

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Studium účinku hyperparazita *Ampelomyces quisqualis* (přípravek AQ 10) na vývoj padlí

Bakalářská práce

Eliška Nováková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2017

Vedoucí práce: doc. RNDr. Barbora Mieslerová, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením paní doc. RNDr. Barbory Mieslerové, Ph.D. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci

.....

Eliška Nováková

Souhrn

Teoretická část bakalářské práce je tvořena třemi celky, které se zabývají obecnou charakteristikou padlí, kde je současně zmíněn i způsob rozmnožování padlí a nejnámější zástupci, kontrolou houbových organismů (chemickou i biologickou) a hyperparazitem *Ampelomyces quisqualis* a jeho využití při kontrole houbových organismů.

V experimentální části byla sledována účinnost *Ampelomyces quisqualis* (aplikace v podobě přípravku AQ 10) na patosystémy padlí čekankového (*Golovinomyces cichoracearum*) na locice kompasové (*Lactuca serriola* LSE/57/15), padlí rajčatového (*Pseudoidium neolycopersici*) na rajčeti jedlém (*Solanum lycopersicum* cv. Amateur) a padlí tykvovitých (*Podosphaera xanthii*) na melounu cukrovém (*Cucumis melo* cv. Solartur). Přípravkem AQ 10 byly ošetřeny jednak celé rostliny napadené padlím, ale taktéž byl sledován vývoj *Ampelomyces quisqualis* na listových discích, a to jak již napadených padlím, tak i současně padlím inokulovaných. Pozitivní účinek přípravku AQ 10 byl sledován právě v experimentu, kdy byla jeho aplikace časově shodná s inokulací padlím.

Summary

The theoretical part of this bachelor thesis is composed of three sections, the first concerns the general characteristics of powdery mildew as well as fungal reproduction and the most common genera and species. The second follows up with both chemical and biological control of fungal organisms and the third deals with hyperparasite *Ampelomyces quisqualis* and its use as a biological control agent.

In the experimental part of the thesis, the efficacy of hyperparasite *Ampelomyces quisqualis* (biofungicide AQ 10) in three different pathosystems was studied – lettuce powdery mildew (*Golovinomyces cichoracearum*) on prickly lettuce (*Lactuca serriola* LSE/57/15), tomato powdery mildew (*Pseudoidium neolycopersici*) on tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Amateur) and cucurbit powdery mildew (*Podosphaera xanthii*) on muskmelon (*Cucumis melo* cv. Solartur). The AQ 10 was applied even on whole plants attacked by powdery mildew, but also the development of *A. quisqualis* was observed on leaf discs, both as already attacked by powdery mildew, and simultaneously inoculated with powdery mildew. Biofungicide AQ 10 was found effective when the inoculation with powdery mildew and application of AQ 10 occurred at the same time.

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala doc. RNDr. Barboře Mieslerové, Ph.D. za její odborné vedení, trpělivost a užitečné rady při konzultacích během vypracování této bakalářské práce. Mé poděkování patří také pracovníkům Katedry botaniky PřF UP.

OBSAH

1 ÚVOD.....	8
2 CÍLE PRÁCE	9
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	10
3.1 Charakteristika padlí	10
3.1.1 Životní cyklus padlí.....	10
3.1.1.1 Nepohlavní způsob rozmnožování	10
3.1.1.2 Pohlavní způsob rozmnožování.....	11
3.1.2 Významní zástupci řádu Erysiphales	12
3.2 Kontrola houbových chorob rostlin	13
3.2.1 Chemická kontrola	13
3.2.1.1 Historie a vývoj chemické kontroly	13
3.2.1.2 Nevýhody a rizika chemické kontroly.....	14
3.2.2 Biologická kontrola	14
3.2.2.1 Historie biologické kontroly	15
3.2.2.2 Interakce mezi organismy přispívající k biologické kontrole	16
3.2.2.3 Typy biologické kontroly	16
3.2.2.3.1 Hyperparazitismus	17
3.2.2.3.2 Antibióza.....	18
3.2.2.3.3 Lytické enzymy.....	18
3.2.2.3.4 Další produkty mikroorganismů	19
3.2.2.3.5 Kompetice	19
3.2.2.3.6 Indukovaná rezistence.....	19
3.2.2.4 Prostředí skleníku	20
3.2.2.5 Komerční využití přípravků biologické kontroly	20
3.2.2.6 Výhody a nevýhody biologické kontroly	21
3.3 <i>Ampelomyces quisqualis</i>	22
3.3.1 Objev a zkoumání <i>Ampelomyces quisqualis</i>	23
3.3.2 Životní cyklus.....	23
3.3.2.1 Způsob přenosu	24
3.3.2.2 Přezimování <i>A. quisqualis</i>	24
3.3.3 Mechanismus interakce s padlím a hostitelskou rostlinou	25
3.3.4 Komerční využití <i>A. quisqualis</i>	26

3.3.4.1 Účinnost AQ 10	26
4 MATERIÁL A METODY	28
4.1 Použité chemikálie a roztoky	28
4.2 Použité přístroje	29
4.3 Biologický materiál	30
4.3.1 Rostlinný materiál	30
4.3.2 Izoláty padlí	30
4.3.3 <i>Ampelomyces quisqualis</i> , přípravek AQ 10	30
4.4 Kontrola životaschopnosti spor <i>Ampelomyces quisqualis</i>	31
4.5 Studium účinnosti AQ 10 na celých rostlinách napadených padlím	31
4.5.1 Mikroskopické vyhodnocení úspěšnosti přípravku AQ 10	32
4.6 Studium účinnosti AQ 10 vůči padlí na listových discích rostlin	32
4.6.1 Studium účinnosti AQ 10 na listových discích rostlin již napadených padlím	32
4.6.1.1 Mikroskopické vyhodnocení úspěšnosti přípravku AQ 10	33
4.6.2 Studium účinnosti AQ 10 na listových discích rostlin čerstvě inokulovaných padlím	33
4.6.2.1 Mikroskopické vyhodnocení úspěšnosti přípravku AQ 10	34
5 VÝSLEDKY	36
5.1 Kontrola životaschopnosti spor <i>Ampelomyces quisqualis</i>	36
5.2 Studium účinnosti AQ 10 na celých rostlinách napadených padlím	36
5.2.1 Sporulace	38
5.3 Studium účinnosti AQ 10 na listových discích rostlin již napadených padlím	39
5.4 Studium účinnosti AQ 10 na listových discích rostlin čerstvě inokulovaných padlím ..	41
5.4.1 Klíčivost konidií padlí	41
5.4.2 Počet klíčících vláken	42
5.4.3 Sporulace	44
5.4.4 Přítomnost hyperparazita <i>Ampelomyces quisqualis</i>	45
6 DISKUZE	47
7 ZÁVĚR	50
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	51
9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	59

1 ÚVOD

Padlí (zástupci řádu Erysiphales) patří mezi vřeckovýtrusé houby do třídy Leotiomycetes a jsou považovány za jedny z nejběžnějších a nejrozšířenějších parazitických houbových organismů, které infikují celou řadu rostlin. Rostlinu napadenou padlím je možno rozeznat podle bílých povlaků pokrývajících povrch částí rostlinného těla. Nejčastěji jsou padlím infikovány mladé vyvíjející se listy, stonky a výhonky, může však napadnout i starší pletiva. K výskytu prvních symptomů dochází většinou na svrchní straně listů nacházejících se ve spodní nebo střední části rostliny. Padlí může výrazně snížit produkci rostlin a ve výjimečných případech může způsobit až jejich smrt (Braun *et* Cook, 2012; Douglas, 2001).

Choroby je nutné kontrolovat a monitorovat, zejména u zemědělských plodin. Dříve byl velký důraz kladen na chemická hnojiva a pesticidy, jejichž používání je dnes kvůli špatným dopadům na životní prostředí snaha omezit. Biologická kontrola tvoří alternativu ke kontrole chemické a zahrnuje metody ochrany, které jsou šetrné k životnímu prostředí a využívají látky biologického původu. Dochází při ní k cílenému užití a aplikování živého organismu na napadenou rostlinu. Tento organismus je schopen potlačit aktivitu a snížit populaci organismu parazitujícího, což vede ke zlepšení stavu napadeného hostitele. Interakce mezi patogeny a organismy potlačujícími jejich aktivitu může mít různou formu. Zahrnuje mutualismus, protokooperaci, komenzalismus, kompetici, neutralismus, amensalismus, parazitismus a predaci (Pal *et* McSpadden Gardener, 2006).

Ampelomyces quisqualis je houbový organismus přirozeně se vyskytující na mnoha druzích padlí jako hyperparazit. Prorůstá do mycelia padlí a napadá jej zevnitř postupným rozšiřováním z buňky do buňky, čímž může dojít ke zpomalení růstu mykohostitele nebo až k jeho smrti. *Ampelomyces quisqualis* se rozmnožuje pomocí nepohlavních spor konidií, které se tvoří v pyknidách. Pyknidy vznikají uvnitř hyf, konidioforů nebo nezralých askomat hub řádu Erysiphales. Hyperparazit *Ampelomyces quisqualis* se dnes využívá jako biologický prostředek k ochraně proti padlí (Szentiványi *et* Kiss, 2003).

2 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši pojednávající o:

- Charakteristice řádu Erysiphales se zaměřením na životní cyklus a způsob rozmnožování
- Možnostech kontroly houbových organismů
 - Chemické kontrole, jejím využití a nevýhodách
 - Biologické kontrole jako alternativě ke kontrole chemické, popsání jednotlivých typů biologické kontroly
- Hyperparazitu *Ampelomyces quisqualis*, jeho způsobu využití při kontrole padlí, popsání mechanismu interakce mezi patogenem a hyperparazitem

Cílem praktické části bakalářské práce bylo:

- Udržování izolátů padlí rajčete, tykvovitých a salátu
- Aplikace komerčního přípravku AQ 10 na izoláty padlí a otestování jeho účinnosti jako přípravku biologické kontroly
- Makroskopické a mikroskopické zhodnocení účinku AQ 10 na jednotlivé druhy padlí

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Charakteristika padlí

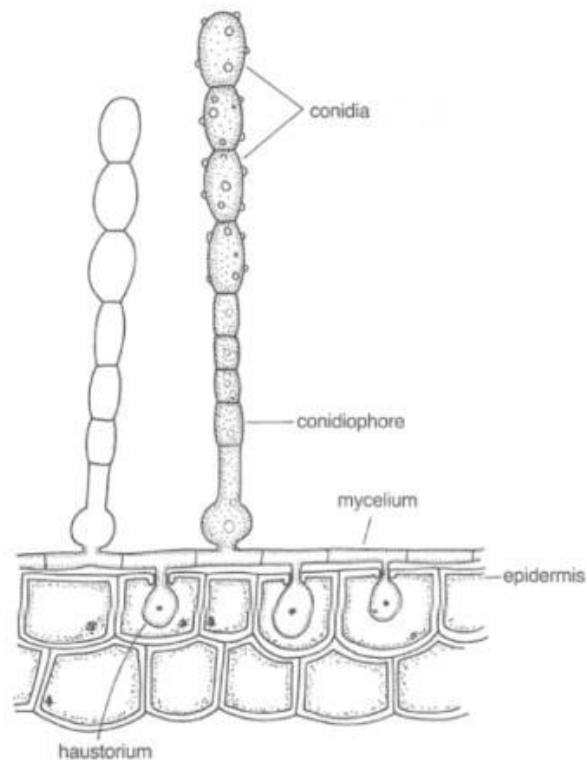
Padlí (řád Erysiphales) řadíme do říše Fungi, oddělení Ascomycota, pododdělení Pezizomycotina, třídy Leotiomycetes (Wang *et al.*, 2006). Jedná se o významnou skupinu rostlinných patogenů, které jsou velmi rozšířeny a parazitují na široké škále hostitelů. Všechny druhy padlí jsou obligátní biotrofní parazité, což znamená, že ke svému životu potřebují živého hostitele (Ridout, 2009). Kromě toho, že padlí rostlinu poškozuje z estetického hlediska, má významný vliv na snížení produkce hostitelských rostlin, například u rajčat nebo okurek. I když infekce zpravidla nekončí smrtí rostliny, představuje padlí neoddiskutovatelný problém (Douglas, 2001). Mezi nejběžnější příznaky infekce patří především bílé moučnaté povlaky na listech, stoncích a plodech. Další symptomy pak představují strupovité léze, zkroucení nově vyrůstajících výhonků, předčasná změna barvy listů a jejich opad a zpomalení celkového růstu rostliny (Douglas, 2001; Panstruga *et Schulze-Lefert*, 2002). Mnoho druhů padlí je hostitelsky specifických, ale můžeme nalézt i druhy, které napadají celou řadu hostitelů (Ale-Agha *et al.*, 2008).

3.1.1 Životní cyklus padlí

Padlí přezimuje v podobě hyf v dormantních pupenech svého hostitele nebo v podobě chasmothecií na kůře, zbylých plodech nebo opadaných listech. Obě struktury slouží jako primární inokulum pro infekci hostitelské rostliny na jaře (Maier *et Goldberg*, 2010).

3.1.1.1 Nepohlavní způsob rozmnožování

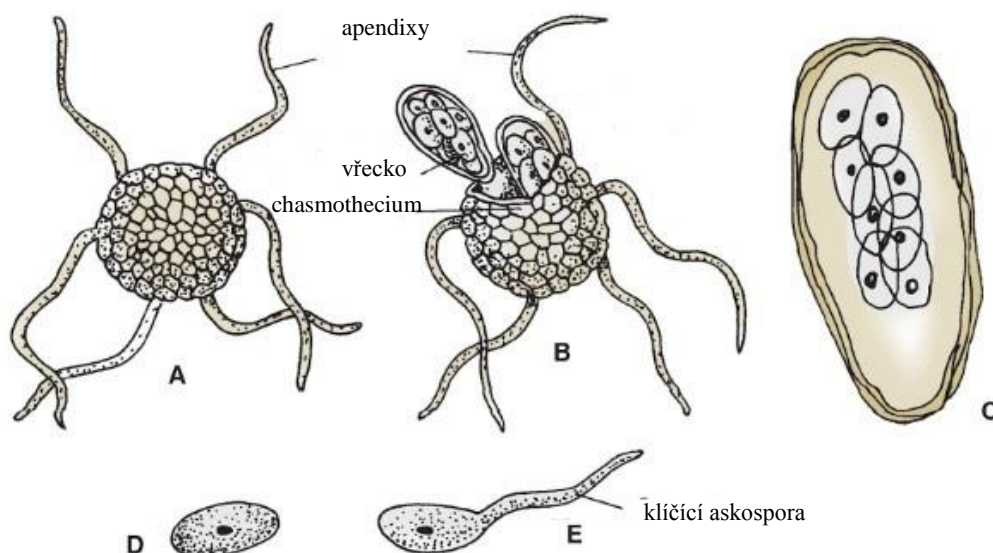
Nepohlavní rozmnožování převládá nad rozmnožováním pohlavním a probíhá pomocí nepohlavních spor konidií, které jsou produkovány v konidioforech. Konidiofory představují nosiče spor a jsou rozmístěny na listech a dalších napadených částech rostliny. Konidie mají oválný tvar a mohou být k sobě navzájem připojeny, čímž na konidioforech tvoří řetězky (viz Obr. 1). Pomocí větru následně dojde k jejich uvolnění a přenesení na dalšího hostitele. Bez hostitele jsou spory schopny přežít pouze omezenou dobu v řádu dní (Ridout, 2009). Na dalším hostiteli dochází ke klíčení spory a prorůstání do epidermálních buněk hostitele pomocí haustorií. Padlí se poté pomocí hyf rozšiřuje po hostiteli, tvoří bílé povlaky, na nichž vznikají další konidiofory produkující konidie (Douglas, 2001).



Obr. 1: Houbové mycelium prorůstající pomocí haustorií do epidermis hostitele a formující konidiofory, na nichž jsou produkovány řetězky konidií (Převzato z: Ingold *et* Hudson, 1993).

3.1.1.2 Pohlavní způsob rozmnožování

Pohlavně se houby řádu Erysiphales rozmnožují převážně v létě a začátkem podzimu. Na myceliu dochází k vytvoření samčích pohlavních orgánů, kyjovitých anteridií, a samičích pohlavních orgánů, kulovitých askogonií. Tyto orgány se nachází velmi blízko u sebe a vzájemně se ovíjejí. Následně dojde k vytvoření otvoru, kterým přechází obsah samčího anteridia do samičího askogonia. Tento proces se nazývá plazmogamie a vzniká tak tzv. dikaryon. Po určité době se z dikaryotických hyf tvoří vřecko (askus) a samčí a samičí jádra splývají. Ve vřečkách probíhá meióza a mitóza, které dávají vzniku haploidním výtrusům, askosporám (Braun *et al.*, 2002). Jak znázorňuje Obr. 2, vřečka jsou uložena v chasmotheciích, což jsou uzavřené plodnice s výběžky (apendixy), které se otevírají rozpadem a jeví se jako černé tečky rozmístěné na bílém myceliu padlí (Ingold *et* Hudson, 1993). Za vhodných podmínek, jako je dostatek vody a vhodná teplota, se chasmothecia otevřou a spory se z vřecek uvolní do okolí, kde se pomocí větru šíří na další vhodné hostitele (Ridout, 2009).



