hypotézu se nám podařilo potvrdit. Jelikož bioagens vykazovala vysokou účinnost inhibice růstu patogenu u všech vzorků patogenů rodu *Phytophthora* a jeví se jako jeden z nejvíce účinných přípravků, doporučujeme zařadit tuto biologickou ochranu jahodníku jako alternativu před chemickými prostředky.

Berg et al. (2000) ve svém výzkumu dokázal zvýšit produkci jahod a potlačit patogen *Verticillium* pomocí bioagens obsahující rod *Pseudomonas spp.*. Zohara et al. (2016) při ošetření semen okurek pomocí *Pseudomonas spp.* zvýšili odolnost proti infekci druhem *Phytophthora capsici*. Agusti et al. (2011) pomocí *Pseudomonas fluorescens* dokázali dokonce inhibovat klíčení cyst druhu *Phytophthora cactorum* u jahodníku. Výsledky inhibice růstu rodem *Pseudomonas spp.* (viz fotografie č. 8) byly také prokazatelné u velkého množství vzorků, nicméně stálost této inhibice byla velmi kolísavá. Příkladem nestálosti inhibice růstu *P. cactorum* je vzorek 5, u kterého se pomocí této bioagens nepodařilo dostatečně efektivně zabránit růstu patogenu. U vzorku č. 8 se naopak dokázal rod *Pseudomonas spp.* vyrovnat svým účinkem inhibici růstu *P. cactorum* pomocí bioagens obsahující *Pythium oligandrum*.

Pythium oligandrum je zařazen v registru přípravků na ochranu rostlin v České republice jako neúčinnější prostředek proti fytoftorové hnilobě jahodníku (Brožová 2002). Vallance et al. (2009) prokázal omezení výskytu *Pythium dissotocum* pomocí inhibice způsobené organismem *P. oligandrum*. Orlikowski (2001) zjistil studii u gerber snížení počtu rodu *Phytophthora* za pomoci známé bioagens. Výsledky našich testů potvrdily, že *P. oligandrum* je jako bioagens proti *P. cactorum* účinné (viz fotografie č. 9), nicméně mezi námi testovanými bioagens se jako nejúčinnější projevíly *Clonostachys spp.* a *Trichoderma spp.* a *Clonostachys rosea*.

7 Závěr

Výsledek výzkumu, který se zaměřoval na prostředky biologické ochrany proti druhu *Phytophthora cactorum* na jahodníku potvrdil vědeckou hypotézu, že existuje konvenční či experimentální prostředek biologické ochrany, který bude mít negativní vliv na životaschopnost *P. cactorum* v *in vitro* podmínkách.

Na základě všech výsledků můžeme říct, že jakýkoliv typ biologické ochrany je pro rostlinu jahodníku prospěšný, nicméně náklady na použití v některých případech převyšují efektivitu jednotlivých přípravků. Ze všech dat, které jsme vyhodnotili, vyšly s účinností inhibice růstu *P. cactorum* nejlépe rody *Clonostachys*, a to ve směsi *Clonostachys spp.* a *Trichoderma spp.*, ale také samostatný druh *Clonostachys rosea*. Původ vzorků *P. cactorum* dle statistiky nebyl tak důležitým měřítkem, aby ovlivnil výsledky práce. Nejvíce prostudovaná a používaná bioagens obsahující *Pythium oligandrum* proti fytoftorové hnilobě jahodníku se v hodnocení účinnosti inhibice růstu patogenu umístila až na třetím místě. Velmi dobře se umístili v inhibici růstu patogenu též další bioagens nebakteriálního původu, které by se daly použít jako alternativní ochrana jahodníku ve prospěch zemědělce. Nejhorších výsledků dosahovaly organismy rodu *Bacillus*, které ve většině případů nedokázaly vytvořit dostatečnou inhibici růstu zkoumaného patogenu. Jedinou výjimkou byl vzorek č. 1, kde se *Bacillus subtilis* projevil jako vysoce inhibiční. Tato výjimka mohla být způsobena podmínkami kultivace, které podpořily růst bakterií. Závěrem lze konstatovat, že vybrané bioagens (*Clonostachys spp.*, *Trichoderma spp.*; *Clonostachys rosea*) by mohly být alternativním řešením ochrany jahodníku před infekcí způsobenou patogenem *Phytophthora cactorum*, který vytváří onemocnění zvané fytoftorová hniloba jahodníku.

8 Literatura

Internetové zdroje

Abad, Z. G. (2019). USDA-APHIS-PPQ-S&T Beltsville Laboratory, United States of America. Available from <https://idtools.org/id/phytophthora/factsheet.php?name=7922> (accessed March 07, 2021).

