

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra rostlinné výroby a agroekologie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Monitoring přirozeného výskytu mykoparazitických a
antagonistických hub v půdách na území regionu jižní Čechy**

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Andrea Bohatá, Ph.D.

Autorka:

Bc. Jana Bílková

České Budějovice

Duben 2013

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta zemědělská
Akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jana BÍLKOVÁ**
Osobní číslo: **Z11540**
Studijní program: **N4106 Zemědělská specializace**
Studijní obor: **Biologie a ochrana zájmových organismů**
Název tématu: **Monitoring přirozeného výskytu mykoparazitických a antagónistických hub v půdách na území regionu jižní Čechy**
Zadávací katedra: **Katedra rostlinné výroby a agroekologie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Cíl práce:

Cíl diplomové práce je zaměřen na monitoring výskytu nejvýznamnějších druhů mykoparazitických hub v půdách s ekologickým a konvenčním systémem hospodaření.

Literární rešerše:

V rámci řešení bude zpracována literární rešerše zaměřená na strategie biologické ochrany rostlin, charakteristiku mykoparazitických hub, popis metod detekce a izolace mykoparazitických hub z půdního prostředí. Dále bude rešerše obsahovat popis nejvýznamnějších druhů hub rodu *Trichoderma* a houby *Coniothyrium minitans*, včetně možnosti jejich využití proti původcům onemocnění.

Metodické postupy:

Vzorky získané z lokalit na území jižních Čech budou analyzovány na výskyt mykoparazitických hub. Pro izolaci mykoparazitických hub z půdních vzorků budou využívány všechny dostupné metodické postupy. Izolované kmeny budou purifikovány a uloženy do sbírky hub. S vybranými druhy/kmeny hub budou vypracovány biotesty zaměřené na účinnost proti významným původcům onemocnění rostlin.

Výsledky:

V kontextu plánovaných aktivit lze předpokládat výsledky v následujících tematických okruzích: Vypracování standardního postupu selektivní izolace mykoparazitických hub pomocí sklerocií fytopatogenní houby *Sclerotinia sclerotiorum*. Vypracování standardního postupu selektivní izolace mykoparazitických hub rodu *Trichoderma* pomocí selektivní živné půdy. Purifikace nově izolovaných kmenů a jejich uložení do mykologické sbírky hub. Porovnání dostupných metod izolace mykoparazitických hub. Porovnání biologické účinnosti mykoparazitických hub na vybrané původce onemocnění rostlin.

Rozsah grafických prací: 10 - 15 stran
Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran
Forma zpracování diplomové práce: tištěná
Seznam odborné literatury:

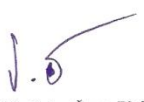
Esser K., Lemke P.A. 2002: The Mycota XI. - Agricultural Applications. Springer, Verlag Berlin Heidelberg, pp 388.
Butt T.M., Jackson C., Magan N. 2001: Fungi as biocontrol agents - progress, problems and potential. CAB International, Wallingford, UK, 23-69.
Ciancio A., Mukerji K.G. 2008: Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria, Vol. 3. Springer Science and Business Media B.V., pp. 419.
Agrios, G. 2005: Plant Pathology. Elsevier Academic Press, pp. 935.
Články získané z bibliografické a citační databáze Web of Science a bibliografické databáze CAB, BA, ZR. Retrospektivní rešerše z bibliografických databází: CAB, WoS (klíčová slova - uvedené druhy hub v kombinaci s "bioassay", "efficacy", apod..

Vedoucí diplomové práce: Ing. Andrea Bohatá, Ph.D.
Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Datum zadání diplomové práce: 18. března 2013
Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2013


prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní obor
Studená 13
370 05 České Budějovice


prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 18. března 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Monitoring přirozeného výskytu mykoparazitických a antagonistických hub v půdách na území regionu jižní Čechy“ vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a materiálů uvedených v seznamu literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 11/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

.....
datum

.....
Bc. Jana Bílková

Děkuji své vedoucí diplomové práce Ing. Andree Bohaté, Ph.D. za podnětné připomínky a cenné praktické rady, které mi poskytovala v průběhu zpracování této práce. Dále děkuji pracovním Katedry rostlinné výroby a agroekologie za poskytnutí vhodných pracovních podmínek a také celé své rodině za všestrannou pomoc po celou dobu studia na vysoké škole.