Obr. 2: (A) Uzavřené chasmothecium, (B) prasklé chasmothecium, z něhož jsou uvolňována vřecka s askosporami, (C) vřecko s osmi haploidními askosporami, (D) uvolněná askospora, (E) klíčící askospora. (Upraveno podle: Vashishta *et* Sinha, 2014).

3.1.2 Významní zástupci řádu Erysiphales

V dnešní době je popsáno asi 18 rodů v rámci řádu Erysiphales a mezi nejvýznamnější z nich řadíme rody: *Blumeria*, *Erysiphe*, *Golovinomyces*, *Phyllactinia*, *Podosphaera* a *Leveillula* (Braun *et* Cook, 2012; Ridout, 2009).

Jedním z významných zástupců je padlí travní (*Blumeria graminis*), které parazituje na travinách a obilovinách, čímž způsobuje problémy v zemědělství (Webster *et* Weber, 2007). Ječmen je napadán parazitem *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (Lyngkjær *et* Carver, 1999), naopak pšenici postihuje *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (Fraaije *et al.*, 2002). Padlí révové (*Erysiphe necator*) patří mezi nejrozšířenější onemocnění révy vinné (Gadoury *et al.*, 2012). Z rodu *Podosphaera* stojí za zmínku americká padlí angreštové (*Podosphaera mors-uvae*), jež napadá většinu zástupců rodu *Ribes*, zejména angrešt a černý rybíz (Merriman *et* Wheeler, 1968) a dále padlí jabloňové (*Podosphaera leucotricha*) napadající listy a květy jabloní (Urbanietz *et* Dunemann, 2005). Významné je i padlí tykvovitých (*Podosphaera xanthii*), jež parazituje na zástupcích čeledi tykvovité společně s *Golovinomyces orontii*. Na salátu se vyskytuje *Golovinomyces cichoracearum*, známé jako padlí čekankové (Lebeda *et al.*, 2004; Lebeda *et* Mieslerová, 2011). Ekonomicky důležité je i padlí rajčat (*Pseudoidium neolycopersici*) (O'Neill, 2014). Padlí se může vyskytovat i na okrasných rostlinách, časté je například na růžích (*Podosphaera pannosa*) (Daughtrey *et* Benson, 2005). Na stromech se

pak vyskytuje padlí dubové (*Erysiphe alphitoides*), které představuje závažné onemocnění dubů (Takamatsu *et al.*, 2007) nebo padlí javorové (*Sawadaea* spp.) (Hirose *et al.*, 2005).

3.2 Kontrola houbových chorob rostlin

Houbové organismy jsou jednou z nejčastějších příčin způsobujících význačné ztráty v zemědělství. Kontrola houbových chorob u rostlin, zejména pak zemědělských plodin, je proto nezbytná. U zemědělských plodin je nutné zachovat jejich výnosnost a kvalitu produkce. V dnešní době existuje několik způsobů, kterými je možno houbové patogeny rostlin kontrolovat (Oerke, 2006).

3.2.1 Chemická kontrola

Existuje celá řada chemických přípravků, fungicidů, proti houbovým organismům řádu Erysiphales. Tyto přípravky kontrolují onemocnění rostliny inhibicí růstu patogenu nebo jeho úplným usmrcením. Mohou být aplikovány na různá místa rostliny – semena, listy, květy, plody nebo přímo do půdy v místě, kde rostlina roste (Waard *et al.*, 1993). Při infekci padlím jsou snadno pozorovatelné bílé povlaky na povrchu rostliny, proto dochází k aplikaci fungicidů právě na tato poškozená místa. Je důležité přípravek používat opakovaně, zejména v období, kdy dochází k největšímu vývoji rostliny i napadení patogenem (Hansen, 2009).

3.2.1.1 Historie a vývoj chemické kontroly

První výskyt a použití chemické kontroly proti houbovým organismům se datuje o několik století nazpět. V 17. století došlo k potlačení růstu sněti na obilkách pšenice za pomoci roztoku soli a následném vápnění půdy, což navazovalo na pozorování, kdy obilí zachráněné z moře neobsahovalo sněť. Tyto poznatky následně rozvíjel francouzský farmář Matthieu Tillet, který spojil houbové onemocnění semen se vznikem sněti a prokázal, že může být léčeno právě pomocí roztoků soli a vápna. Další objev provedl v 19. století Francouz Millardet, který uvedl, že listy révy vinné, na něž byl aplikován postřik CuSO_4 , po celou sezónu neopadají, na rozdíl od listů rostlin bez postřiku (Morton *et* Staub, 2008).

K většímu rozvoji chemické kontroly houbových organismů došlo po druhé světové válce v 50. letech 20. století (Van Lenteren, 2000). Prvním fungicidem proti padlí byl benomyl, derivát benzimidazolu (Webster *et* Weber, 2007). Jedná se o foliární fungicid, využíval se při léčbě semen poškozených rostlin a k posklizňové kontrole. Stal se velmi oblíbeným pro jeho jednoduchost použití a dlouhotrvající účinnost. Několik let po jeho používání však došlo k prvním případům vzniku rezistence. Dalšími velmi využívanými

fungicidy proti padlí se staly morfoliny, fungicidy využívané především proti padlí obilovin, zeleniny a révy vinné (Morton *et* Staub, 2008). Hojně se využívaly taktéž 2-aminopyrimidiny (Webster *et* Weber, 2007), imidazoly, piperaziny a triazoly. Triazoly představují největší skupinu fungicidů. V roce 1973 byl na trh uveden triadimefon, dále jej následovaly triadimenol, bitertanol a prothiaconazol. Triazolové fungicidy dostaly společné pojmenování DMI (demetylační inhibitory). Další významnou skupinou jsou strobiluriny využívané především ke kontrole houbových onemocnění obilovin a luštěnin (Morton *et* Staub, 2008). Mezi novější přípravky patří quinoxifen, který nepostihuje vegetativní stádia houbových organismů, ale pouze stavy související s infekcí, např. klíčení parazita (Webster *et* Weber, 2007).

3.2.1.2 Nevýhody a rizika chemické kontroly

Chemická kontrola houbových organismů má kromě svých výhod i řadu nevýhod a komplikací. Zejména fakt, že v minulosti se spoléhalo především na chemické látky v boji s houbovými organismy, vedl až k negativním dopadům na životní prostředí a na další v něm žijící organismy. Proto je v dnešní době patrná snaha o omezení používání chemických prostředků, přičemž aplikace těch nejnebezpečnějších byla zcela zakázána (Pal *et* McSpadden Gardener, 2006).

Kromě škodlivého dopadu na okolní prostředí má chemická kontrola i další nevýhody. Často dochází k tomu, že si houbový organismus vytvoří na chemický přípravek rezistenci a není proto možné jej dále účelně používat. Chemická kontrola je také náročná na čas, kdy musíme chemikálie na napadené rostliny aplikovat opakovaně. Další nevýhodou je fakt, že musí být zachováno jisté bezpečnostní rozmezí mezi aplikací fungicidu a sklizní plodů. Ze zdravotních důvodů není možné sklizeň provádět ihned po nanesení postřiku. Fungicid může také vyvolat fytotoxický efekt, při němž dochází k ztrátám na mladých rostlinách. V neposlední řadě je také chemická kontrola kritizována veřejností (Van Lenteren, 2000).

3.2.2 Biologická kontrola

Právě kvůli negativním dopadům chemické kontroly se začala objevovat snaha o alternativní řešení. Nejvýznamnějším alternativním řešením se stala kontrola biologická. Jedná se o záměrné a účelné použití živého organismu nebo více organismů, často přirozených nepřátel, které jsou schopny potlačit aktivitu rostlinného patogenu (Pal *et* McSpadden Gardener, 2006).

Pojem biologická kontrola (nebo zkráceně biokontrola) se používá v různých odvětvích biologie, především v entomologii a rostlinné patologii (Heydari *et* Pessarakli, 2010). V entomologii, kde byl poprvé termín použit v roce 1919 H. S. Smithem (Baker, 1987), se jedná zejména o využití živého predátora (hmyzu), entomopatogenních hlístic nebo mikrobiologických patogenů k usmrcení hmyzích škůdců. V rostlinné patologii se termín biologická kontrola vztahuje především na použití mikrobiálních antagonistů k potlačení chorob (Pal *et* McSpadden Gardener, 2006) a poprvé byl použit v roce 1914 C. F. von Tubeufem (Baker, 1987). Biologická kontrola může být také vztažena na použití produktů extrahovaných nebo fermentovaných z různých přírodních zdrojů. Takovéto látky dosahují stejných nebo podobných účinků jako živé organismy. Pro přesnost by se ale měly používat spíše označení biopesticidy nebo biohnojiva (Pal *et* McSpadden Gardener, 2006). V nejužším slova smyslu se za biologickou kontrolu považuje potlačení jednoho konkrétního patogenu konkrétním antagonistou (Heydari *et* Pessarakli, 2010).

3.2.2.1 Historie biologické kontroly

Počátky intenzivnějšího studia biologické kontroly se datují přibližně 85 let nazpět. Nejprve na ni nebyl kladen velký důraz a komerční využití při ochraně rostlin nebylo považováno za reálné. V nedávné době však došlo ke značnému růstu zájmů o tuto alternativu kontroly chemické a v současnosti jsou už biologické přípravky proti patogenům rostlin normálně dostupné (Suprpta, 2012).

O biologické kontrole poprvé mluvíme roku 1908, kdy M. C. Potter demonstroval snížení aktivity rostlinných patogenů za pomoci jejich vlastních metabolitů. Zájem o podrobnější studium antagonistů podnítil objev penicilinu A. Flemingem roku 1928. První pokusy o přímou aplikaci biologických ochranných prostředků byly prováděny inokulací mikroorganismů s antagonistickými vlastnostmi do půdy (Baker, 1987). Právě z vnášení mikroorganismů potlačujících rostlinné patogeny do půdy vycházely i další studie. W. A. Millard a C. B. Taylor v roce 1927 zkoumali strupovitost brambor (způsobenou *Streptomyces scabies*), kterou se jim následně podařilo potlačit pomocí *S. praecox*. V roce 1931 G. B. Sanford a W. C. Broadfoot zjistili, že obiloviny a traviny napadené *Gaeumanomyces graminis* lze zcela ošetřit inokulací mikrobiálních antagonistů. V letech 1932 – 1941 R. Weindling poprvé použil antibiotika produkujícího antagonistu k supresi rostlinných onemocnění (Baker, 1987).

Postupem času došlo k objevu řady prostředků biologické kontroly založených na různých principech a s různými způsoby a místy aplikace (Cook, 1993).

3.2.2.2 Interakce mezi organismy přispívající k biologické kontrole

V průběhu svého života rostliny i jejich patogeny interagují se spoustou dalších organismů. Všechny tyto interakce ovlivňují zdraví organismu a jeho biologickou kontrolu (Pal *et* McSpadden Gardener, 2006).

Mutualismus je vzájemné ovlivňování dvou organismů, ze kterého mají oba jedinci prospěch. Jedná se například o mykorhizu, interakci mezi kořeny vyšších rostlin a houbovým organismem, při níž dochází k větší výživě rostliny, která je pak odolnější vůči patogenům (Pal *et* McSpadden Gardener, 2006). Další formou je protokooperace, kdy organismy mají z interakce prospěch, ale není nezbytná k přežití. Mnoho prostředků biologické kontroly lze považovat za fakultativní mutualisty účastnící se protokooperace. Rostlina a mikroorganismy mohou být ve vztahu komenzalismu, kde jeden z organismů profituje a druhý není ovlivněn. Při neutralismu nedochází k žádnému ovlivnění sledovaných organismů. Naopak antagonismus, velmi využívaný při biologické kontrole, má za následek poškození jednoho nebo obou partnerů. Kompetici můžeme pozorovat mezi patogeny a nepatogeny, které soutěží o živiny a místo na hostitelské rostlině. Parazitismus se z pohledu biologické kontroly využívá v podobě hyperparazitů, organismů parazitujících na patogenech rostlin (Pal *et* McSpadden Gardener, 2006).

Všechny tyto výše zmíněné interakce se mohou podílet na výsledné biologické kontrole.

3.2.2.3 Typy biologické kontroly

V biologické kontrole se nejčastěji uplatňují mikrobiální antagonisté, kteří interagují s rostlinnými patogeny a potlačují jejich aktivitu, růst a vývoj. Mluvíme buď o přímém antagonismu, kdy dochází k vzájemnému fyzickému kontaktu mezi antagonistou a patogenem, a vyznačuje se velkou selektivitou (Heydari *et* Pessarakli, 2010). Na rozdíl od toho nepřímý antagonismus nevyžaduje cílení antagonisty na patogen a jejich přímý kontakt, jedná se především o stimulaci různých obranných mechanismů rostliny (Nega, 2014).

Jednotlivé typy biologické kontroly založené na přímém a nepřímém antagonismu, případně jejich kombinaci, jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 1).

Tab. 1: Mechanismy biologické kontroly rozdělené podle typu antagonismu (Upraveno podle: Pal *et* McSpadden Gardener, 2006).

Typ antagonismu	Mechanismus	Příklady
Přímý antagonismus	Hyperparazitismus/predace	mykoviry
		<i>Ampelomyces quisqualis</i>
		<i>Lysobacter enzymogenes</i> <i>Pasteuria penetrans</i>
Smíšený antagonismus	Antibiotika	2,4-diacetylfluoroglucin (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)
		Fenaziny (<i>P. fluorescens</i>)
		Cyklické lipopeptidy (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)
	Lytické enzymy	Chitinázy (<i>Bacillus mycoides</i> , <i>B. pumilus</i>)
		Glukanázy (<i>Bacillus mycoides</i> , <i>B. pumilus</i>)
		Proteázy (<i>Trichoderma harzianum</i>)
	Neregulované odpadní produkty	NH ₃ (<i>Enterobacter cloacae</i>)
		HCN (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)
	Fyzikální a chemické interference	Zablokování půdních pórů
		Potlačení klíčení spor
Nepřímý antagonismus	Kompetice	Spotřeba exudátů
		Obsazení ekologické niky
	Indukce hostitelské rezistence	Kontakt s buněčnými stěnami houby
		Detekce s patogenem spojených molekulárních systémů
		Fytohormonální indukce

3.2.2.3.1 Hyperparazitismus

Hyperparazitismus je jev, kdy dochází k napadání primárních parazitů dalšími organismy, sekundárními parazity neboli hyperparazity (Parratt *et* Laine, 2016). Hyperparazity můžeme dělit na obligátní parazity, fakultativní parazity, hypoviry a predátory (Ouda, 2014). Obligátní parazité zcela závisí na hostiteli a nemohou bez jeho přítomnosti žít, zatímco fakultativní parazité mohou existovat i samostatně (Leinhos *et* Buchenauer, 1992). Predace je na rozdíl od parazitismu obecnějšího charakteru, je méně specifická a její účinky v biologické kontrole jsou obtížněji usměrňovány (Pal *et* McSpadden Gardener, 2006).

Hyperparazity můžeme dělit do dvou tříd v závislosti na způsobu jejich parazitace. Nekrotrofní rostlinné patogeny jsou hyperparazity napadány na již mrtvých rostlinných tkáních nebo dokonce při jejich saprofytických stádiích v půdě. Znamená to, že interakce mezi rostlinou a parazitem a parazitem a hyperparazitem se děje v různých časových obdobích. Naopak biotrofní rostlinné patogeny nemají žádná saprofytická stádia a přežívají

pouze na živých rostlinných tkáních. V takovýchto případech dochází k nové interakci, a to mezi hyperparazitem a hostitelem (rostlinou). Hyperparazit tak přežívá na rostlinné tkáni, kde následně napadá patogeny škodící rostlině (Kiss, 2001).

Mezi významné hyperparazity napadající padlí řadíme houbové organismy *Ampelomyces* spp., *Cephalosporium* spp., *Cladosporium* spp., *Trichothecium* spp., *Acremonium* spp. a *Trichoderma* spp. (Kiss, 2003).

3.2.2.3.2 Antibióza

Jedná se o biologický proces, při němž antagonisté produkují látky, které potlačí aktivitu rostlinného patogenu nebo jej úplně usmrtí (Di Francesco *et al.*, 2016). Aby došlo k cílenému účinku, musí být antibiotika produkována v dostatečném množství a v blízkosti patogenu, na který působí (Pal *et McSpadden Gardener*, 2006). Látky s antibiotickými účinky mohou produkovat bakterie nebo houby. Mezi takové bakterie řadíme například *Agrobacterium radiobacter* uvolňující Agrocin 84 (Weller, 1988), *Pseudomonas fluorescens* produkující fenaziny (Thomashow *et Weller*, 1988) nebo rod *Bacillus* (Junaid *et al.*, 2013). Houby, jež jsou schopny produkce látek s antibiotickými účinky (a lze je použít v biologické kontrole), řadíme do dvou rodů. Konkrétně se jedná o rod *Pseudozyma* a *Tilletiopsis* (Kiss, 2003). *Pseudozyma* představuje sněti řádu Ustilaginales a nachází využití především jako prostředek proti různým druhům padlí parazitujícím například na okurkách, růžích nebo pšenici. Produkují mastné kyseliny, které pronikají do buněk padlí a tam napadají buněčné membrány, což vede k rozkladu buňky (Avis *et Bélanger*, 2002). Sněti rodu *Tilletiopsis* jsou taktéž významnými antagonisty padlí a podílí se na jeho biologické kontrole. I přestože primárním mechanismem je produkce antibiotik, vyskytuje se u rodu *Tilletiopsis* také mechanismus hyperparazitismu (Kiss, 2003).