Anonym. (2020). Dodržování obecných zásad IOR. Available from <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/skodlive-organismy/integrovana-ochrana-rostlin/dodrzovani-obecnych-zasad-ior/> (accessed March 15, 2021)

Bayer, A. G. (2007). Aliette® 80 WG, Německo. Available from https://www.agromanual.cz/download/pdf_etiketa/e_aliette_80_wg.pdf (Accessed March 17, 2021)

Celetti, M., & Fisher, P. (2015). MINISTRY OF AGRICULTURE, FOOD AND RURAL AFFAIRS, Ontario. Available from <http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/hort/news/hortmatt/2015/15hrt15a6.htm> (accessed March 10, 2021)

Concklin, M. (2012). UConn IPM. Available from <http://ipm.uconn.edu/documents/raw2/Trichoderma%20for%20Control%20of%20Soil%20Pathogens/Trichoderma%20for%20Control%20of%20Soil%20Pathogens.php?aid=7> (accessed March 24, 2021)

Ellis, M. A. (2008). Department of plant pathology, Ohio State university. Available from <https://ohioline.osu.edu/factsheet/plpath-fru-09> (accessed March 14, 2021)

Grove, G. G., Madden, L. V., & Ellis, M. A. (1985). Influence of Temperature and Wetness Duration on Sporulation of *Phytophthora cactorum* on Infected Strawberry Fruit. *Phytopathology* 75:700–703. Available from https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1985Abstracts/Phyto75_700.htm (accessed March 06, 2021)

Judelson, H. S. (2009). Oomycete Genetics and Genomics: Diversity, Interactions and Research Tools. Page (Lamour K, Kamoun S, editors). John Wiley & Sons, Inc., California. Available from

https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=AIL_q4VNbFsC&oi=fnd&pg=PA121&dq=oomycetes+life+cycle+sexual&ots=Hr_2gsH4ei&sig=JN8OZgpvqsLD0Me7Oi49sM36tA4&redir_esc=y#v=onepage&q=oomycetes life cycle sexual&f=false (accessed March 07, 2021).

National Center for Biotechnology Information. (2020). Taxonomy Browser. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=29920> (accessed March 06, 2021).

National Center for Biotechnology Information. (2020). Taxonomy Browser. Available from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=3747&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=s&log_op=lineage_toggle (accessed March 06, 2021).

Ondráčková, E. (2019) Biologická ochrana rostlin s využitím mykoparazitických hub, Česká republika. Available from <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/choroby/biologicka-ochrana-rostlin-s-vyuzitim-mykoparazitickyh-hub> (accessed March 17, 2021)

Knižní zdroje

Agrios, G. N. (2005). Plant pathology.

Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., & Blackwell, M. (1996). *Introductory mycology* (No. Ed. 4). John Wiley and Sons.

Agusti, L., Bonaterra, A., Moragrega, C., Camps, J., & Montesinos, E. (2011). Biocontrol of root rot of strawberry caused by *Phytophthora cactorum* with a combination of two *Pseudomonas fluorescens* strains. *Journal of Plant Pathology*, 363-372.

Baker, R., & Griffin, G. J. (1995). Molecular strategies for biological control of fungal plant pathogens. *Novel approaches to integrated pest management*, 153-82.

Berg, G., Kurze, S., Buchner, A., Wellington, E. M., & Smalla, K. (2000). Successful strategy for the selection of new strawberry-associated *rhizobacteria* antagonistic to *Verticillium wilt*. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(12), 1128-1137.

Blackwell, E. (1943). The life history of *Phytophthora cactorum* (Leb. & Cohn) Schroet. *Transactions of the British Mycological Society*, 26(1-2), 71-89.

Bleša, D. (2019). Úvod do problematiky biologické ochrany rostlin.

Brožová, J. (2002). Exploitation of the mycoparasitic fungus *Pythium oligandrum* in plant protection. *Plant Prot. Sci*, 38, 29-35.

Carbú, M., González-Rodríguez, V. E., Garrido, C., Husaini, A. M., & Cantoral, J. M. (2016). 11 New Biocontrol Strategies for Strawberry Fungal Pathogens. *Strawberry: Growth, Development and Diseases*, 196.

Cline, E. T., Farr, D. F., & Rossman, A. Y. (2008). A synopsis of *Phytophthora* with accurate scientific names, host range, and geographic distribution. *Plant Health Progress*, 9(1), 32.

- Cooper, D. C., & Porter, C. L. (1928). *Phytophthora* blight of Peony. *Phytopathology*, 18(11).
- Černý, K., Hejná, M., Kolářová, Z., Mrázková, M., & Romportl, D. (2013). Přehled vybraných nepůvodních invazních houbových patogenů dřevin ČR. *Zpravodaj ochrany lesa*, 43.
- Černý, K., Pešková, V., & Modlinger, R. (2015). Distribution of *phytophthora* disease of alders in forest stands in the Czech Republic-preliminary findings. *Zprávy Lesnického Výzkumu*, 60(4), 256-261.
- De Bary, A. (1881). Zur Kenntniss der *Peronosporaeen*. *Bot. Ztg*, 39, 521-625.
- Dick, M. W. (1973). THE DEVELOPMENT OF CYTOLOGICAL THEORY IN THE OOMYCETES. "The development of cytological theory in the *Oomycetes*." *Biological Reviews* 48.1 (1973): 133-158.
- Eikemo, H., Stensvand, A., Davik, J., & Tronsmo, A. M. (2003). Resistance to crown rot (*Phytophthora cactorum*) in strawberry cultivars and in offspring from crosses between cultivars differing in susceptibility to the disease. *Annals of applied biology*, 142(1), 83-89.
- Eikemo, H., & Stensvand, A. (2015). Resistance of strawberry genotypes to leather rot and crown rot caused by *Phytophthora cactorum*. *European journal of plant pathology*, 143(2), 407-413.
- Erwin, D. C., & Ribeiro, O. K. (1996). *Phytophthora diseases worldwide*. American Phytopathological Society (APS Press).
- Freeman, S., Minz, D., Kolesnik, I., Barbul, O., Zveibil, A., Maymon, M., ... & Elad, Y. (2004). *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. *European Journal of Plant Pathology*, 110(4), 361-370.
- Goodwin, S. B. (1997). The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology*, 87(4), 462-473.

- Gupta, V. K., & Utkhede, R. S. (1987). Nutritional Requirement for Production of Antifungal Substance by *Enterobacter aerogenes* and *Bacillus subtilis* Antagonists of *Phytophthora cactorum* 1. *Journal of phytopathology*, 120(2), 143-153.
- Hancock, J. F., & Scott, D. H. (1988). Strawberry cultivars and worldwide patterns of strawberry production. *Fruit varieties journal (USA)*.
- Hancock, J. F., Maas, J. L., Shanks, C. H., Breen, P. J., & Luby, J. J. (1991). Strawberries (*Fragaria*). *Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops* 290, 491-548.
- Harant, M. (1986). *Jahody*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství.
- Hartig, R. (1876). Die Buchencotyledonen-krankheit. *Ztschr. f. Forst u. Jagdw*, 8, 117-123.
- Heffer, L. V., Powelson, M. L., & Johnson, K. B. (2002). Oomycetes. The Plant Health Instructor.
- Jung, T., Orlikowski, L., Henricot, B., Abad-Campos, P., Aday, A. G., Aguin Casal, O., ... & Pérez-Sierra, A. (2016). Widespread *Phytophthora infestations* in European nurseries put forest, semi-natural and horticultural ecosystems at high risk of *Phytophthora* diseases. *Forest Pathology*, 46(2), 134-163.
- Kloutvorová, J., Skalský, M., Ouředníčková, J., Jaklová, P., & Valentová, L. (2018). Integrovaná ochrana jahodníku. Výzkumný šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy.
- Ko, W. H. (1978). Heterothallic *Phytophthora*: evidence for hormonal regulation of sexual reproduction. *Microbiology*, 107(1), 15-18.
- Krebs, B., Höding, B., Kübart, S., Workie, M. A., Junge, H., Schmiedeknecht, G., ... & Hevesi, M. (1998). Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains/Anwendung von *Bacillus subtilis* als Mittel für den biologischen Pflanzenschutz. I. Aktivitäten und Charakterisierung von *Bacillus subtilis*-Stämmen. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, 181-197.

Kuzmanovska, B., Rusevski, R., Jankulovska, M., & Oreshkovikj, K. B. (2018). Antagonistic activity of *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma harzanium* against genetically diverse *Botrytis cinerea* isolates. *Chilean journal of agricultural research*, 78(3), 391-399.

Lebert, H., & Cohn, F. (1870). Rots of cactus stems. *Bietr. Biol. Pflanz.*, 1, 51-57.

Lee, B. D., Dutta, S., Ryu, H., Yoo, S. J., Suh, D. S., & Park, K. (2015). Induction of systemic resistance in *Panax ginseng* against *Phytophthora cactorum* by native *Bacillus amyloliquefaciens* HK34. *Journal of ginseng research*, 39(3), 213-220.

Lhotský, J. (2015). Úvod do studia symbiotických interakcí mikroorganismů: nový pohled na viry a bakterie. *Academia*.

Li, Y., Gu, Y., Li, J., Xu, M., Wei, Q., & Wang, Y. (2015). Biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits powdery mildew. *Frontiers in microbiology*, 6, 883.

Maas, J. L. (2004). Strawberry disease management. *Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II*, 441-483.

Mbarga, J. B., Ten Hoopen, G. M., Kuate, J., Adiobo, A., Ngonkeu, M. E. L., Ambang, Z., ... & Begoude, B. A. D. (2012). *Trichoderma asperellum*: A potential biocontrol agent for *Pythium myriotylum*, causal agent of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) root rot disease in Cameroon. *Crop Protection*, 36, 18-22.