3.2.2.3.3 Lytické enzymy

Mikroorganismy sekretují a exkretují různé látky a metabolity, jejichž produkce může negativně působit na růst a vývoj rostlinných patogenů. Často jsou takto produkovány a uvolňovány lytické enzymy hydrolázy, které dovedou rozložit širokou škálu polymerních struktur – chitin, proteiny, celulózu, hemicelulózu a DNA (Junaid *et al.*, 2013). Mezi hydrolázy řadíme například chitinázy a β -1,3-glukanázy rozkládající důležité komponenty buněčné stěny houbových organismů, chitin a β -1,3-glukan (Singh, 2014).

Mezi nejvíce studované houbové organismy parazitující na rostlinných patogenech a produkující výše zmíněné enzymy patří především *Trichoderma* spp. a *Gliocladium virens*

(Herrera-Estrella *et al.*, 1999). *Trichoderma harzianum* uvolňuje celou řadu chitináz a β -1,3-glukanáz, jenž mají potenciál při využití v biologické kontrole (Viterbo *et al.*, 2002).

3.2.2.3.4 Další produkty mikroorganismů

Za zmínku stojí produkce kyanovodíku některými bakteriemi rodu *Pseudomonas*. HCN je vysoce toxický pro všechny aerobní mikroorganismy a způsobuje blokaci cytochrom oxidázové dráhy (Pal *et al.*, 2006). *Pseudomonas fluorescens* CHA0 tvoří řadu metabolitů, z nichž je nejvýznamnějším právě HCN, který dovede potlačit hnilobu kořene tabáku (Voisard *et al.*, 1989).

3.2.2.3.5 Kompetice

Organismy biologické kontroly mohou soutěžit s rostlinnými parazity o místo a živiny na hostitelské rostlině a tak přispívat ke snížení onemocnění. Mechanismus kompetice je obtížné sledovat, protože neexistují žádné prostředky k určení významu jednotlivých partnerů podílejících se na interakci (Janisiewicz *et al.*, 2000).

Kořenový systém rostlin je významným zdrojem uhlíku, proto jsou kořeny obsazovány nejrůznějšími mikroorganismy, včetně patogenů, které musí o místo soupeřit. Takováto kompetice je využívána k biologické kontrole půdních patogenů rodu *Fusarium* a *Pythium* (Singh, 2014). Limitujícím faktorem je také množství železa. Většina mikroorganismů v prostředí s nízkou koncentrací tohoto prvku produkuje látky siderofory, které dovedou vázat železo. K boji proti takovým patogenům se využívají antagonisté se schopností taktéž produkovat siderofory vážící železo, čímž značně zhorší životní podmínky pro patogeny (Verschuere *et al.*, 2000). Jako antagonistu se zde využívá bakterie rodu *Pseudomonas* (Leong, 1986).

Kompetici není možné aplikovat na kontrolu padlí, protože ekologická nika, kterou padlí zaujímá, může být obsazena pouze patogeny (Kiss, 2003).

3.2.2.3.6 Indukovaná rezistence

Prostředky biologické kontroly produkují nejrůznější chemické stimuly, které v rostlině vedou ke spuštění mechanismu indukované rezistence. Dochází tak ke vzniku rezistence proti rostlinným patogenům (Van Loon, 1997). Existují tři různé typy takovéto rezistence – systémově získaná rezistence (SAR), indukovaná systémová rezistence (ISR) a lokálně získaná rezistence (LAR) (Edreva, 2004; Singh, 2014). SAR je rezistence indukovaná přímo patogeny a je zprostředkována pomocí kyseliny salicylové, jež je produkována krátce

po začátku infekce a vede k aktivaci tzv. PR proteinů (pathogenesis related proteins) (Ryals *et al.*, 1996). Mezi PR proteiny řadíme např. chitinázy a β -1,3-glukanázy a mnoho dalších, jako třeba peroxidázy, ribonukleázy, endoproteázy (Di Francesco *et al.*, 2016; Van Loon *et al.*, 1999). ISR je rezistence, která je indukována přítomností nepatogenních mikroorganismů rhizosféry podílejících se tak na biologické kontrole (Kuč, 2001). ISR je docíleno pomocí produkce kyseliny jasmonové a/nebo ethylenu (Singh, 2014). LAR je rezistence, která se liší od SAR a ISR vyskytuje pouze v místech, kde došlo k infekci patogenem, a nedochází k zapojení celého systému jako právě u SAR a ISR (Edreva, 2004).

3.2.2.4 Prostředí skleníku

Biologická kontrola dosahuje nejlepších výsledků v místech, kde lze snadno regulovat podmínky, jako je teplota a vlhkost. Nejvhodnější je prostředí skleníku. Skleníky jsou relativně izolované jednotky, především v období zimy. Právě v zimě může dojít k vyhubení všech parazitů a tento stav je možno udržet i po několik měsíců. Na rozdíl od vnějšího prostředí se ve sklenících vyskytuje méně parazitujících organismů, a proto je nutné aplikovat pouze malé množství přirozených antagonistů (Van Lenteren *et al.*, 1988). Přípravky biologické kontroly mohou být nanášeny v různých fázích růstu rostlin. Díky malé ploše a větší hustotě osázení je možné použít menší množství inokula, než by vyžadovala kontrola polních rostlin (Paulitz *et al.*, 2001).

Většina přirozených antagonistů je řazena mezi prostředky integrované ochrany proti škůdcům (IPM, integrated pest management). Jedná se o systém ochrany rostlin, kdy je využíváno daných technik ke snížení a kontrole jednotlivých parazitů (Kogan, 1998). V roce 2000 bylo 5 % celosvětové skleníkové plochy pod IPM ochranou a lze předpokládat, že procentuální hodnota od té doby vzrostla. Stejně tak roste i podíl biologické kontroly v rámci IPM programu, kde původně dominovaly chemické insekticidy a fungicidy (Van Lenteren, 2000).

3.2.2.5 Komerční využití přípravků biologické kontroly

Cesta přípravků biologické kontroly ke komerčnímu používání je dlouhý proces. Na rozdíl od biokontroly hmyzích škůdců je biokontrola rostlinných onemocnění poměrně novou záležitostí. Prvním objeveným mikrobiálním antagonistou byla bakterie *Agrobacterium radiobacter* kmen K84 registrovaná v roce 1979 v USA, potlačující vznik nádorů způsobených *Agrobacterium tumefaciens*. Prvním registrovaným houbovým organismem byla o deset let později houba *Trichoderma harzianum* ATTC 20476. Od té doby došlo k registraci

dalších mikrobiálních antagonistů, které jsou dnes používány jako komerčně prodávané prostředky (Fravel, 2005).

Prvním krokem je screening, který zahrnuje hledání antagonisty v patosystému. Neexistuje žádný daný postup při hledání (Fravel, 2005). Vhodné je však sledovat takový patosystém, v němž se onemocnění nevyskytuje, i když by na základě určitých faktorů mělo. Následujícím krokem je pak izolace antagonisty z rostlinné tkáně (Schisler *et* Slininger, 1997). Dále je žádoucí porozumět principu, jakým antagonista na patogen působí, aby mohlo dojít k optimalizaci kontroly, případně k nalezení více účinných kmenů. Poté je nutné provést testy v prostředí, ve kterém bude daný přípravek používán. Testy jsou realizovány za různých podmínek v odlišných lokacích a během rozdílných období. Pokud vykazuje biologická kontrola účinnost, je pro její uvedení na trh nezbytná registrace. V USA je tento úkon regulován třemi zákony – Federal Food, Drug and Cosmetic Act (FFDCA), Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act (FIFRA) a Food Quality Protection Act (FQPA) (Fravel, 2005). V České republice k tomu slouží zákon č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů, jak uvádí Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ).

Po celém světě se dnes prodává mnoho nejrůznějších biologických přípravků proti rostlinným patogenům. Firmy vyrábějící tyto přípravky jsou taktéž rozmístěny po celém světě, zejména ale ve vyspělých zemích (McSpadden Gardener *et* Fravel, 2002). Antagonistou v přípravku mohou být jak bakterie, tak houby. Bakterie *Agrobacterium radiobacter* je obsažena v přípravcích Galltrol a Nogall, *Bacillus* spp. v Companion, Kodiak a HiStick N/T, *Pseudomonas* spp. v BioJect Spot-Less, Bio-save a BlightBan, *Streptomyces* spp. v Actinovate a Mycostop. Houbové organismy obsahuje přípravek AQ 10, konkrétně houbu *Ampelomyces quisqualis*. Dále například *Trichoderma* spp. a *Gliocaldium* spp. představují antagonisty v přípravcích Root shield, Plant shield, T-22 Planter box, Soilgard a Primastop (McSpadden Gardener *et* Fravel, 2002). V České republice je k dostání také přípravek Polyversum Biogarden jehož aktivním organismem je houba *Pythium oligandrum* (Zahradníková *et* Zahradník, 2016).

3.2.2.6 Výhody a nevýhody biologické kontroly

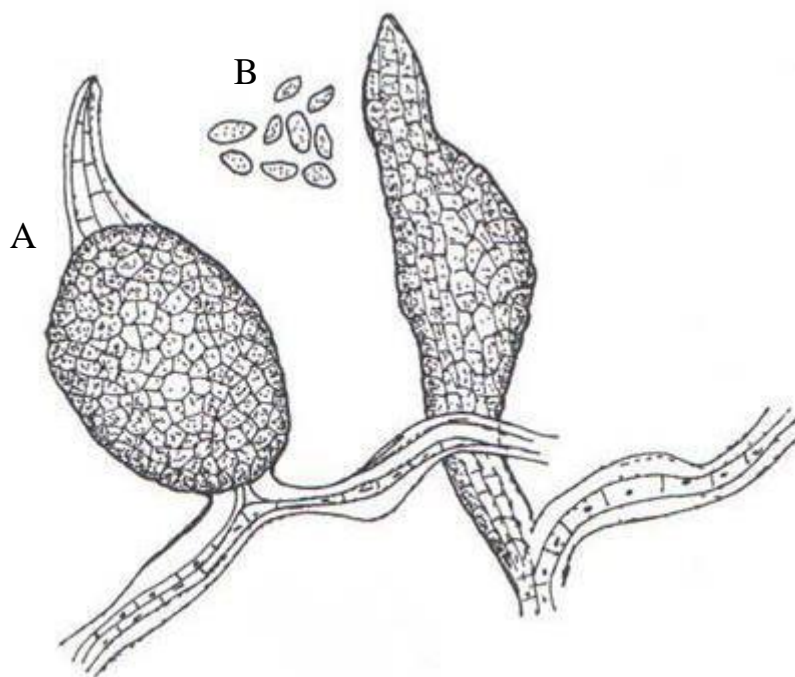
Výhody a nevýhody biologické kontroly se nejčastěji uvádějí v porovnání s kontrolou chemickou (Bale *et al.*, 2008).

Mezi výhody nesporně patří fakt, že biologická kontrola, která představuje přirozeně se vyskytující antagonisty rostlinných parazitů, není pro prostředí nijak toxická. Při použití chemických pesticidů může docházet k vyhubení nejen parazitujících organismů, ale také jiných neškodlivých přirozeně se vyskytujících organismů. Na rozdíl od chemické kontroly také není možné, aby došlo k vytvoření rezistence. Dalším přínosem je, že ve většině případů není nutné biologické přípravky aplikovat opakovaně (Bale *et al.*, 2008). Mezi aplikací prostředku a sklizní nemusí docházet k bezpečnostním časovým odstupům, jako při používání pesticidů (Van Lenteren *et Woets*, 1998).

Biologická kontrola však také vykazuje jistá negativa a omezení. Potlačení aktivity parazitů po aplikování antagonistů trvá delší dobu než při použití chemické kontroly. Dochází pouze k regulaci a snížení negativních účinků parazita, kdežto pesticidy dovedou škodlivé mikroorganismy eradikovat. Je však sporné, zda se jedná o pozitivum nebo negativum z toho důvodu, že eradikace proběhne pouze lokálně a následně může dojít ke znovu napadení parazitem (Bale *et al.*, 2008). Právě při situacích, kdy je nutný rychlý nástup účinku (u rostlin s krátkou dobou růstu) nebo úplné vyléčení (u okrasných rostlin) se využívá chemických pesticidů. Biologická kontrola je velmi závislá na podmínkách prostředí a může se stát, že v daných podmínkách ji nebude možné vůbec použít. S určitými omezeními se tato kontrola setkává také z těch důvodů, že na trhu stále přetrvávají prostředky kontroly chemické a firmy projevují pouze malý zájem o produkci prostředků s přirozenými antagonisty (Van Lenteren *et Woets*, 1998). V neposlední řadě jsou biologické prostředky považovány za méně spolehlivé a jejich účinky více nepředvídatelné než účinky pesticidů (Simberloff *et Stiling*, 1996).

3.3 *Ampelomyces quisqualis*

Ampelomyces quisqualis je vřeckovýtrusá houba tvořící nepohlavní plodnice pyknidy. Jedná se o přirozeně se vyskytujícího intracelulárního mykoparazita padlí po celém světě (Kiss, 2008). Parazituje jak na pohlavních, tak nepohlavních strukturách padlí, kde napadá velké plochy a soutěží o živiny, čímž zapříčiní smrt patogenu. Vyskytuje se pouze v anamorfním stádiu, rozmnožuje se tedy jen nepohlavně (Gautam *et Avasthi*, 2016). Protože *Ampelomyces quisqualis* napadá primárního parazita rostliny, mluvíme o hyperparazitismu. Dochází k jeho proniknutí dovnitř patogenu, kde v jeho hyfách, konidioforech a chasmotheciích tvoří pyknidy, ve kterých dozrávají spory, konidie (viz Obr. 3) (Gautam *et Avasthi*, 2016).



Obr. 3: Anamorfní forma *Ampelomyces quisqualis*. (A) Pyknida, (B) konidie. (Upraveno podle: Gautam *et Avasthi*, 2016)

3.3.1 Objev a zkoumání *Ampelomyces quisqualis*

V roce 1852 došlo k prvnímu popsání houbového organismu *Ampelomyces quisqualis* italským botanikem Cesatim. Poté docházelo k podrobnějším studiím tohoto organismu, a to především vědcem De Barym, který prokázal fakt, že *Ampelomyces quisqualis* prorůstá do mycelia padlí, kde produkuje pyknidy (Kiss *et al.*, 2004). S využitím v biologické kontrole poprvé přišel C. E. Yarwood v roce 1932, když zjistil, že právě hyperparazit *Ampelomyces quisqualis* je zodpovědný za potlačení padlí jetelového na jeteli lučním (Yarwood, 1932).

Po provedení potřebných testů došlo ke komercializaci hyperparazita a k vyvinutí přípravku AQ 10 firmou Ecogen Inc. Přípravek AQ 10 obsahuje konidie izolátu *Ampelomyces quisqualis* ve formě ve vodě rozpustných granulí (Kiss, 2003). K patentování přípravku došlo v USA v roce 1993 izraelským vědcem Abrahamem Sztejnbergem (Sztejnberg, 1993).

3.3.2 Životní cyklus

Životní cyklus hyperparazita *Ampelomyces quisqualis* je v dnešní době poměrně dobře prostudovaný (Szentiványi *et Kiss*, 2003).

A. quisqualis může růst saprofytický po krátkou dobu, k delšímu přežití je však nezbytné, aby druh parazitoval na padlí. K vyklíčení a k infikování hostitelského organismu potřebuje dostatek vody. K napadení padlí hyperparazitem může dojít za méně než 24 hodin při teplotě 25 °C. *A. quisqualis* prorůstá dovnitř do mycelia hostitele. Napadené kolonie padlí jsou matné, zploštělé a našedlé (Angeli *et al.*, 2009). Uvnitř hostitele se tvoří pyknidy, konkrétně je možné je nalézt v buňkách hyf, konidioforů a nezralých askomat (chasmothecií) (Kiss *et al.*, 2004). V pyknidách dochází k produkci spor konidií, které jsou jednobuněčné, hyalinní, kapkovitého tvaru a jsou uchyceny v extracelulárním slizovém matrix pyknidy. V přítomnosti vody se matrix zvětší a po prasknutí pyknidiální stěny se konidie začnou uvolňovat v podobě cirru (prosakující kapky) (Kiss, 2008). Pro klíčení konidií je velmi důležitá vysoká vlhkost. Pokud je tato podmínka splněna, za 10 – 20 hodin začínají spory klíčit a vzniklé hyfy napadají patogena a prorůstají dovnitř jeho vláken. Po 5 – 8 dnech se začnou tvořit intracelulární pyknidy a celý proces se opakuje (Kiss *et al.*, 2004). Pohlavní rozmnožování nebylo u hyperparazita *A. quisqualis* pozorováno (Kiss, 2008).

3.3.2.1 Způsob přenosu

Spory nebo části hyf *A. quisqualis* mohou být přenášeny na velké vzdálenosti, konkrétně až několik desítek kilometrů. Konidie uvolněná z hostitelského padlí může po přenosu napadat padlí stejného, ale i jiného druhu. Tento jev testovali Kiss *et al.* (2011), když vedle jabloní, jejichž pupeny obsahovaly *A. quisqualis*, umístili rostliny okurky a tabáku infikované padlím (*Podosphaera xanthii* a *Golovinomyces orontii*). Po 3 letech studie bylo prokázáno, že došlo k úspěšné infekci padlí na okurkách hyperparazitem *A. quisqualis*. U padlí tabákového se tento fakt prokázal po 4 letech. Bylo také zjištěno, že padlí jabloňové (*Podosphaera leucotricha*) může být napadeno jak kmeny *A. quisqualis* typicky napadající právě padlí jabloňové, tak i kmeny jinými.