Mrázková, M., Černý, K., Strnadová, V., & Filipová, N. (2012). Identifikace symptomů napadení dřevin a okrasných rostlin patogeny z rodu *Phytophthora* de Bary. *Certifikovaná metodika č. 6/2011-056*. VÚKOZ, Průhonice, 37.

Nellist, C. F., Vickerstaff, R. J., Sobczyk, M. K., Marina-Montes, C., Wilson, F. M., Simpson, D. W., ... & Harrison, R. J. (2019). Quantitative trait loci controlling *Phytophthora cactorum* resistance in the cultivated octoploid strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). *Horticulture research*, 6(1), 1-14.

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

Orlikowski, L. B. (2001). Biological activity of *Pythium oligandrum* against *Phytophthora* species. *Mededelingen (Rijksuniversiteit te Gent. Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen)*, 66(2a), 161-166.

Peiker, J., & Starý, B. (1956). Pěstování jahodníku.

Pilát, A., & Ušák, O. (1963). *Atlas rostlin*. Státní Pedagogické Nakladatelství.

Ploetz, R. C. (Ed.). (2003). Diseases of tropical fruit crops.

Porras, M., Barrau, C., Arroyo, F. T., Santos, B., Blanco, C., & Romero, F. (2007). Reduction of *Phytophthora cactorum* in strawberry fields by *Trichoderma spp.* and soil solarization. *Plant Disease*, 91(2), 142-146.

Rebollar-Alviter, Á., & Ellis, M. A. (2005). Efficacy of azoxystrobin, pyraclostrobin, potassium phosphite, and mefenoxam for control of strawberry leather rot caused by *Phytophthora cactorum*. *Plant Health Progress*, 6(1), 17.

Reed, B. M., & Hummer, K. E. (1995). Conservation of germplasm of strawberry (*Fragaria species*). In *Cryopreservation of Plant Germplasm I* (pp. 354-370). Springer, Berlin, Heidelberg.

Saville, A. C., Martin, M. D., & Ristaino, J. B. (2016). Historic late blight outbreaks caused by a widespread dominant lineage of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *PloS one*, 11(12), e0168381.

Segarra, G., Sant, D., Trillas, M. I., Casanova, E., Noguera, R., Castillo, S., ... & Avilés, M. (2013). Efficacy of the microbial control agent *Trichoderma asperellum* strain T34 amended to different growth media against soil and plant leaf pathogens. *Acta Horticulturae*, (1013), 515-520.

Schenk, A. (1875). *Neue Peronospora: P. Sempervivi*.

Siddiqui, Z. A., & Khan, M. (2017). Biofilm formation by *Pseudomonas spp.* and their significance as a biocontrol agent. *Biofilms in plant and soil health*, 14, 69.

Smith, V. L., Wilcox, W. F., & Harman, G. E. (1990). Potential for biological control of *Phytophthora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium spp.* *Phytopathology*, 80(9), 880-885.

Tomprefa, N., McQuilken, M. P., Hill, R. A., & Whipps, J. M. (2009). Antimicrobial activity of *Coniothyrium minitans* and its macrolide antibiotic macrospheptide A. *Journal of applied microbiology*, 106(6), 2048-2056.

Trigiano, R. N. (Ed.). (2007). *Plant pathology concepts and laboratory exercises*. CRC press.

Utkhede, R. S., & Smith, E. M. (1991). Biological and chemical treatments for control of *phytophthora* crown and root rot caused by *Phytophthora cactorum* in a high density apple orchard. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 13(3), 267-270.

Vachůn, Z. (2004). *Ovocnictví: pěstování jahodníku*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita.

Vallance, J., Le Floch, G., Déniel, F., Barbier, G., Lévesque, C. A., & Rey, P. (2009). Influence of *Pythium oligandrum* biocontrol on fungal and oomycete population dynamics in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(14), 4790-4800.

Villarino, M., Larena, I., Melgarejo, P., & De Cal, A. (2021). Effect of chemical alternatives to methyl bromide on soil-borne disease incidence and fungal populations in Spanish strawberry nurseries: A long-term study. *Pest Management Science*, 77(2), 766-774.

Waterhouse, G. M., & Waterston, J. M. (1966). *Phytophthora cactorum*. *CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria*, (111), 2.

Wedge, D. E., Smith, B. J., Quebedeaux, J. P., & Constantin, R. J. (2007). Fungicide management strategies for control of strawberry fruit rot diseases in Louisiana and Mississippi. *Crop Protection*, 26(9), 1449-1458.

Whipps, J. M., & Gerlagh, M. (1992). Biology of *Coniothyrium minutans* and its potential for use in disease biocontrol. *Mycological research*, 96(11), 897-907.

Wilhelm, S., & Sagen, J. E. (1974). *A history of the strawberry, from ancient gardens to modern markets*. University of California, Division of agricultural sciences.

Zohara, F., Akanda, M. A. M., Paul, N. C., Rahman, M., & Islam, M. T. (2016). Inhibitory effects of *Pseudomonas spp.* on plant pathogen *Phytophthora capsici* *in vitro* and in plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 5, 69-77.

Obrázky

Obrázek č.1

Životní cyklus *Phytophthora cactorum* (adapted from Adrienne Hardham, The Australian National University, Australia). Available from https://www.researchgate.net/figure/Generalized-life-cycle-of-Phytophthora-adapted-from-Adrienne-Hardham-The-Australian_fig2_274860472 (Accessed March 2021)

Obrázek č. 2

Rozšíření *Phytophthora cactorum* po světě. Available from *Phytophthora cactorum* (PHYTCC) [World distribution] | EPPO Global Database (Accessed March 2021)

Obrázek č. 3

Fragaria vesca. Available (adapted from Edward Step, *Fragaria vesca* from Wayside and woodland blossoms; a pocket guide to British wild flowers for the country rambler) from https://commons.wikimedia.org/wiki/File:WWB-0065-027-Fragaria_vesca.png (Accessed April 2021)

Obrázek č. 4

Infekční cyklus *P. cactorum* na jahodníku (adapted from Ohio State University Extension, USA) Available from <https://ohioline.osu.edu/factsheet/plpath-fru-09> (Accessed March 2021)

Obrázek č. 5

Hanáček, A. (2021). Mapa původu vzorků *P. cactorum*

Obrázek č. 6

Hanáček, A. (2021). Test účinku inhibice biological agens (BCAs)

9 Přílohy

9.1 Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Lokality sběru izolátů *P. cactorum* a jejich příslušné označení pro identifikaci

Tabulka č. 2: Zkratky pro bioagens ve výzkumu

Tabulka č. 3: Legenda grafu č. 1

Tabulka č. 4: Tukeyův HSD test statisticky významných rozdílů mezi bioagens a 1. vzorku

Tabulka č. 5: Tukeyův HSD test statisticky významných rozdílů mezi bioagens a 2. vzorku

Tabulka č. 6: Tukeyův HSD test statisticky významných rozdílů mezi bioagens a 3. vzorku

Tabulka č. 7: Tukeyův HSD test statisticky významných rozdílů mezi bioagens a 4. vzorku

Tabulka č. 8: Tukeyův HSD test statisticky významných rozdílů mezi bioagens a 5. vzorku

Tabulka č. 9: Tukeyův HSD test statisticky významných rozdílů mezi bioagens a 6. vzorku

Tabulka č. 10: Tukeyův HSD test statisticky významných rozdílů mezi bioagens a 7. vzorku

Tabulka č. 11: Tukeyův HSD test statisticky významných rozdílů mezi bioagens a 8. vzorku

Tabulka č. 12: Tukeyův HSD test statisticky významných rozdílů mezi bioagens a 9. vzorku

Tabulka č. 13: Tukeyův HSD test statisticky významných rozdílů mezi bioagens a 10 vzorku z oblasti Ústí nad Labem

9.2 Seznam grafů

Graf č. 1: Boxplot – vliv bioagens na růst *P. cactorum* mezi všemi lokalitami

Graf č. 2: Boxplot – vliv bioagens na růst *P. cactorum* z 10 vzorku

Graf č. 3: Znárodnění průměrných odchylek účinnosti jednotlivých bioagens

9.3 Použité vzorce

- transformace procent do reálných čísel pro statistické vyhodnocení získaných dat

$$y = \arcsin \sqrt{\frac{x}{100}}$$

9.4 Fotodokumentace

Pro fotografie byl vybrán nejvíce přehledný vzorek ze Středočeského kraje.