Na krátké vzdálenosti jsou konidie přenášeny za pomoci vody (Kiss, 2008).

3.3.2.2 Přezimování *A. quisqualis*

Na rozdíl od poměrně dobře zmapovaného životního cyklu houbového organismu *Ampelomyces quisqualis* se o způsobu jeho přezimování donedávna příliš mnoho nevědělo (Kiss, 2008). Zpočátku se předpokládalo, že organismus přezimuje v podobě morfologicky odlišných tmavších pyknid, které se tvoří saprofytický na podzim (Yarwood, 1939). Studie, kterou provedli Falk *et al.* (1995) vyvrátila, že by tyto pyknidy byly klíčové pro přezimování. Došlo ale ke zjištění, že *A. quisqualis* je schopen zimu přežít uvnitř parazitovaných

chasmothecií na kůře révy vinné. Na jaře pak dochází k uvolnění životaschopných konidií, které mohou začít klíčit.

Další studii provedli Szentiványi *et* Kiss (2003), kteří sledovali přezimování *A. quisqualis* parazitující na *Podosphaera leucotricha* na jabloních a na dalších druzích padlí. Byly prokázány dva způsoby, jakým může hyperparazit zimu přežít. Buď v podobě pyknid, produkovaných jak v askomatech, tak i v konidioforech, nebo ve formě tlustostěnných klidových hyf v suchém myceliu padlí pokrývajícím rostlinu. Kromě toho jsou za dostatku vody schopny začít klíčit i prázdné pyknidy.

3.3.3 Mechanismus interakce s padlím a hostitelskou rostlinou

Primární parazité rostlin napadají a poškozují svého hostitele různými způsoby, kdežto u sekundárních parazitů jako je *A. quisqualis* dochází k přímému proniknutí do hostitelského organismu a destrukci jeho cytoplazmy (Kiss, 2008). *A. quisqualis* potlačuje jak pohlavní, tak nepohlavní produkci spor u napadeného padlí tím, že rozruší konidiofory a nezralá askomata (Kiss *et al.*, 2004). Hashioka *et* Nakai (1980) uvedli, že *A. quisqualis* takto nejprve parazituje na živém hostiteli, ale s postupem času, kdy dochází k napadání cytoplazmy, hostitel umírá a parazitismus je nadále nekrotrofní. Celý proces se odehrává bez přítomnosti a produkce jakýchkoliv toxinů.

Na interakci mezi hyperparazitem *Ampelomyces quisqualis* a houbovým organismem řádu Erysiphales se podílí lytické enzymy napomáhající degradaci buněčné stěny hostitele (Angeli *et al.*, 2012). Rotem *et al.* (1999) zjistili, že *A. quisqualis* dovede produkovat exo- β -1,3-glukanázu, což hraje významnou roli při mykoparazitismu. Tento enzym je kódován genem *exgA* a ten je exprimován především před dozráváním pyknid. V mladém myceliu a ve zralých pyknidách se gen neexprimuje. Studie provedená Angelim *et al.* (2012) ukázala, že kromě glukanázové aktivity má *A. quisqualis* také aktivitu proteázovou.

Vztah mezi hostitelskou rostlinou, padlím a mykoparazitem *A. quisqualis* je příkladem tritrofické interakce (Kiss *et al.*, 2004). Přítomnost mykoparazita na myceliu padlí vede k potlačení negativních vlivů, které padlí na rostlinu má. Abo-Foul *et al.* (1996) provedli experiment s rostlinami okurek napadenými padlím, kdy část těchto rostlin byla dále infikována *A. quisqualis* a další část nikoli. Listy okurek bez následné inokulace mykoparazitem vykazovaly známky nekrózy a chlorózy. Naopak rostliny okurek, jež byly následně ošetřeny *A. quisqualis*, se mnohem více podobaly rostlinám zdravým. Pomocí elektronové mikroskopie bylo dále zjištěno, že jejich chloroplasty nejsou poškozeny a obsah chlorofylu je podobný jako u zdravých rostlin.

3.3.4 Komerční využití *A. quisqualis*

V 70. letech minulého století poprvé došlo k intenzivnímu zkoumání mykoparazita *Ampelomyces quisqualis* za účelem vytvoření přípravku biologické kontroly proti padlí, přičemž bylo testováno několik různých kmenů *A. quisqualis* (Kiss *et al.*, 2004). Jako nejvhodnější se ukázal kmen AQ 10 (nebo M-10) izolovaný z *Oidium* sp. v Izraeli, který byl následně svým objevitelem Sztejnbergem patentován (Legler *et al.*, 2016; Sztejnberg, 1993). V roce 1995 produkt AQ 10 obdržel registraci od Agentury pro ochranu životního prostředí (EPA) a mohl být uveden na trh (Kiss *et al.*, 2004). V Evropě se produkt poprvé objevil v roce 1999, kdy došlo k jeho registraci v Itálii (Legler *et al.*, 2011).

Kromě AQ 10 jsou na trhu dostupné i jiné méně známější přípravky působící proti padlí a obsahující hyperparazita *Ampelomyces quisqualis*. Jedná se například o Q-fect, kde je uplatněn kmen 94013 a používá se především proti padlí okurkovému (Lee *et al.*, 2004; Siozios *et al.*, 2015). Dalším přípravkem je pak POWDERYCARE (Siozios *et al.*, 2015).

Přípravek AQ 10 je k dostání ve formě ve vodě rozpustných granulí s konidii. V 1 g AQ 10 je obsaženo nejméně 5×10^9 životaschopných spor hyperparazita *A. quisqualis*. Pro dosažení efektivního účinku musí být dodržovány doporučené instrukce pro aplikaci. Léčba přípravkem AQ 10 musí započít už v raných stádiích vývoje padlí. Nanášení přípravku na listy poškozené rostliny by se mělo opakovat v intervalech po 6 – 8 dnech a pro docílení co největší pravděpodobnosti vyklíčení spor je nutné aplikaci provádět za vysoké okolní vlhkosti. Samotná aplikace probíhá ve formě aerosolu po důkladném rozmíchání granulí ve vodě (Biogard, [b. r.]).

3.3.4.1 Účinnost AQ 10

Výsledky studií, zda je AQ 10 efektivní, se ukázaly jako rozporuplné (Kiss *et al.*, 2004). V některých případech byla konidiální suspenze při potlačení padlí účinná (Pasini *et al.*, 1997; Rajković *et al.*, 2010), v jiných ale nedošlo k cílenému účinku, přestože kolonie padlí byly napadeny mykoparazitem *A. quisqualis*. Infekce mykoparazitem pak nedovedla znatelně snížit množství padlí parazitujícího na rostlině, ale došlo ke zmenšení množství inokula, které kolonie padlí vytváří (Shishkoff *et McGrath*, 2002). Samotný výrobce přípravku doporučuje AQ 10 používat pouze jako prevenci ještě před napadením organismu padlím nebo v jeho raných stádiích. *A. quisqualis* se tedy užívá jako součást integrované ochrany proti škůdcům (IPM), což umožňuje fakt, že je kompatibilní s řadou chemických fungicidů proti padlí (Kiss *et al.*, 2004). Jedná se například o fungicidy pyrazofos (Sztejnberg

et al., 1989), triforin (Sundheim, 1982), triadimefon a myclobutanil (Shishkoff *et* McGrath, 2002), které doplňují léčbu přípravkem AQ 10.

Efektivita AQ 10 může být zvýšena také přidáním adjuvantů, látek, které zlepšují působení prostředků kontroly a vytváří pro ně vhodné podmínky (Ryckaert *et al.*, 2007; Shishkoff *et* McGrath, 2002). Adjuvant AddQ dovede zvýšit schopnost hyperparazita napadat kolonie padlí tím, že zpomaluje odpařování vody ze suspenze (Shishkoff *et* McGrath, 2002). Dalšími možnými adjuvanty jsou Nu Film 17 a Nu Film P, které chrání aplikovaný AQ 10 před nepříznivými podmínkami jako je například déšť nebo vítr (Rajković *et al.*, 2010).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Použité chemikálie a roztoky

Anilinová modř 1% roztok (Sigma-Aldrich)

CDA – Czapek Dox Agar (HiMedia)

Destilovaná voda

Glycerol bezvodý (PENTA)

Kyselina octová 99%, (PENTA)

4.2 Použité přístroje

Analytické váhy (Sartorius)

Mikroskop OLYMPUS BX60 s digitální CCD kamerou DP73

Světelný mikroskop OLYMPUS CHK2-F-GS

Software OLYMPUS CellSens

4.3 Biologický materiál

4.3.1 Rostlinný materiál

K provedení experimentu byly použity tři genotypy rostlin a to rajče jedlé (*Solanum lycopersicum* cv. Amateur), meloun cukrový (*Cucumis melo* cv. Solartur) a locika kompasová (*Lactuca serriola* LSE/57/15).

Semena jednotlivých genotypů výše zmíněných rostlin byla vyseta do plastových květináčů o průměru 7 cm naplněných perlitem. Poté byly květináče umístěny do fytotronu, kde byla udržována fotoperioda 12h/12h (den/noc) a stálá teplota 20/18 °C (den/noc). Semenáčky ve stádiu dvou pravých lístků byly přesazeny do nových květináčů se směsí zahradní zeminy/rašeliny (2:1, v:v). Následně na to došlo k přemístění květináčů do skleníku s fotoperiodou shodnou s venkovními světelnými podmínkami a teplotou 25/20 °C (den/noc). K experimentu byly použity rostliny ve stáří 4 – 8 týdnů.

4.3.2 Izoláty padlí

K inokulaci rostlin byly použity příslušné izoláty padlí pěstované na rostlinách ve fytotronech Katedry botaniky PřF UP v Olomouci – Holicí. Konkrétně se jednalo o padlí rajčat (*Pseudoidium neolycopersici* UPOC-FUN-193) udržované na rajčeti jedlém (*Solanum lycopersicum* cv. Amateur), padlí tykvovitých (*Podosphaera xanthii* Px 13/08) udržované na melounu cukrovém (*Cucumis melo* cv. Solartur) a padlí čekankové (*Golovinomyces cichoracearum* GC 15/16) udržované na locice kompasové (*Lactuca serriola* LSE/57/15). Infikované rostliny byly chráněny igelitovými kryty, aby nedocházelo k volnému šíření konidií a umístěny do fytotronu s teplotou 20/18 °C a fotoperiodou 12h/12h (den/noc).

Inokulace probíhala kontaktní metodou, a to otiskem neinfikovaného listu s napadeným listem. Po 2 – 3 týdnech vždy došlo k reinokulaci, kdy bylo padlí přeneseno na nové rostliny za účelem udržování stálého množství inokula padlí pro experimenty.

4.3.3 *Ampelomyces quisqualis*, přípravek AQ 10

Ke studiu potlačení vývoje padlí byl použit přípravek AQ 10 obsahující spory *Ampelomyces quisqualis* (izolát M-10) firmy Biogard. Přípravek je prodáván ve formě ve vodě rozpustných granulí, v 1 g těchto granulí je obsaženo 5×10^9 spor. Přípravek není registrován v České republice, ale k dostání je ve Slovenské republice.

Pro aplikaci je nutné rozpustit granule ve vodě a vytvořit tak suspenzi, čehož se docílí mícháním po dobu 30 minut. Výrobce uvádí použití 35 – 50 g přípravku AQ 10 a

500 – 1000 l vody na 1 ha plochy se zemědělskými plodinami. Tyto hodnoty (50 g na 500 l) byly použity k výpočtu množství AQ 10 potřebného pro vytvoření suspenze o objemu 500 ml.

$$\text{Hmotnost AQ 10 (0,5 l)} = \frac{\text{hmotnost AQ 10 (1 ha)} * 0,5 \text{ l}}{\text{objem vody (1 ha)}}$$

K přípravě suspenze bylo tedy použito 500 ml destilované vody, v níž bylo rozpuštěno 0,05 g přípravku AQ 10.

4.4 Kontrola životaschopnosti spor *Ampelomyces quisqualis*

Kontrola životaschopnosti spor *Ampelomyces quisqualis* byla provedena inokulací suspenze AQ 10 (připravené podle výše popsaného návodu) na Petriho misku obsahující Czapek Dox Agar. Pro přípravu CDA bylo naváženo 49 g přípravku do 1000 ml destilované vody, která byla následně zahřívána až do úplného rozpuštění. Poté byla provedena sterilizace v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Připravené médium bylo rozlito na Petriho misku, kde došlo k jeho ztuhnutí. Médium bylo připraveno pracovníky Katedry botaniky PřF UP.

Na připravený agar na Petriho misce byl pipetou přenesen 1 ml suspenze AQ 10 a pomalým kroužením byl rozprostřen po celé ploše. Nadbytek suspenze byl posléze slit. Petriho miska byla ponechána k inkubaci ve fytotronu při teplotě 20/18 °C a fotoperiodě 12h/12h (den/noc).

Kontrola byla provedena po 3,7 a 14 dnech vizuálně, ale také mikroskopicky.

4.5 Studium účinnosti AQ 10 na celých rostlinách napadených padlím

K provedení experimentu byly použity rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* cv. Amateur) a lociky kompasové (*Lactuca serriola* LSE/57/15) ve stáří 8 týdnů a rostliny melounu cukrového (*Cucumis melo* cv. Solartur) ve stáří 4 týdny.

Tyto rostliny byly inokulovány příslušným padlím (*P. neolycopersici*, *G. cichoracearum* a *P. xanthii*) pomocí kontaktní metody, kdy došlo k přitisknutí zdravého listu na list rostliny pokryté sporulujícím myceliem padlí. Infikované rostliny byly chráněny igelitovými kryty, aby nedocházelo k volnému šíření konidií a umístěny do fytotronu s teplotou 20/18 °C a fotoperiodou 12h/12h (den/noc).

Aplikace přípravku AQ 10 byla provedena 3 týdny po inokulaci padlím, kdy padlí již bylo plně vyvinuto a tvořilo více pustulí nebo pokrývalo souvislým povlakem větší část listu. Bylo použito celkem 6 rostlin jednoho druhu, přičemž vždy 3 napadené rostliny daného druhu byly ošetřeny pomocí suspenze AQ 10, která byla aplikována rozprašovačem na listy, a další

3 rostliny posloužily jako kontrola. Rostliny byly následně umístěny do oddělených misek, zakryty igelitovými kryty a umístěny do fytotronu, kde byly ponechány po dobu 1 týdnu.

Po uplynutí doby došlo k vizuální kontrole množství padlí rostoucího na listech a srovnání rostlin, na které byl aplikován AQ 10, s kontrolami. Následně byl proveden odběr 5 listových disků o průměru 15 mm z listů všech tří druhů rostlin ošetřených AQ 10, stejně jako z kontrolních rostlin napadených padlím (bez aplikace AQ 10). Tyto disky byly vloženy do lahvíček naplněných 99% kyselinou octovou. V kyselině octové byly listové disky ponechány vždy po dobu 48 hodin, přičemž došlo k jejich odbarvení. Poté byly disky přesunuty do nových lahvíček naplněných glycerolem, kde byly ponechány až do mikroskopického vyhodnocení.

4.5.1 Mikroskopické vyhodnocení úspěšnosti přípravku AQ 10

Z glycerolu byly listové disky přemístěny na podložní sklíčko, kde byly nabarveny 1% roztokem anilinové modři po dobu přibližně 3 minut. Anilinová modř barví pouze chitinové struktury houbových organismů a zlepšuje tak jejich viditelnost pod mikroskopem. Po uplynutí doby barvení byl vzorek překryt krycím sklíčkem a barvivo bylo vymyto vodou a odsáto.

Houbové struktury na discích byly poté prohlíženy pod mikroskopem při zvětšení 100x a 400x. Byla sledována přítomnost nebo nepřítomnost hyperparazita *Ampelomyces quisqualis*. U každého listového disku byl také hodnocen počet konidioforů padlí a bylo provedeno rozdělení do čtyř kategorií:

- 0 – 10^1 konidioforů na disku
- 10^1 – 10^2 konidioforů na disku
- 10^2 – 10^3 konidioforů na disku
- $> 10^3$ konidioforů na disku

4.6 Studium účinnosti AQ 10 vůči padlí na listových discích rostlin

4.6.1 Studium účinnosti AQ 10 na listových discích rostlin již napadených padlím

Ke sledování účinků hyperparazita *Ampelomyces quisqualis* na padlí byla využita metoda odběru listových disků. Listové disky byly vyseknuty korkovrtem z listů napadených rostlin rajčete jedlého (*S. lycopersicum* cv. Amateur), melounu cukrového (*C. melo* cv. Solartur) a lociky kompasové (*L. serriola* LSE/57/15) přibližně 3 týdny po jejich inokulaci příslušným druhem padlí (*P. neolyopersici*, *P. xanthii* a *G. cichoracearum*). Z každého druhu bylo použito minimálně 5 rostlin.

Z listů každého ze tří druhů rostlin bylo vyseknuto celkem 20 disků o průměru 15 mm, které byly umístěny na Petriho misky na buničitou vatu a filtrační papír navlhčený destilovanou vodou a následně byly ošetřeny postřikem suspenze AQ 10. Listové disky byly odebrány po 4 časových intervalech (vždy 5 listových disků v daný časový interval) (Tab. 2). Petriho misky byly umístěny ve fytotronu při teplotě 20/18 °C a fotoperiodě 12h/12h (den/noc).

Tab. 2 Uspořádání experimentu s listovými disky (již napadenými padlím) a doba působení přípravku AQ 10

Varianta	Odebrané listové disky pro každý genotyp rostlin a izolát padlí	Délka působení přípravku AQ 10
1.	5 disků, kontrola (bez ošetření)	-
2.	5 disků, ošetřeno přípravkem AQ 10	24 hodin
3.	5 disků, ošetřeno přípravkem AQ 10	96 hodin
4.	5 disků, ošetřeno přípravkem AQ 10	168 hodin

Po uplynutí dané doby působení byly listové disky přemístěny do příslušné lahvičky obsahující 99% kyselinu octovou. Následně bylo nutné listové disky přesunout do nových lahviček naplněných glycerolem, kde byly ponechány až do provedení mikroskopického vyhodnocení.

4.6.1.1 Mikroskopické vyhodnocení úspěšnosti přípravku AQ 10

Listové disky byly vyňaty z glycerolu a umístěny na podložní sklo, kde byly barveny 1% roztokem anilinové modři. Následně byly pozorovány pod mikroskopem, přičemž byl hodnocen počet konidioforů padlí a zjištěné hodnoty byly rozděleny do čtyř kategorií: $< 10^1$, $10^1 - 10^2$, $10^2 - 10^3$ a $> 10^3$. Dále byla taktéž sledována přítomnost či nepřítomnost hyperparazita *Ampelomyces quisqualis* a jeho interakce s myceliem padlí.

4.6.2 Studium účinnosti AQ 10 na listových discích rostlin čerstvě inokulovaných padlím

Podstatou tohoto experimentu bylo studium účinku preparátu AQ 10 aplikovaného současně s inokulací padlím na listových discích zdravých rostlin. Listové disky byly vyseknuty korkovrtem z 5 zdravých rostlin rajčete jedlého (*S. lycopersicum* cv. Amateur), melounu cukrového (*C. melo* cv. Solartur) a lociky kompasové (*L. serriola* LSE/57/15). Z každého genotypu rostliny bylo vyseknuto celkem 30 listových disků o průměru 15 mm. Disky byly umístěny na Petriho misky na navlhčenou buničitou vatu a filtrační papír.

Celkových 30 disků bylo vždy rozděleno na dvě Petriho misky – na každou z nich bylo umístěno 15 disků ve třech řadách po 5 discích.

Na všechny listové disky byl nainokulován příslušný druh padlí (*P. neolycopersici*, *P. xanthii* a *G. cichoracearum*) dotykem disku a napadené rostliny, které byly pěstovány ve fytotronu a byly na nich udržovány izoláty padlí. Následně proběhla aplikace roztoku AQ 10 na 15 listových disků (jednu Petriho misku) daného druhu rostliny. Zbýlých 15 disků sloužilo jako kontrola. V následující tabulce (Tab. 3) je zaznamenáno schéma rozložení disků na miskách společně s délkou působení AQ 10.

Tab. 3: Uspořádání experimentu s listovými disky a doba působení přípravku AQ 10

	Varianta	Odebrané listové disky pro každý genotyp rostliny a izolát padlí	Délka působení AQ 10 (doba odběru)
15 disků (inokulace padlím + aplikace AQ 10)	1.	5 disků	24 hodin
	2.	5 disků	96 hodin
	3.	5 disků	192 hodin
15 disků (kontrola, inokulace padlím)	1.	5 disků	24 hodin (bez aplikace AQ 10)
	2.	5 disků	96 hodin (bez aplikace AQ 10)
	3.	5 disků	192 hodin (bez aplikace AQ 10)

Vždy po uplynutí doby dané v tabulce byly příslušné listové disky odebrány do lahviček naplněných 99% kyselinou octovou, kde byly ponechány po dobu 48 hodin a poté byly přemístěny do glycerolu.

4.6.2.1 Mikroskopické vyhodnocení úspěšnosti přípravku AQ 10

Listové disky byly následně obarveny 1% roztokem anilinové modři a pozorovány pod mikroskopem. U odběrů s časovým intervalem 24 hpi byla jedním z hodnocených parametrů klíčivost konidií padlí, kdy byl stanoven poměr naklíčených konidií k celkovému počtu konidií na listovém disku. Dále byl sledován počet klíčících vláken na konidii u klíčících konidií na discích. U odběrů s časovým intervalem 96 hpi byl hodnocen pouze počet klíčících vláken na konidii u klíčících konidií. Pro daný genotyp/časový interval bylo hodnoceno celkem 100 konidií, tedy 20 konidií na každém listovém disku. U genotypů s časovým intervalem 192 hpi byl semikvantitativní metodou hodnocen počet konidioforů padlí

(intenzita sporulace). Zjištěné hodnoty byly rozděleny do čtyř kategorií: $< 10^1$, $10^1 - 10^2$, $10^2 - 10^3$ a $> 10^3$.

Hodnocení bylo prováděno jak u disků, na něž byla aplikována suspenze AQ 10, tak u kontrol, kde byla provedena pouze inokulace padlím. Následně došlo k porovnání hodnot.

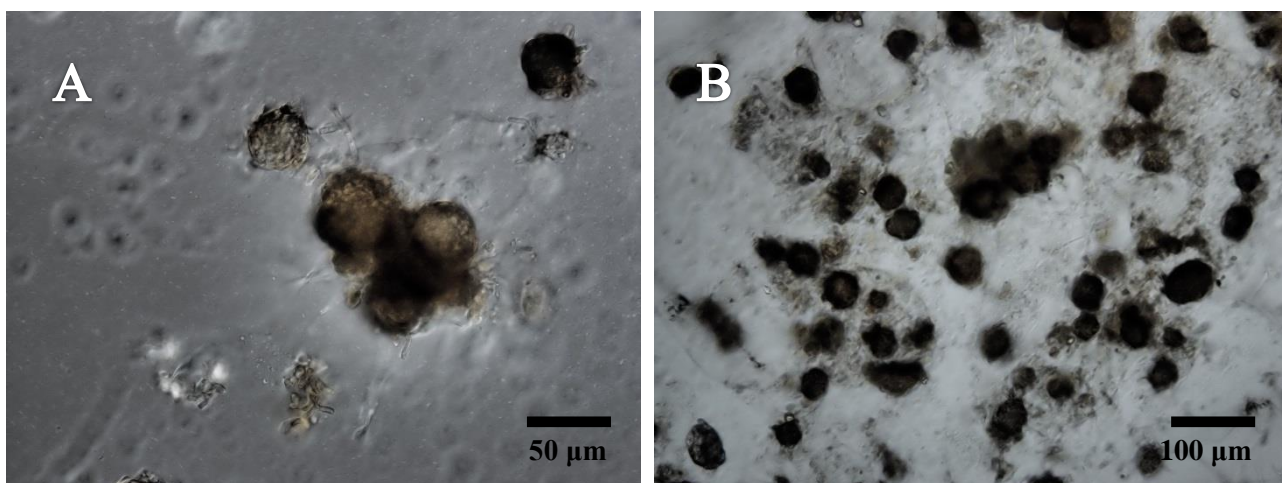
Kromě výše zmíněného bylo na listových discích sledováno, zda je přítomen hyperparazit *Ampelomyces quisqualis*, jeho vývoj a případná interakce s myceliem padlí.

5 VÝSLEDKY

5.1 Kontrola životaschopnosti spor *Ampelomyces quisqualis*

Kontrola životaschopnosti spor *Ampelomyces quisqualis* byla provedena inkubací suspenze spor na Czapek Dox Agar ve fytotronu při teplotě 20/18 °C a fotoperiodě 12h/12h (den/noc). Hodnocení bylo prováděno po 3, 7 a 14 dnech, přičemž s postupem času byl na misce pozorován zintenzivňující se nahnědlý povlak rostoucího hyperparazita *Ampelomyces quisqualis*. Došlo taktéž k mikroskopickému vyhodnocení, kdy byly již po 7 dnech po zahájení inkubace pod mikroskopem při zvětšení 200x a 400x pozorovány narostlé pyknidy *A. quisqualis* (Obr. 4).

Došlo tedy k ověření, že přípravek AQ 10 (izolát M-10) firmy Biogard obsahuje životaschopné spory, které jsou schopny v podmínkách daných fytotrotem klíčit, rozvíjet mycelium a utvářet pyknidy.



Obr. 4: Pyknidy hyperparazita *Ampelomyces quisqualis* na Czapek Dox Agar pozorované při zvětšení 400x (A) a 200x (B) 7 dní po zahájení inkubace

5.2 Studium účinnosti AQ 10 na celých rostlinách napadených padlím

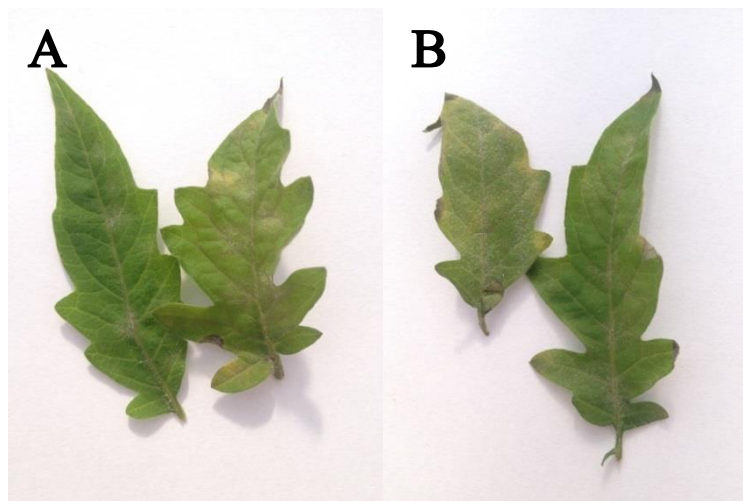
Pro test byly použity rostliny lociky kompasové (*Lactuca serriola* LSE/57/15) a rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* cv. Amateur) ve stáří 8 týdnů a rostliny melounu cukrového (*Cucumis melo* cv. Solartur) ve stáří 4 týdny. Nejprve proběhla inokulace rostlin příslušným padlím (*G. cichoracearum*, *P. neolycopersici* a *P. xanthii*) a až poté v odstupe 3 týdnů došlo k aplikování přípravku AQ 10.

Po 1 týdnu bylo provedeno makroskopické vyhodnocení, kdy došlo k porovnání rostlin, na které byl aplikován AQ 10, s kontrolními rostlinami, jež AQ 10 ošetřeny nebyly.

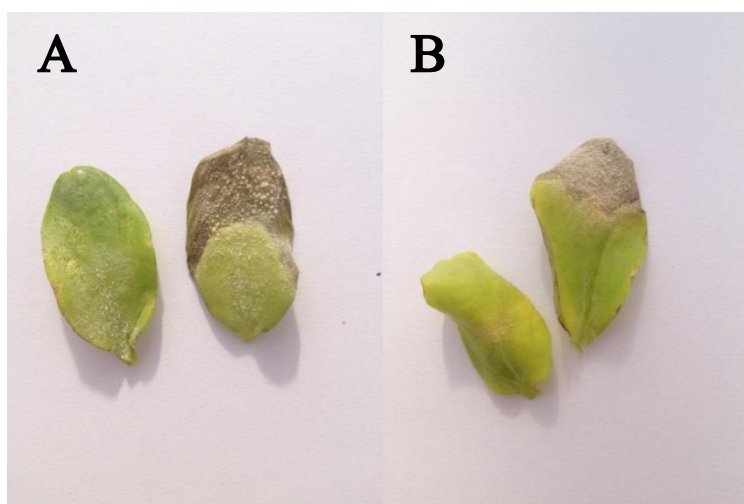
Na listech rostlin nainokulovaných padlím se v místě inokulace objevovaly charakteristické bílé moučnaté povlaky. Tyto rostliny (Obr. 5A, 6A a 7A) nebyly ošetřeny přípravkem AQ 10 a byly využity jako kontrola. U rostlin, na které byl po 3 týdnech od inokulace padlím aplikován přípravek AQ 10, ovšem taktéž docházelo k výskytu padlí v podobě bílých povlaků v nezměněné podobě ve srovnání s kontrolou. Bylo tomu tak u všech tří druhů padlí a rostlin využitých k experimentu – padlí čekankového (*G. cichoracearum*) na locice kompasové (*Lactuca serriola* LSE/57/15), padlí rajčatového (*P. neolycopersici*) na rajčeti jedlém (*Solanum lycopersicum* cv. Amateur) a padlí tykvovitých (*P. xanthii*) na melounu cukrovém (*Cucumis melo* cv. Solartur) (Obr. 5B, 6B a 7B). Po vizuální stránce se rostliny, na něž byl aplikován AQ 10, nijak výrazně nelišily od rostlin kontrolních.



Obr. 5: Listy lociky kompasové (*Lactuca serriola* LSE/57/15) napadené padlím *G. cichoracearum* bez aplikace přípravku AQ 10 (A) a 7 dní po aplikaci přípravku AQ 10 (B).



Obr. 6: Listy rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* cv. Amateur) napadené padlím *P. neolycopersici* bez aplikace přípravku AQ 10 (A) a 7 dní po aplikaci přípravku AQ 10 (B).



Obr. 7: Děložní listy melounu cukrového (*Cucumis melo* cv. Solartur) napadené padlím *P. xanthii* bez aplikace přípravku AQ 10 (A) a 7 dní po aplikaci přípravku AQ 10 (B).

5.2.1 Sporulace

Z listů rostlin ošetřených AQ 10 byly vyseknuty listové disky, které byly následně barveny anilinovou modří a pozorovány při zvětšení 100x a 400x. Semikvantitativní metodou byla stanovena intenzita sporulace (počet konidioforů padlí). Jak je patrné z tabulky (Tab. 4), intenzita sporulace na discích byla vysoká, pozorované padlí bylo nepoškozené a vytvářelo velké množství konidioforů. Průměrná hodnota intenzity sporulace byla u padlí na locice kompasové a melounu cukrovém stanovena na $> 10^3$ konidioforů. U padlí na rostlinách

rajčete jedlého byla průměrná sporulace menší, $10^2 - 10^3$ konidioforů. Na listových discích nebyly pozorovány žádné struktury hyperparazita *Ampelomyces quisqualis*. Intenzita sporulace padlí (i počet konidioforů) byla srovnatelná jako u rostlin napadených padlím bez aplikace přípravku AQ 10 (Tab. 5).

Tab. 4: Intenzita sporulace (počet konidioforů) padlí (*G. cichoracearum*, *P. neolyopersici* a *P. xanthii*) na vybraných genotypech rostlin po aplikaci přípravku AQ 10 na celé rostliny s intervalem 168 hpi

Varianta	Sporulace 168 hpi		
	Průměr	Min	Max
<i>G. cichoracearum</i> na <i>L. serriola</i> + AQ 10	$> 10^3$	$10^2 - 10^3$	$> 10^3$
<i>P. neolyopersici</i> na <i>S. lycopersicum</i> + AQ 10	$10^2 - 10^3$	$10^2 - 10^3$	$> 10^3$
<i>P. xanthii</i> na <i>C. melo</i> + AQ 10	$> 10^3$	$10^2 - 10^3$	$> 10^3$

Tab. 5: Intenzita sporulace (počet konidioforů) padlí (*G. cichoracearum*, *P. neolyopersici* a *P. xanthii*) na vybraných genotypech rostlin bez aplikace přípravku AQ 10 (kontrola) s intervalem 168 hpi

Varianta (kontrola)	Sporulace 168 hpi		
	Průměr	Min	Max
<i>G. cichoracearum</i> na <i>L. serriola</i>	$> 10^3$	$10^2 - 10^3$	$> 10^3$
<i>P. neolyopersici</i> na <i>S. lycopersicum</i>	$> 10^3$	$10^2 - 10^3$	$> 10^3$
<i>P. xanthii</i> na <i>C. melo</i>	$> 10^3$	$> 10^3$	$> 10^3$

5.3 Studium účinnosti AQ 10 na listových discích rostlin již napadených padlím

K provedení testu byly použity listové disky napadených rostlin lociky kompasové (*L. serriola* LSE/57/15), rajčete jedlého (*S. lycopersicum* cv. Amateur) a melounu cukrového (*C. melo* cv. Solartur) přibližně 3 týdny po jejich inokulaci příslušným druhem padlí (*G. cichoracearum*, *P. neolyopersici* a *P. xanthii*). Na listové disky byla aplikována suspenze AQ 10, a takto ošetřené listové disky byly odebrány po 24, 96 a 168 hpi.

Mikroskopicky bylo provedeno vyhodnocení intenzity sporulace padlí na všech listových discích. Z následujících tabulek (Tab. 6, 7 a 8) je patrné, že množství konidioforů příslušného druhu padlí se s rostoucí dobou působení přípravku AQ 10 neměnilo, a to

u žádného z použitých druhů. Výrazně se podobalo kontrole (Tab. 9), tzn. listovým diskům, na které AQ 10 aplikován nebyl. Průměrná hodnota sporulace byla ve všech případech stanovena na $10^2 - 10^3$ konidioforů. Konidiofory padlí se na všech hodnocených listových discích jevíly zdravé a nepoškozené. Přítomnost hyperparazita *Ampelomyces quisqualis* nebyla zaznamenána ani v jednom případě.