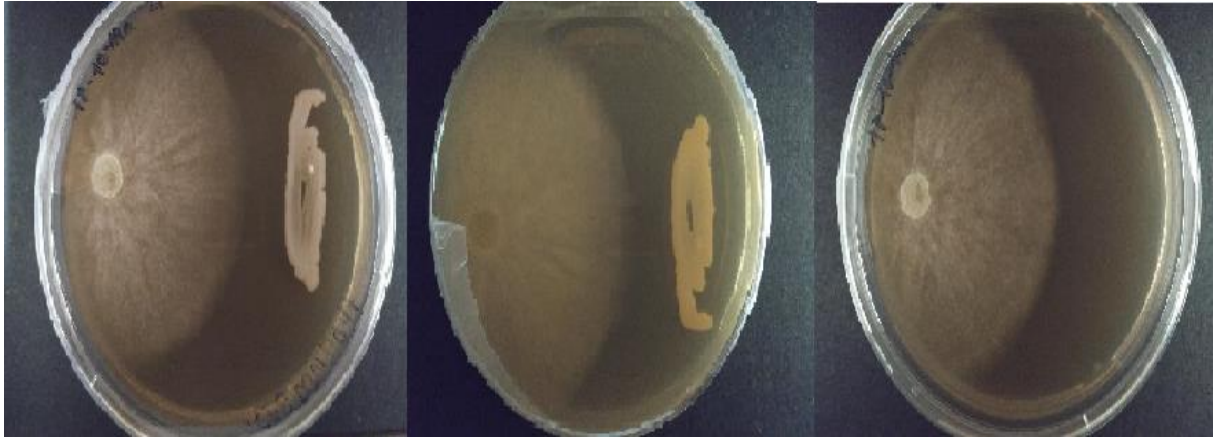


Foto č. 1: Reakce *Bacillus amyloliquefaciens* s *P. cactorum* + kontrolní vzorek *P. cactorum*

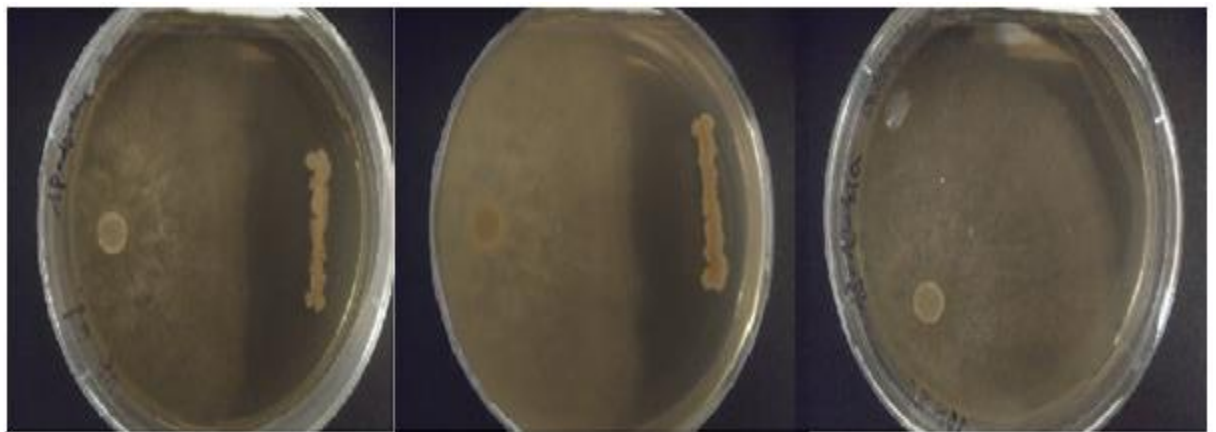


Foto č. 2: Reakce *Bacillus subtilis* s *P. cactorum* + kontrolní vzorek *P. cactorum*

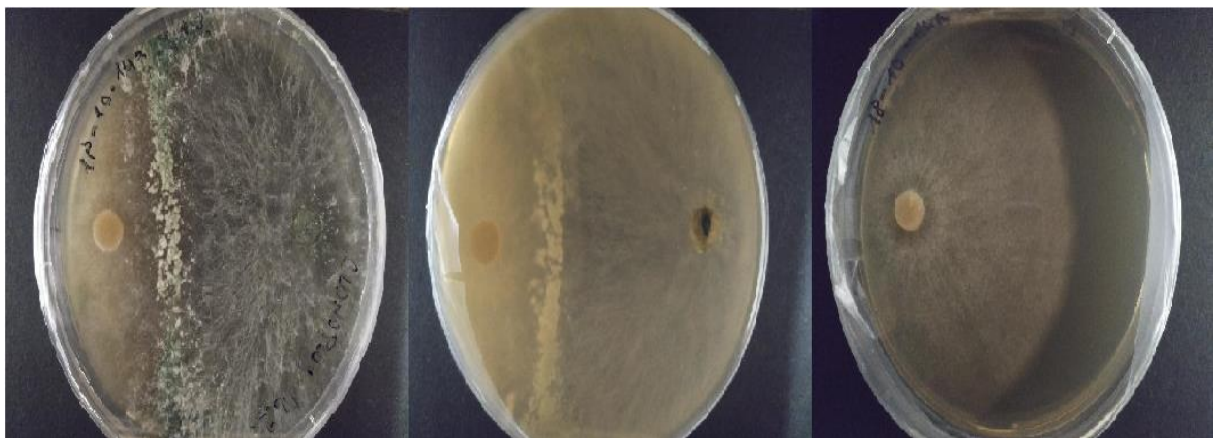


Foto č. 3: Reakce *Clonostachys rosea* s *P. cactorum* + kontrolní vzorek *P. cactorum*