Tab. 6: Intenzita sporulace (počet konidioforů) padlí (*G. cichoracearum*, *P. neolycopersici* a *P. xanthii*) na vybraných genotypech rostlin po aplikaci přípravku AQ 10 s intervalem 24 hpi

Varianta	Sporulace 24 hpi		
	Průměr	Min	Max
<i>G. cichoracearum</i> na <i>L. serriola</i> + AQ 10	$10^2 - 10^3$	$10^2 - 10^3$	$> 10^3$
<i>P. neolycopersici</i> na <i>S. lycopersicum</i> + AQ 10	$10^2 - 10^3$	$10^2 - 10^3$	$> 10^3$
<i>P. xanthii</i> na <i>C. melo</i> + AQ 10	$10^2 - 10^3$	$10^1 - 10^2$	$10^2 - 10^3$

Tab. 7: Intenzita sporulace (počet konidioforů) padlí (*G. cichoracearum*, *P. neolycopersici* a *P. xanthii*) na vybraných genotypech rostlin po aplikaci přípravku AQ 10 s intervalem 96 hpi

Varianta	Sporulace 96 hpi		
	Průměr	Min	Max
<i>G. cichoracearum</i> na <i>L. serriola</i> + AQ 10	$10^2 - 10^3$	$10^2 - 10^3$	$10^2 - 10^3$
<i>P. neolycopersici</i> na <i>S. lycopersicum</i> + AQ 10	$10^2 - 10^3$	$10^1 - 10^2$	$> 10^3$
<i>P. xanthii</i> na <i>C. melo</i> + AQ 10	$10^2 - 10^3$	$10^2 - 10^3$	$10^2 - 10^3$

Tab. 8: Intenzita sporulace (počet konidioforů) padlí (*G. cichoracearum*, *P. neolycopersici* a *P. xanthii*) na vybraných genotypech rostlin po aplikaci přípravku AQ 10 s intervalem 168 hpi

Varianta	Sporulace 168 hpi		
	Průměr	Min	Max
<i>G. cichoracearum</i> na <i>L. serriola</i> + AQ 10	$10^2 - 10^3$	$10^2 - 10^3$	$> 10^3$
<i>P. neolycopersici</i> na <i>S. lycopersicum</i> + AQ 10	$10^2 - 10^3$	$10^2 - 10^3$	$> 10^3$
<i>P. xanthii</i> na <i>C. melo</i> + AQ 10	$10^2 - 10^3$	$10^2 - 10^3$	$> 10^3$

Tab. 9: Intenzita sporulace (počet konidioforů) padlí (*G. cichoracearum*, *P. neolycopersici* a *P. xanthii*) na vybraných genotypech rostlin bez aplikace AQ 10 (kontrola) s intervalem 168 hpi

Varianta (kontrola)	Sporulace 168 hpi		
	Průměr	Min	Max
<i>G. cichoracearum</i> na <i>L. serriola</i>	$10^2 - 10^3$	$10^2 - 10^3$	$10^2 - 10^3$
<i>P. neolycopersici</i> na <i>S. lycopersicum</i>	$10^2 - 10^3$	$10^2 - 10^3$	$> 10^3$
<i>P. xanthii</i> na <i>C. melo</i>	$10^2 - 10^3$	$10^2 - 10^3$	$> 10^3$

5.4 Studium účinnosti AQ 10 na listových discích rostlin čerstvě inokulovaných padlím

K provedení následujícího testu účinnosti AQ 10 byly použity listové disky rostlin lociky kompasové (*L. serriola* LSE/57/15), rajčete jedlého (*S. lycopersicum* cv. Amateur) a melounu cukrového (*C. melo* cv. Solartur). Inokulace příslušným druhem padlí (*G. cichoracearum*, *P. neolycopersici* a *P. xanthii*) proběhla až po vyseknutí listových disků. Zároveň byla provedena aplikace přípravku AQ 10 na tyto právě nainokulované disky. Takto ošetřené listové disky (a kontrolní disky bez aplikace AQ 10) byly odebrány po 24, 96 a 192 hpi a následně došlo k mikroskopickému vyhodnocení.

5.4.1 Klíčivost konidií padlí

Klíčovost konidií padlí byla hodnocena pouze u variant po 24 hodinách po inokulaci. Na každém listovém disku bylo hodnoceno celkem 100 spor padlí a byl stanoven poměr klíčících spor ke sporám neklíčícím. Výsledné procento klíčivosti padlí na discích po aplikaci AQ 10 bylo následně porovnáno s klíčivostí na kontrolních discích (bez aplikace AQ 10). Po působení AQ 10 byla nejvyšší klíčivost konidií padlí zaznamenána u druhu *P. xanthii* na melounu cukrovém (*C. melo* cv. Solartur) a naopak nejmenší klíčivost u *G. cichoracearum* na locice kompasové (*L. serriola* LSE/57/15). To souhlasilo s klíčivostí padlí u kontrolních variant, kdy procento klíčivosti bylo taktéž u *P. xanthii* na melounu cukrovém nejvyšší a u *G. cichoracearum* na locice kompasové nejnižší. Jak je patrné z tabulky (Tab. 10), klíčivost konidií padlí u kontrolních variant, kde nebyl aplikován přípravek AQ 10, byla vždy vyšší, než u listových disků, kdy přípravek AQ 10 použit byl.

Tab. 10: Klíčivost (%) konidií padlí (*G. cichoracearum*, *P. neolycopersici* a *P. xanthii*) na vybraných genotypech rostlin s i bez aplikace AQ 10 24 hodin po inokulaci

Varianta	Klíčovost 24 hpi [%] Průměr ± SD (min – max)	
	s AQ 10	kontrola
<i>G. cichoracearum</i> na <i>L. serriola</i>	15,4 ± 6,12 (9 – 25)	25,6 ± 7,83 (17 – 35)
<i>P. neolycopersici</i> na <i>S. lycopersicum</i>	19,6 ± 2,6 (17 – 23)	31,2 ± 16,02 (15 – 50)
<i>P. xanthii</i> na <i>C. melo</i>	25,2 ± 12,56 (12 – 39)	41,8 ± 26,79 (11 – 68)

5.4.2 Počet klíčících vláken

Počet klíčících vláken na konidii byl sledován u vzorků 24 a 96 hpi. Na každém listovém disku bylo vyhodnoceno celkem 20 klíčících konidií padlí, celkově tedy 100 konidií v jedné experimentální variantě. Na listových discích 24 hodin po inokulaci padlím a aplikaci AQ 10 převažovaly konidie s jedním klíčícím vláknem u všech studovaných patosystémů. Na kontrolních listových discích, kde neproběhla aplikace AQ 10, v případě rajčete jedlého a melounu cukrovém bylo zaznamenáno více konidií padlí s dvěma klíčovými vlákny. U lociky salátové bylo i u kontrolních variant zaznamenáno více konidií pouze s jedním klíčícím vláknem. Na listových discích 24 hodin po inokulaci se nevyskytovaly žádné konidie s třemi klíčovými vlákny.

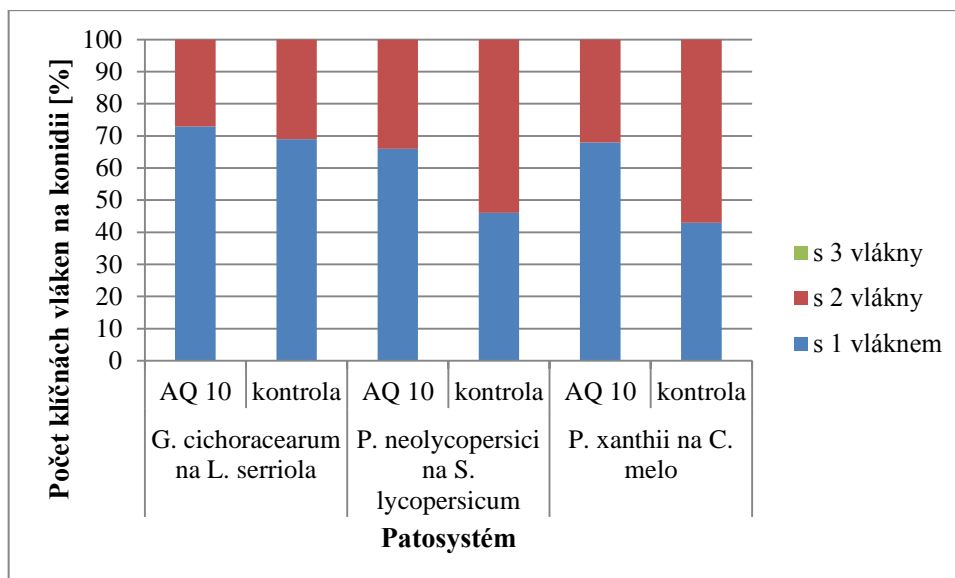
Na listových discích 96 hodin po inokulaci a aplikaci AQ 10 došlo u všech patosystémů k zaznamenání výskytu konidií padlí s třemi klíčovými vlákny, zatímco počet konidií s dvěma klíčovými vlákny zůstal podobný a počet konidií pouze s jedním klíčícím vláknem se snížil. Na kontrolních listových discích všech testovaných druhů rostlin se vyskytovalo podstatně více konidií padlí se dvěma nebo třemi klíčovými vlákny než na discích, na které byl aplikován přípravek AQ 10, u nichž stále mírně převažovaly konidie s jedním klíčícím vláknem. Tyto údaje jsou uvedeny v tabulkách 11 a 12 a zobrazeny v grafech 1 a 2.

Tab. 11: Počet klíčnicích vláken na konidii padlí (*G. cichoracearum*, *P. neolycopersici* a *P. xanthii*) na vybraných genotypech rostlin s i bez aplikace AQ 10 24 hodin po inokulaci

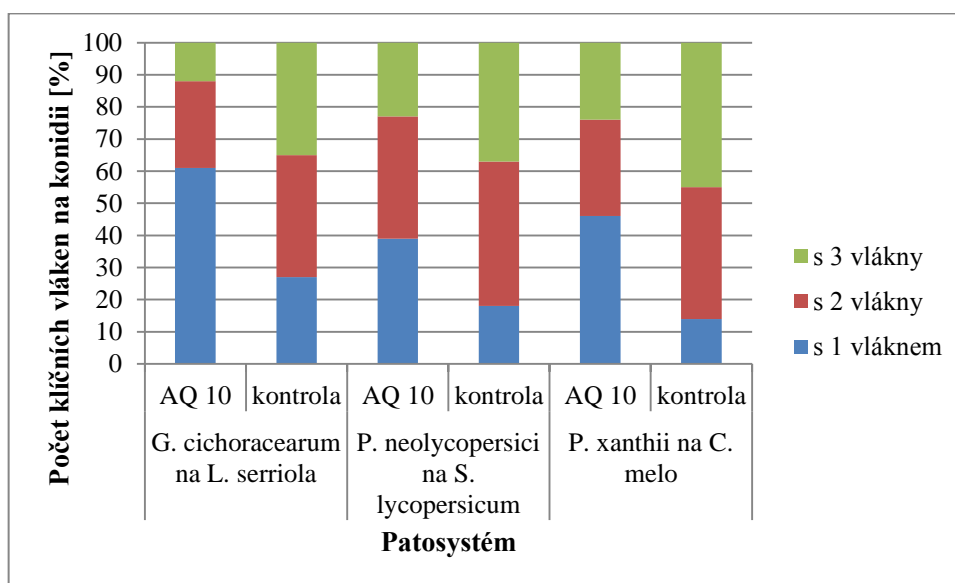
Varianta	Počet konidií 24 hpi		
	s 1 vláknem	s 2 vlákny	s 3 vlákny
<i>G. cichoracearum</i> na <i>L. serriola</i> + AQ 10	73	27	0
<i>P. neolycopersici</i> na <i>S. lycopersicum</i> + AQ 10	66	34	0
<i>P. xanthii</i> na <i>C. melo</i> + AQ 10	68	32	0
<i>G. cichoracearum</i> na <i>L. serriola</i>	69	31	0
<i>P. neolycopersici</i> na <i>S. lycopersicum</i>	46	54	0
<i>P. xanthii</i> na <i>C. melo</i>	43	57	0

Tab. 12: Počet klíčnicích vláken na konidii padlí (*G. cichoracearum*, *P. neolycopersici* a *P. xanthii*) na vybraných genotypech rostlin s i bez aplikace AQ 10 96 hodin po inokulaci

Varianta	Počet konidií 96 hpi		
	s 1 vláknem	s 2 vlákny	s 3 vlákny
<i>G. cichoracearum</i> na <i>L. serriola</i> + AQ 10	61	27	12
<i>P. neolycopersici</i> na <i>S. lycopersicum</i> + AQ 10	39	38	23
<i>P. xanthii</i> na <i>C. melo</i> + AQ 10	46	30	24
<i>G. cichoracearum</i> na <i>L. serriola</i>	27	38	35
<i>P. neolycopersici</i> na <i>S. lycopersicum</i>	18	45	37
<i>P. xanthii</i> na <i>C. melo</i>	14	41	45



Graf 1: Počet klíčných vláken na konidiích padlí (*G. cichoracearum*, *P. neolyopersici* a *P. xanthii*) na vybraných genotypoch rostlin s i bez aplikace AQ 10 24 hodin po inokulaci



Graf 2: Počet klíčných vláken na konidiích padlí (*G. cichoracearum*, *P. neolyopersici* a *P. xanthii*) na vybraných genotypoch rostlin s i bez aplikace AQ 10 96 hodin po inokulaci

5.4.3 Sporulace

U všech patosystémů hodnocených 192 hpi byla stanovena semikvantitativní metodou intenzita sporulace padlí (počet konidioforů). U listových disků, na něž byl aplikován přípravek AQ 10, byla průměrná hodnota sporulace $10^1 - 10^2$ u *G. cichoracearum* na locice kompasové a *P. neolyopersici* na rajčeti jedlém, u *P. xanthii* na melounu cukrovém to byla hodnota $10^2 - 10^3$. V případě padlí *G. cichoracearum* a *P. neolyopersici* byl v některých

případech počet konidioforů velmi malý ($0 - 10^1$). Je proto možné říci, že padlí *G. cichoracearum* na locice kompasové a *P. neolyopersici* na rajčeti jedlém bylo přípravkem ovlivněno více než padlí *P. xanthii* na melounu cukrovém, kde byl výskyt zdravých konidioforů vyšší než u předchozích dvou zmíněných. U kontrolních listových disků byla sporulace vysoká s průměrnou intenzitou $10^2 - 10^3$ konidioforů. Výše zmíněné hodnoty jsou uvedeny v tabulkách 13 a 14.

Tab. 13: Intenzita sporulace (počet konidioforů) padlí (*G. cichoracearum*, *P. neolyopersici* a *P. xanthii*) na vybraných genotypech rostlin po aplikaci přípravku AQ 10 192 hodin po inokulaci

Rostlina	Sporulace 192 hpi		
	Průměr	Min	Max
<i>G. cichoracearum</i> na <i>L. serriola</i> + AQ 10	$10^1 - 10^2$	$0 - 10^1$	$10^2 - 10^3$
<i>P. neolyopersici</i> na <i>S. lycopersicum</i> + AQ 10	$10^1 - 10^2$	$0 - 10^1$	$10^2 - 10^3$
<i>P. xanthii</i> na <i>C. melo</i> + AQ 10	$10^2 - 10^3$	$10^1 - 10^2$	$10^2 - 10^3$

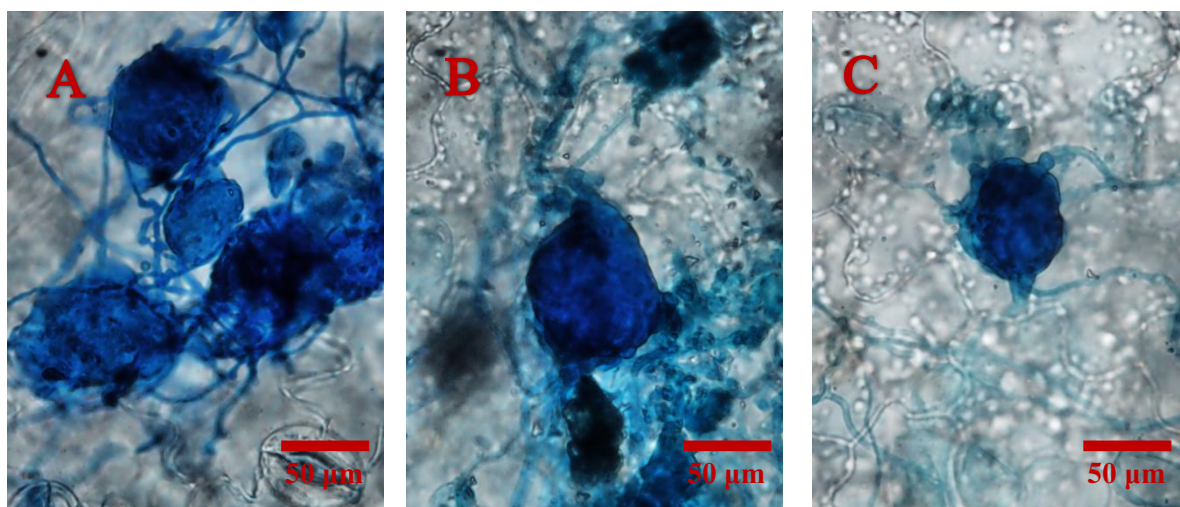
Tab. 14: Intenzita sporulace (počet konidioforů) padlí *G. cichoracearum*, *P. neolyopersici* a *P. xanthii* na vybraných genotypech rostlin bez aplikace AQ 10 (kontrola) 192 hodin po inokulaci