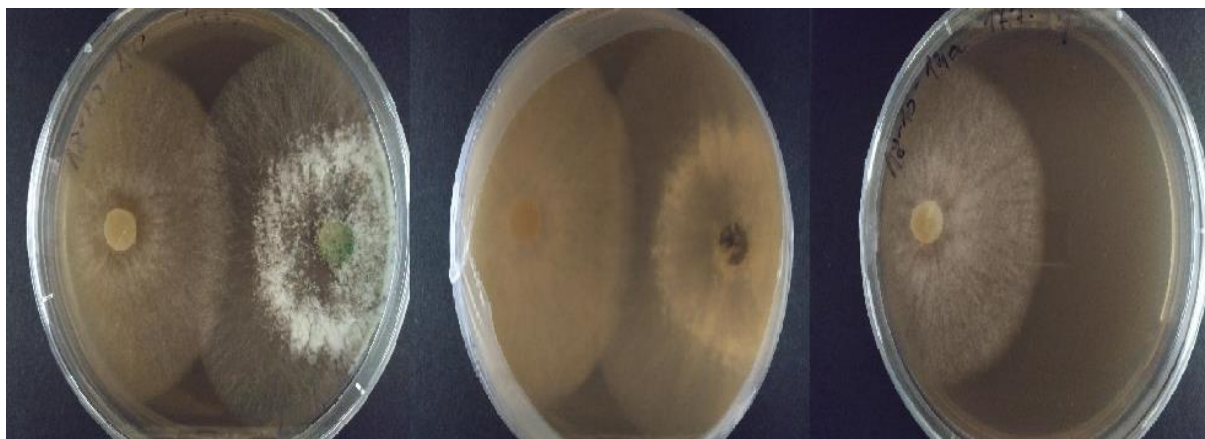


Foto č. 4: Reakce *Trichoderma asperellum* s *P. cactorum* + kontrolní vzorek *P. cactorum*

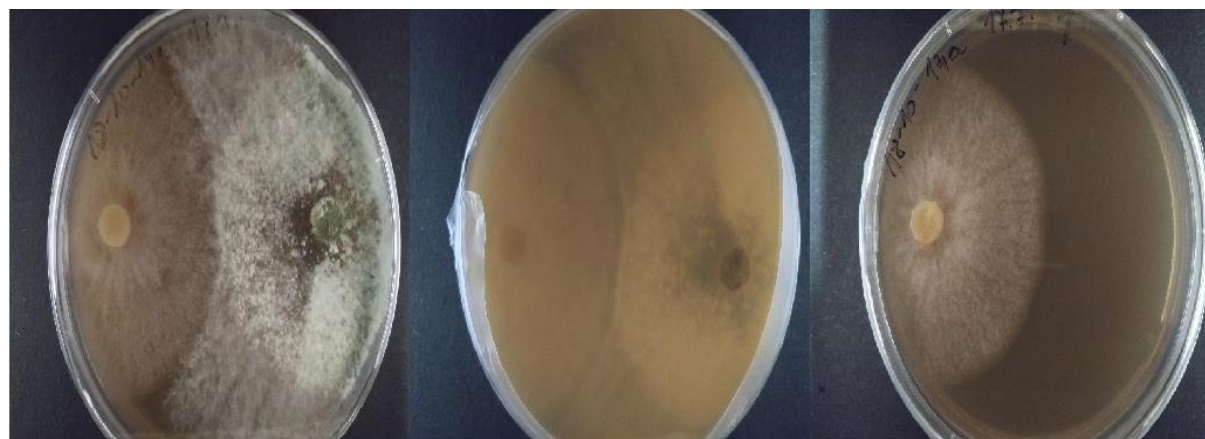


Foto č. 4: Reakce *Trichoderma Harzanium* s *P. cactorum* + kontrolní vzorek *P. cactorum*



Foto č. 6: Reakce *Clonostachys* spp. a *Trichoderma* spp. s *P. cactorum* + kontrolní vzorek *P. cactorum*

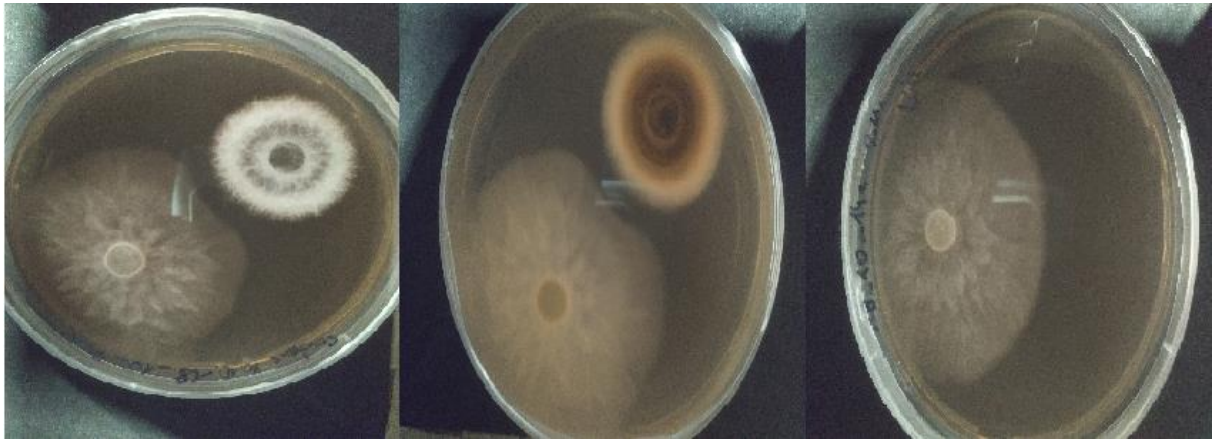


Foto č. 7: Reakce *Coniothyrium minitans* s *P. cactorum* + kontrolní vzorek *P. cactorum*

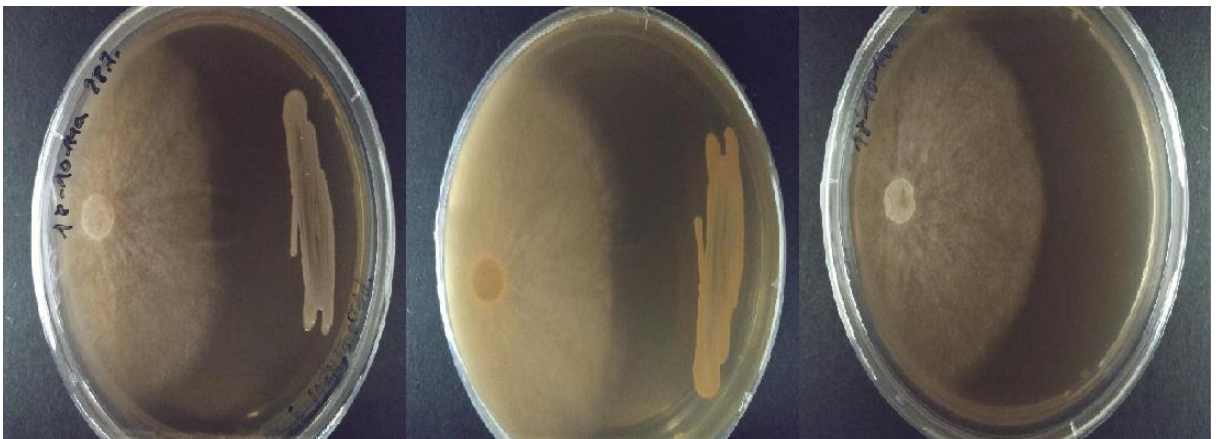


Foto č. 8: Reakce *Pseudomonas* spp. s *P. cactorum* + kontrolní vzorek *P. cactorum*

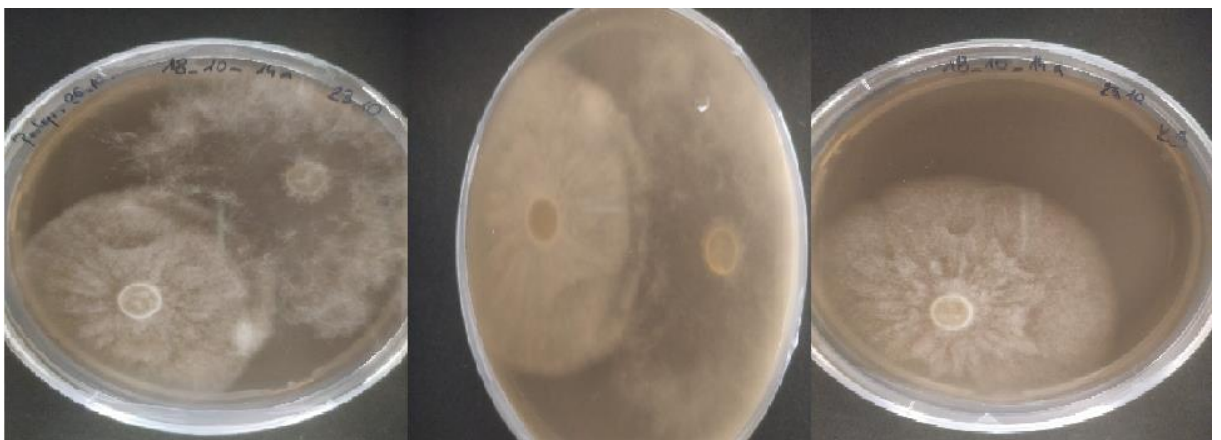


Foto č. 9: Reakce *Pythium oligandrum* s *P. cactorum* + kontrolní vzorek *P. cactorum*