Rostlina (kontrola)	Sporulace 192 hpi		
	Průměr	Min	Max
<i>G. cichoracearum</i> na <i>L. serriola</i>	$10^2 - 10^3$	$10^2 - 10^3$	$10^2 - 10^3$
<i>P. neolyopersici</i> na <i>S. lycopersicum</i>	$10^2 - 10^3$	$10^2 - 10^3$	$10^2 - 10^3$
<i>P. xanthii</i> na <i>C. melo</i>	$10^2 - 10^3$	$10^2 - 10^3$	$> 10^3$

5.4.4 Přítomnost hyperparazita *Ampelomyces quisqualis*

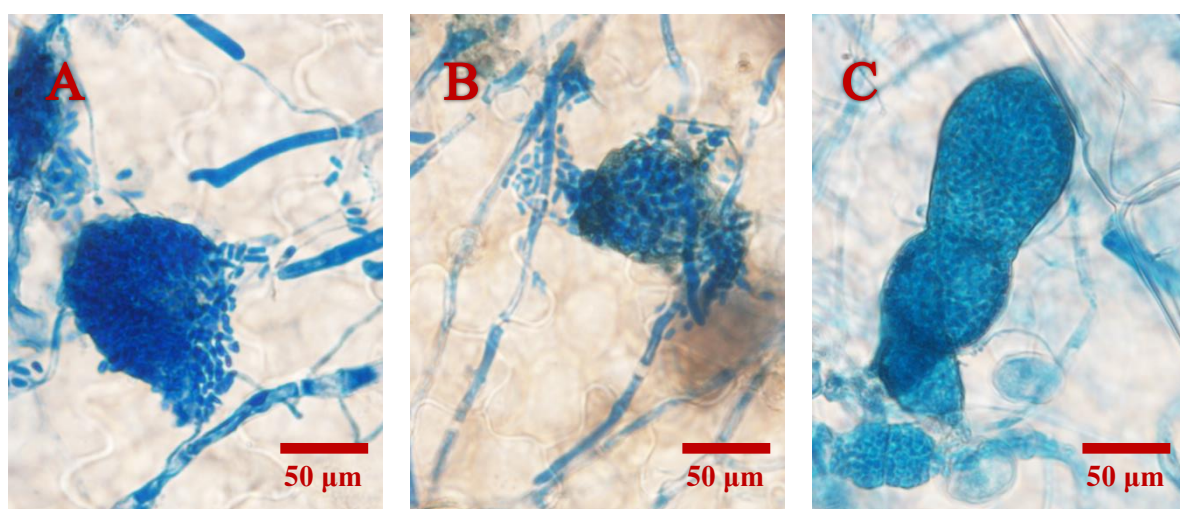
Aplikace přípravku AQ 10 současně s inokulací padlím se ukázala jako úspěšná. Po 24 hodinách po aplikaci AQ 10 se hyperparazit *Ampelomyces quisqualis* nacházel na listových discích v podobě klíčících spor, přímá interakce s padlím zde zatím nebyla pozorována. Po uplynutí 96 hodin už byl zaznamenán výskyt pyknid *A. quisqualis* (Obr. 8) utvářených na myceliu klíčícího padlí u všech testovaných patosystémů (*G. cichoracearum* na

L. serriola LSE/57/15, *P. neolycopersici* na *S. lycopersicum* cv. Amateur a *P. xanthii* na *C. melo* cv. Solartur).



Obr. 8: Pyknidy hyperparazita *A. quisqualis* na padlí *G. cichoracearum* (A), *P. neolycopersici* (B) a *P. xanthii* (C) 96 hodin od inokulace a aplikace AQ 10, zvětšení 400x

Po době působení 192 hodin docházelo k tvorbě pyknid na konidioforech padlí. Na druhích padlí *P. neolycopersici* a *G. cichoracearum* bylo možné vidět pyknidy sporulující, kdy došlo k jejich prasknutí a uvolnění spor do okolí. Na padlí *P. xanthii* byly pozorovány zvětšené konidiofory utvářející pyknidy naplněné spory (Obr. 9). K jejich uvolňování v tomto případě ale nedocházelo. Konidie hyperparazita *A. quisqualis* byla malé a měly pravidelný oválný tvar.



Obr. 9: Pyknidy hyperparazita *A. quisqualis* na padlí *G. cichoracearum* (A), *P. neolycopersici* (B) a *P. xanthii* (C) 192 hodin od inokulace a aplikace AQ 10, zvětšení 400x

6 DISKUZE

Podstatou práce bylo sledování účinnosti interakce mezi hyperparazitem *Ampelomyces quisqualis* (v podobě přípravku AQ 10) a třemi patosystémy – padlí čekankového (*G. cichoracearum*) na locice kompasové (*Lactuca serriola* LSE/57/15), padlí rajčatového (*P. neolycopersici*) na rajčeti jedlém (*Solanum lycopersicum* cv. Amateur) a padlí tykvovitých (*P. xanthii*) na melounu cukrovém (*Cucumis melo* cv. Solartur). Přípravkem AQ 10 byly ošetřeny jednak celé rostliny napadené padlím, ale taktéž byl sledován vývoj *A. quisqualis* na listových discích, a to jak již napadených padlím, i současně padlím inokulovaných.

V prvním experimentu, kdy byl přípravek AQ 10 aplikován na celé rostliny infikované padlím již před třemi týdny (a tudíž plně vyvinutým), nebyl pozorován žádný účinek přípravku na padlí napadající rostliny. Z vizuálního hlediska byly listy rostlin ošetřené AQ 10 pokryty bílým moučnatým povlakem ve stejném rozsahu, jako listy rostlin, u nichž ošetření provedeno nebylo. Sporulace padlí na ošetřených rostlinách byla taktéž shodná s kontrolními rostlinami. K podobným výsledkům došli Shishkoff *et* McGrath (2002), kteří studovali vliv *A. quisqualis* na padlí tykvovitých *P. xanthii* na tykvi obecné (*Cucurbita pepo* L. var. *melo* Alef.). Uvedli, že nedošlo ke zmenšení kolonií padlí na listech rostliny, ale také pozorovali zmenšení množství inokula produkovaného koloniemi. Inokulum však v jejich studii nebylo ovlivněno hyperparazitem a bylo možné jím nakazit další rostliny.

Následující experiment, kdy došlo k aplikování AQ 10 na listové disky odebrané z rostlin napadených padlím, se také ukázal jako neúspěšný. Vyhodnocení bylo provedeno 24, 96 a 168 hodin po aplikaci AQ 10. Se zvyšující se dobou působení AQ 10 nedošlo ke snížení sporulace padlí ani k pozorování struktur *A. quisqualis* u žádného z uvedených patosystémů. Metodu odběru listových disků při svém výzkumu použili Dik *et al.* (1998), kteří sledovali účinnost přípravků biologické kontroly, mezi nimiž byl i AQ 10. Studovány byly rostlin okurky seté (*Cucumis sativus* kultivar Jessica a Ventura), jež byly před experimentem nainokulovány padlím *Podosphaera fuliginea* (nyní *Podosphaera xanthii*) a na padlí byl následně aplikován přípravek AQ 10. Zjistili, že přípravek nevykazoval žádnou kontrolu a nepozorovali žádné známky parazitismu na discích, přestože zaznamenali přítomnost *A. quisqualis*.

Při posledním experimentu byl přípravek AQ 10 aplikován na listové disky odebrané ze zdravých rostlin ihned po jejich inokulaci padlím. Vyhodnocení bylo provedeno 24, 96 a 192 hpi. V tomto případě se aplikace AQ 10 ukázala jako úspěšná a na listových discích bylo možno pozorovat napadání mycelia padlí hyperparazitem *A. quisqualis*. Na listových discích 24 hpi byla hodnocena klíčivost a počet klíčících vláken na konidii. Klíčivost byla u disků

ošetřených AQ 10 podstatně nižší než u disků neošetřených. Na klíčících konidiích se vyskytovalo buď jedno, nebo dvě klíčící vlákna, přičemž konidie s jedním klíčícím vláknem převažovaly u všech ošetřených disků. Hyperparazit *A. quisqualis* byl na listových discích 24 hpi pozorován v podobě klíčících spor, kdy zatím nedocházelo k žádné viditelné interakci s myceliem padlí.

U listových disků 96 hpi byl vyhodnocen pouze počet klíčících vláken na konidii. Byl pozorován výskyt jednoho, dvou nebo tří klíčících vláken. Na listových discích ošetřených AQ 10 byl počet klíčících vláken menší, než na kontrolních discích. Nejméně konidie klíčily u patosystému *G. cichoracearum* na *L. serriola*. V časovém intervalu 96 hpi už bylo možné pozorovat tvorbu pyknid *A. quisqualis* interagující s myceliem padlí ve všech sledovaných patosystémech. Studie, které by se zabývaly změnou klíčivosti a počtu klíčících vláken na konidiích padlí po aplikaci *A. quisqualis*, se nepodařilo dohledat. Pozorováním těchto jevů však můžeme získat cenné informace o účinnosti hyperparazita na vývoj padlí.

Na listových discích 192 hpi bylo provedeno vyhodnocení intenzity sporulace padlí (počet konidioforů). Intenzita sporulace byla nižší u disků ošetřených přípravkem AQ 10, než u disků neošetřených. Nižší intenzita sporulace padlí byla způsobena právě parazitací *A. quisqualis*, který v tomto časovém intervalu prorůstal přímo do konidioforů padlí, kde tvořil pyknidy, v nichž byly obsaženy spory. Na *G. cichoracearum* a *P. neolycopersici* bylo možné pozorovat sporulující pyknidy, tedy stav, kdy pyknidy praskly a spory se uvolnily do okolí. Padlí *P. xanthii* při dané koncentraci suspenze AQ 10 192 hpi netvořilo sporulující pyknidy, ale bylo u něj možné vidět zvětšené konidiofory tvořící pyknidy, které byly sporami naplněny. Podobný jev byl popsán v práci zabývající se biologickou kontrolou ledvinovníku západního (*Anacardium occidentale*), na němž parazitovalo padlí *Oidium anacardii* (Dominic *et* Makobe, 2017). V této studii došlo k současné inokulaci padlím a aplikaci *A. quisqualis* s pozitivními výsledky, kdy byla potlačena infekce padlí a pozorována produkce pyknid uvnitř konidioforů a hyf. Studii, kdy byla provedena aplikace AQ 10 v raných stádiích vývoje padlí, provedli Pasini *et al.* (1997), když sledovali působení hyperparazita na padlí *Podosphaera pannosa* var. *rosae* na růžích. Uvedli, že ošetření pomocí *A. quisqualis* poskytlo uspokojivou kontrolu padlí.

Z výsledků výše zmíněných prací lze vyvodit, že hyperparazit *A. quisqualis* je schopen do jisté míry redukovat infekci a kolonie padlí, ale za podmínek, že se padlí nachází ve svém raném stádiu, protože rozvinutou chorobu tímto způsobem se nedaří účinně potlačit. To dále potvrdili Szentiványi *et* Kiss (2003), když při studiu přezimování *A. quisqualis* a interakce s *Podosphaera leucotricha* na jabloních zaznamenali rozdíl v rychlosti šíření hyperparazita a

jeho mykohostitele a uvedli, že *A. quisqualis* nedovedl dostatečně rychle následovat růst kolonií padlí a nedokázal tedy efektivně potlačit onemocnění. Pertot *et al.* (2008) testovali účinnost přípravků biologické kontroly včetně *A. quisqualis* na padlí *Podosphaera aphanis* na rostlinách jahod (*Fragaria ananassa* Duchense, kultivar Elsanta). Dospěli k závěru, že tyto přípravky vykazují jistý efekt na intenzitu onemocnění, ale nejsou schopny rostlině zajistit dostatečnou ochranu a vyrovnat se přípravkům chemickým. Bylo potvrzeno, že účinnost přípravku AQ 10 je možno do jisté míry zvýšit přidáním adjuvatu AddQ (Elad *et al.*, 1998).

Došlo tedy k potvrzení faktu, že přípravek AQ 10 je možné využít jako prostředek biologické kontroly padlí. Jeho účinnost je ale velmi omezená. Aby došlo k zahájení parazitace *A. quisqualis* na padlí, musí být přípravek aplikován v době krátce po započetí infekce padlím. I při splnění této podmínky však není hyperparazit schopen rostlinu vyléčit do takové míry, aby padlí na ní parazitující bylo kompletně usmrceno. Protože však má biologická kontrola oproti kontrole chemické řadu výhod, je žádoucí, aby byl její výzkum nadále rozvíjen a účinky vylepšovány.

7 ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce se zabývá využitím přípravku AQ 10 obsahujícího spory hyperparazita *A. quisqualis* při biologické kontrole padlí – konkrétně padlí čekankového (*G. cichoracearum*) na locice kompasové (*Lactuca serriola* LSE/57/15), padlí rajčatového (*P. neolycopersici*) na rajčeti jedlém (*Solanum lycopersicum* cv. Amateur) a padlí tykvovitých (*P. xanthii*) na melounu cukrovém (*Cucumis melo* cv. Solartur). Sleduje jeho účinnost na vývoj padlí po aplikaci na celé rostliny napadené padlím a na listové disky odebrané z rostlin napadených padlím, ale i z rostlin zdravých za současné inokulace padlím.

V případě aplikace přípravku AQ 10 na celé rostliny napadené padlím byla sledována intenzita sporulace, která však byla shodná s kontrolními rostlinami, na které přípravek aplikován nebyl. Přípravek AQ 10 se zde nejevil jako účinný.

Při aplikaci přípravku na listové disky odebrané z rostlin napadených padlím byla také hodnocena intenzita sporulace a byla sledována v intervalech 24, 96 a 168 hodin po aplikaci. Intenzita sporulace s rostoucí dobou působení zachovávala stále stejnou hodnotu, která byla obdobná jako intenzita sporulace u kontrolních rostlin. Ani při tomto pokusu nebyl přípravek AQ 10 shledán jako účinný.

Při aplikování přípravku AQ 10 současně s inokulací padlím na listové disky odebrané ze zdravých rostlin bylo vyhodnocení provedeno po 24, 96 a 192 hodinách. Po 24 hodinách byla vyhodnocována klíčivost a počet klíčících vláken na konidii, přičemž klíčivost konidií padlí ošetřených AQ 10 byla menší a převažovaly konidie s jedním klíčícím vláknem. Poprvé zde také byla zaznamenána přítomnost *A. quisqualis*. Po 96 hodinách byl vyhodnocen počet klíčících vláken na konidii. U listových disků ošetřených AQ 10 stále převažovaly konidie s jedním klíčícím vláknem, zatímco u disků neošetřených bylo více konidií se dvěma a třemi klíčovými vlákny. Současně byla pozorována interakce *A. quisqualis* s myceliem všech tří druhů padlí. Po 192 hodinách byla zhodnocena intenzita sporulace, která u ošetřených disků byla znatelně nižší. V tomto případě byl pozorován stav, kdy hyperparazit tvořil znatelné pyknidy – u *G. cichoracearum* a *P. neolycopersici* sporulující. U *P. xanthii* ke sporulaci nedocházelo, ale byl zaznamenán výskyt zvětšených konidioforů, ze kterých se pyknidy utvářely. Při tomto experimentu byl přípravek AQ 10 vyhodnocen jako do jisté míry účinný.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abo-Foul, S., Raskin, V. I., Szejnberg, A., & Marder, J. B. (1996): Disruption of chlorophyll organization and function in powdery mildew-diseased cucumber leaves and its control by the hyperparasite *Ampelomyces quisqualis*. *Phytopathology*, 86(2): 195-199.
- Ale-Agha, N., Boyle, H., Braun, U., Butin, H., Jage, H., Kummer, V., & Shin, H. D. (2008): Taxonomy, host range and distribution of some powdery mildew fungi (Erysiphales). *Schlechtendalia*, 17: 39-54.
- Angeli, D., Pellegrini, E., & Pertot, I. (2009): Occurrence of *Erysiphe necator* chasmothecia and their natural parasitism by *Ampelomyces quisqualis*. *Phytopathology*, 99(6): 704-710.
- Angeli, D., Puopolo, G., Maurhofer, M., Gessler, C., & Pertot, I. (2012): Is the mycoparasitic activity of *Ampelomyces quisqualis* biocontrol strains related to phylogeny and hydrolytic enzyme production?. *Biological control*, 63(3): 348-358.
- Avis, T. J., & Bélanger, R. R. (2002): Mechanisms and means of detection of biocontrol activity of *Pseudozyma* yeasts against plant-pathogenic fungi. *FEMS yeast research*, 2(1): 5-8.
- Baker, K. F. (1987): Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 25(1): 67-85.
- Bale, J. S., Van Lenteren, J. C., & Bigler, F. (2008): Biological control and sustainable food production. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 363(1492): 761-776.
- Biogard (b. r.) [online] [cit. 3. 4. 2017]: Biofungicide for Powdery Mildew Control based on *Ampelomyces quisqualis* (isolate M-10). Dostupné z: <<http://biogard.it/index.php/en/plantprotection/fungicides/275-aq-10-en>>
- Braun, U., & Cook, R. T. A. (2012): Taxonomic manual of the Erysiphales (powdery mildews). *CBS Biodiversity Series*, 11: 1-707.
- Braun, U., Cook, R. T. A., Inman, A. J., & Shin, H. D. (2002): The taxonomy of the powdery mildew fungi. In: Belanger, R.R., Dik, A., & Bushnell, W. (eds.): *The Powdery Mildews: a comprehensive treatise*: pp 13-54. American Phytopathological Society Press.
- Cook, R. J. (1993): Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 31(1): 53-80.
- Daughtrey, M. L., & Benson, D. M. (2005): Principles of plant health management for ornamental plants. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 141-169.
- Di Francesco, A., Martini, C., & Mari, M. (2016): Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action?. *European Journal of Plant Pathology*, 145(4): 711-717.

- Dik, A. J., Verhaar, M. A., & Bélanger, R. R. (1998): Comparison of three biological control agents against cucumber powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) in semi-commercial-scale glasshouse trials. *European Journal of Plant Pathology*, 104(4), 413-423.
- Dominic, M. & Makobe M. (2017): Biological control of cashew powdery mildew using *Ampelomyces quisqualis* Ces. *Journal of Biological Control*, 30(4).
- Douglas, S. M. (2001): Powdery mildew in the greenhouse. Department of Plant Pathology and Ecology. The Connecticut Agricultural Experiment Station, 4 p.
- Edreva, A. (2004): A novel strategy for plant protection: Induced resistance. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 3(2): 61-69.
- Elad, Y., Kirshner, B., Yehuda, N., & Szejnberg, A. (1998): Management of powdery mildew and gray mold of cucumber by *Trichoderma harzianum* T39 and *Ampelomyces quisqualis* AQ 10. *BioControl*, 43(2): 241-251.
- Falk, S. P., Gadoury, D. M., Cortesi, P., Pearson, R. C., & Seem, R. C. (1995): Parasitism of *Uncinula necator* cleistothecia by the mycoparasite *Ampelomyces quisqualis*. *Phytopathology*, 85(7): 794-800.
- Fraaije, B. A., Butters, J. A., Coelho, J. M., Jones, D. R., & Hollomon, D. W. (2002): Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* using quantitative allele-specific real-time PCR measurements with the fluorescent dye SYBR Green I. *Plant Pathology*, 51(1): 45-54.
- Fravel, D. R. (2005): Commercialization and implementation of biocontrol 1. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 337-359.
- Gadoury, D. M., Cadle-Davidson, L., Wilcox, W. F., Dry, I. B., Seem, R. C., & Milgroom, M. G. (2012): Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): a fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph. *Molecular Plant Pathology*, 13(1): 1-16.
- Gautam, A. K., & Avasthi, S. (2016): *Ampelomyces quisqualis*-a remarkable mycoparasite on *Xanthium strumarium* powdery mildew from Himachal Pradesh India. *Journal on New Biological Reports*, 5(1): 1-6
- Hansen, M. A. (2009): Powdery mildew of ornamental plants. *Powdery mildew of ornamental plants*. Communications and Marketing, College of Agriculture and Life Sciences, Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Hashioka, Y. & Nakai, Y. (1980): Ultrastructure of pycnidial development and mycoparasitism of *Ampelomyces quisqualis* parasitic on Erysiphales. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, 21: 329-338.

- Herrera-Estrella, A., & Chet, I. (1999): Chitinases in biological control. *EXS-BASEL-*, 87: 171-184.
- Heydari, A., & Pessarakli, M. (2010): A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences*, 10(4): 273-290.
- Hirose, S., Tanda, S., Kiss, L., Grigaliunaite, B., Havrylenko, M., & Takamatsu, S. (2005): Molecular phylogeny and evolution of the maple powdery mildew (*Sawadaea*, Erysiphaceae) inferred from nuclear rDNA sequences. *Mycological Research*, 109(8): 912-922.
- Ingold, C. T., & Hudson, H. J. (1993): Ascomycotina. In: Ingold, C. T. & Hudson, H. J. (eds.): *The Biology of Fungi*, 6th edition, Chapman & Hall, New York.
- Janisiewicz, W. J., Tworowski, T. J., & Sharer, C. (2000): Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology*, 90(11): 1196-1200.
- Junaid, J. M., Dar, N. A., Bhat, T. A., Bhat, A. H., & Bhat, M. A. (2013): Commercial biocontrol agents and their mechanism of action in the management of plant pathogens. *International Journal of Modern Plant & Animal Sciences*, 1(2): 39-57.
- Kiss, L. (2001): The Role of Hyperparasites in Host Plant-Parasitic Fungi Relationship. In Jeger, M. J., & Spence, N. J. (eds.): *Biotic Interactions in Plant-Pathogen Associations*, pp. 227-236, CABI Pub., New York.
- Kiss, L. (2003): A review of fungal antagonists of powdery mildews and their potential as biocontrol agents. *Pest Management Science*, 59(4): 475-483.
- Kiss, L. (2008): Intracellular mycoparasites in action: interactions between powdery mildew fungi and *Ampelomyces*. In *British Mycological Society Symposia Series* (Vol. 27, pp. 37-52). Academic Press.
- Kiss, L., Pintye, A., Kovacs, G. M., Jankovics, T., Fontaine, M. C., Harvey, N., Xu, X., Nicot, P. C., Bardin, M., Shykoff, J. A., & Giraud, T. (2011): Temporal isolation explains host-related genetic differentiation in a group of widespread mycoparasitic fungi. *Molecular Ecology*, 20(7): 1492-1507.
- Kiss, L., Russell, J. C., Szentiványi, O., Xu, X., & Jeffries, P. (2004): Biology and biocontrol potential of *Ampelomyces* mycoparasites, natural antagonists of powdery mildew fungi. *Biocontrol Science and Technology*, 14(7): 635-651.
- Kogan, M. (1998): Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. *Annual Review of Entomology*, 43(1): 243-270.
- Kuč, J. (2001): Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *European Journal of Plant Pathology*, 107(1): 7-12.

- Lebeda, A., & Mieslerová, B. (2011): Taxonomy, distribution and biology of lettuce powdery mildew (*Golovinomyces cichoracearum* sensu stricto). *Plant Pathology*, 60(3): 400-415.
- Lebeda, A., Sedláková, B., & Křístková, E. (2004): Distribution, harmfulness and pathogenic variability of cucurbit powdery mildew in the Czech Republic. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 7: 174-176.
- Lee, S. Y., Lee, S. B., & Kim, C. H. (2004): Biological control of powdery mildew by Q-fect WP (*Ampelomyces quisqualis* 94013) in various crops. *S. Michele all'Adige, Italy*, 27(8): 329-331.
- Legler, S. E., Caffi, T., Benuzzi, M., Ladurner, E., & Rossi, V. (2011): New perspectives for the use of *Ampelomyces*-based biofungicides for effective control of powdery mildew on grapevine. In *4ème Conférence Internationale sur les Méthodes Alternatives en Protection des Cultures. Evolution des cadres réglementaires européen et français. Nouveaux moyens et stratégies Innovantes, Nouveau Siècle, Lille, France, 8-10 mars 2011* (pp. 546-551). Association Française de Protection des Plantes (AFPP).
- Legler, S. E., Pintye, A., Caffi, T., Gulyás, S., Bohár, G., Rossi, V., & Kiss, L. (2016): Sporulation rate in culture and mycoparasitic activity, but not mycohost specificity, are the key factors for selecting *Ampelomyces* strains for biocontrol of grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*). *European Journal of Plant Pathology*, 144(4): 723-736.
- Leinhos, G. M. E., & Buchenauer, H. (1992): Hyperparasitism of selected fungi on rust fungi of cereal. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 99: 482-482.
- Leong, J. (1986): Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 24(1): 187-209.
- Lyngkjær, M. F., & Carver, T. L. W. (1999): Induced accessibility and inaccessibility to *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in barley epidermal cells attacked by a compatible isolate. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55(3): 151-162.
- Maier, B., & Goldberg, N. P. (2010): *Grape Powdery Mildew*. NM State University, Cooperative Extension Service, College of Agricultural, Consumer and Environmental Sciences.
- McSpadden Gardener, B. B., & Fravel, D. R. (2002): Biological control of plant pathogens: research, commercialization, and application in the USA. *Plant Health Progress*, 10 (10.1094).
- Merriman, P. R., & Wheeler, B. E. J. (1968): Overwintering of *Sphaerotheca mors-uvae* on black currant and gooseberry. *Annals of Applied Biology*, 61(3): 387-397.
- Morton, V., & Staub, T. (2008): A short history of fungicides. APS Press, St. Paul, Minnesota, 12 pp.

- Nega, A. (2014): Review on concepts in biological control of plant pathogens. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 4(27): 33-54.
- O'Neill, T. (2014): Tomato and Pepper. In: George, R. A. T., & Fox, R. T. V. (eds.): *Diseases of Temperate Horticultural Plants*, pp. 288-331, CABI, Wallingford.
- Oerke, E. C. (2006): Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(01): 31-43.
- Ouda, S. M. (2014): Biological control by microorganisms and ionizing radiation. *International Journal of Advanced Research*, 2(5): 314-356.
- Pal, K. K., & McSpadden Gardener, B. B. (2006): Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*, 2: 1117-1142.
- Panstruga, R., & Schulze-Lefert, P. (2002): Live and let live: insights into powdery mildew disease and resistance. *Molecular Plant Pathology*, 3(6): 495-502.
- Parratt, S. R., & Laine, A. L. (2016): The role of hyperparasitism in microbial pathogen ecology and evolution. *The ISME journal*, 10(8): 1815-1822.
- Pasini, C., D'Aquila, F., Curir, P., & Gullino, M. L. (1997): Effectiveness of antifungal compounds against rose powdery mildew (*Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*) in glasshouses. *Crop Protection*, 16(3): 251-256.
- Paulitz, T. C., & Bélanger, R. R. (2001): Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology*, 39(1): 103-133.
- Pertot, I., Zasso, R., Amsalem, L., Baldessari, M., Angeli, G., & Elad, Y. (2008): Integrating biocontrol agents in strawberry powdery mildew control strategies in high tunnel growing systems. *Crop Protection*, 27(3): 622-631.
- Rajković, S., Tabaković-Tošić, M., Marković, M., Milovanović, J., & Mitić, D. (2010): Application of AQ-10 biofungicide on *Quercus robur* L. seedlings. *Fresenius Environmental Bulletin*, 19(12a): 2987-2992.
- Ridout, C. J. (2009): Profiles in pathogenesis and mutualism: powdery mildews. In: Deising, H. B. (ed.): *Plant Relationships* (pp. 51-68). Springer Berlin Heidelberg.
- Rotem, Y., Yarden, O., & Sztejnberg, A. (1999): The mycoparasite *Ampelomyces quisqualis* expresses exgA encoding an exo- β -1,3-glucanase in culture and during mycoparasitism. *Phytopathology*, 89(8): 631-638.
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y., & Hunt, M. D. (1996): Systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, 8(10): 1809.

- Ryckaert, B., Spanoghe, P., Haesaert, G., Heremans, B., Isebaert, S., & Steurbaut, W. (2007): Quantitative determination of the influence of adjuvants on foliar fungicide residues. *Crop Protection*, 26(10): 1589-1594.
- Shishkoff, N., & McGrath, M. T. (2002): AQ 10 biofungicide combined with chemical fungicides or AddQ spray adjuvant for control of cucurbit powdery mildew in detached leaf culture. *Plant Disease*, 86(8): 915-918.
- Schisler, D. A., & Slininger, P. J. (1997): Microbial selection strategies that enhance the likelihood of developing commercial biological control products. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 19(3): 172-179.
- Simberloff, D., & Stiling, P. (1996): Risks of species introduced for biological control. *Biological Conservation*, 78(1): 185-192.
- Singh, H. B. (2014): Management of plant pathogens with microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80: 443-454.
- Siozios, S., Tosi, L., Ferrarini, A., Ferrari, A., Tononi, P., Bellin, D., Maurhofer, M., Gessler, C., Delledonne, M., & Pertot, I. (2015): Transcriptional reprogramming of the mycoparasitic fungus *Ampelomyces quisqualis* during the powdery mildew host-induced germination. *Phytopathology*, 105(2): 199-209.
- Sundheim, L. (1982): Control of cucumber powdery mildew by the hyperparasite *Ampelomyces quisqualis* and fungicides. *Plant Pathology*, 31(3): 209-214.
- Suprapta, D. N. (2012): Potential of microbial antagonists as biocontrol agents against plant fungal pathogens. *J ISSAAS*, 18(2): 1-8.
- Szentiványi, O., & Kiss, L. (2003): Overwintering of *Ampelomyces* mycoparasites on apple trees and other plants infected with powdery mildews. *Plant Pathology*, 52(6): 737-746.
- Sztejnberg, A. (1993): U.S. Patent No. 5,190,754. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Sztejnberg, A., Galper, S., Mazar, S., & Lisker, N. (1989): *Ampelomyces quisqualis* for biological and integrated control of powdery mildews in Israel. *Journal of Phytopathology*, 124(4): 285-295.
- Takamatsu, S., Braun, U., Limkaisang, S., Kom-Un, S., Sato, Y., & Cunnington, J. H. (2007): Phylogeny and taxonomy of the oak powdery mildew *Erysiphe alphitoides* sensu lato. *Mycological Research*, 111(7): 809-826.

- Thomashow, L. S., & Weller, D. M. (1988): Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Journal of Bacteriology*, 170(8): 3499-3508.
- Urbanietz, A., & Dunemann, F. (2005): Isolation, identification and molecular characterization of physiological races of apple powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*). *Plant Pathology*, 54(2): 125-133.
- Ústřední kontrolní a zkušební úřad zemědělský (2009) [online] [cit. 9. 3. 2017]: *Zákon č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů* (Sbírka zákonů České republiky, 106, pp. 6618). Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/legislativa/legislativa-cr/pripravky-na-ochranu-rostlin/_obsah_cz_mze_ministerstvo-zemedelstvi_legislativa_Legislativa-MZe_uplna-zneni_zakon-2004-326-viceoblasti.html>
- Van Lenteren, J. C. (2000): A greenhouse without pesticides: fact or fantasy?. *Crop Protection*, 19(6): 375-384.
- Van Lenteren, J. C., & Woets, J. V. (1988): Biological and integrated pest control in greenhouses. *Annual Review of Entomology*, 33(1): 239-269.
- Van Loon, L. C. (1997): Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology*, 103(9): 753-765.
- Van Loon, L. C., & Van Strien, E. A. (1999): The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55(2): 85-97.
- Vashishta, B. R. & Sinha, A. K. (2014): Botany for Degree Students, Revised Edition, S. Chand Pub., New Dehli
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000): Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4): 655-671.
- Viterbo, A., Ramot, O., Chernin, L., & Chet, I. (2002): Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1-4): 549-556.
- Voisard, C., Keel, C., Haas, D., & Dèfago, G. (1989): Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *The EMBO Journal*, 8(2): 351.
- Waard, M. A., Georgopoulos, S. G., Hollomon, D. W., Ishii, H., Leroux, P., Ragsdale, N. N., & Schwinn, F. J. (1993): Chemical control of plant diseases: problems and prospects. *Annual Review of Phytopathology*, 31(1): 403-421.

- Wang, Z., Johnston, P. R., Takamatsu, S., Spatafora, J. W., & Hibbett, D. S. (2006): Toward a phylogenetic classification of the Leotiomycetes based on rDNA data. *Mycologia*, 98(6): 1065-1075.
- Webster, J. & Weber, R. (2007): Hymenoascomycetes: Pyrenomycetes. In: Webster, J. & Weber, R. (eds.): Introduction to fungi, pp. 225 – 247, Cambridge University Press, New York.
- Weller, D. M. (1988): Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 26(1): 379-407.
- Yarwood, C. E. (1932): *Ampelomyces quisqualis* on clover mildew. *Phytopathology*, 22: 31.
- Yarwood, C. E. (1939): An overwintering pycnidial stage of *Cicinnobolus*. *Mycologia*, 31(4): 420-422
- Zahradníková, M., & Zahradník, P. (2016): Změny v registraci přípravků na ochranu lesa pro rok 2016. In: Knížek, M., (ed.): Škodliví činitelé v lesích Česka 2015/2016 – Vliv sucha na stav lesních porostů. Sborník referátů z celostátního semináře s mezinárodní účastí, p. 32-37, Zpravodaj ochrany lesa, Průhonice.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

cv	Kultivar
f.sp.	Forma specialis
spp.	Species (plurál)
CuSO ₄	Síran vápenatý
DMI	Demethylační inhibitory
NH ₃	Amoniak
HCN	Kyanovodík
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ISR	Indukovaná systémová rezistence
SAR	Systémově získaná rezistence
LAR	Lokálně získaná rezistence
PR	Pathogenesis-related proteins
IPM	Integrovaná ochrana proti škůdcům
FFDCA	Federal Food, Drug and Cosmetic Act
FIFRA	Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act
FQPA	Food Quality Protection Act
ÚKZÚZ	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
exgA	Gen pro β-1,3-Exoglukanáza
EPA	Agentura pro ochranu životního prostředí
CDA	Czapek Dox agar
CCD	Charge-coupled device
ha	hektar
hpi	hodin po inokulaci
var.	odrůda (variety)