ABSTRAKT

Diplomová práce byla zaměřena na monitoring přirozeného výskytu mykoparazitických hub v půdách na vybraných pozemcích s konvenčním a ekologickým systémem hospodaření regionu jižních Čech. K izolaci mykoparazitických hub byly použity čtyři izolační techniky. Dvě techniky byly založené na detekci hub z výluhu půdy za použití selektivní živné půdy (THSM – *Trichoderma harzianum* selective medium) a semi-selektivní živné půdy (Dilution plate technique). V rámci monitoringu byly využity i dvě techniky k izolaci mykoparazitických hub založené na využití živé pasti. První metoda spočívala ve využití sklerocií (SBT – Sclerotia bait technique) a využití mycelia houby *Sclerotinia sclerotiorum* (Pre-colonization plate method). Pomocí všech metody byly odizolovány převážně druhy hub rodu *Trichoderma*, dále druh *Trichoderma virens*, *Clonostachys rosea* f. *catenulata* a *Lecanicillium muscarium*. V žádném půdním vzorku nebyla detekována houba *Coniothyrium minitans*. Vybrané kmeny hub rodu *Trichoderma* byly charakterizovány na základě „in vitro“ testů. Na základě testů byl hodnocen radiální růst kmenů, jejich produkční vlastnosti a zejména pak byla hodnocena účinnost jednotlivých kmenů na vybraných fytopatogenních druzích hub (*S. sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* a *Fusarium solani*).

Klíčová slova: izolace hub, mykoparazitické houby, *Trichoderma*, fytopatogenní houby, polyfaktoriální charakteristika

ABSTRACT

The thesis is focused on monitoring of natural occurrence of mycoparasitic fungi in arable soils. Study was aimed to isolate those fungi from selected plots with conventional and organic farming systems of the region of South Bohemia. Four isolated method were used for isolation of mycoparasitic fungi from soil. Two techniques were based on detection of fungi from soil solution using selective nutritive medium (THSM – *Trichoderma harzianum* selective medium) and semi-selective nutritive medium (Dilution plate technique). Within the framework of the monitoring, next two techniques were used for isolate of fungi from soils based on using of live trap. The sclerotia (SBT – Sclerotia bait technique) and mycelium (Pre-colonization plate method) of phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* were used. Results of monitoring indicate that several species of mycoparasitic fungi represent very important component of soil born fungi. Among all, species of genus of *Trichoderma*, *Trichoderma virens*, *Clonostachys rosea* f. *catenulata* and *Lecanicillium muscarium* were the most frequently present and isolated species. Fungus *Coniothyrium minitans* was not detected in any soil sample. In vitro testes were used for polyfactorial characteristic of chosen *Trichoderma* strains. The radial growth of strains and their production characteristic was evaluated. The efficacy of *Trichoderma* strains against phytopathogenic fungi (*S. sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* a *Fusarium solani*) was evaluated.

Key words: isolation of fungi, mycoparasitic fungi, *Trichoderma*, phytopathogenic fungi, polyfactorial characteristic

Obsah diplomové práce:

1	Úvod	1
2	Literární přehled	3
2.1	Integrovaná ochrana	3
2.2	Biologická ochrana	3
2.3	Strategie biologické ochrany	5
2.4	Metody biologické ochrany	6
2.5	Mykoparazitické houby	11
2.6	Houby rodu <i>Trichoderma</i>	12
2.7	Nejvýznamnější druhy rodu <i>Trichoderma</i>	16
2.8	<i>Coniothyrium minitans</i> W.A. Campb. 1947	18
2.9	Rod <i>Clonostachys</i> Corda (<i>C. rosea</i> f. <i>catenulata</i> , <i>C. rosea</i> f. <i>rosea</i>)	19
2.10	Izolace mykoparazitických hub z půdního prostředí	20
3	Materiál a metodika	24
3.1	Monitoring výskytu mykoparazitických hub v půdě	24
3.2	Sbírka lokálních kmenů hub zachycených v průběhu monitoringu	28
3.3	Charakterizace kmenů pomocí středových kultur	28
4	Experimentální část a výsledky	33
4.1	Monitoring mykoparazitických hub v půdě s ekologickým a konvenčním systémem hospodaření na lokalitách oblasti jižních Čech	33
4.2	Morfologické markery mykoparazitických hub rodu <i>Trichoderma</i>	34
4.3	Produkční vlastnosti mykoparazitických hub rodu <i>Trichoderma</i>	38
4.4	Biologická účinnost mykoparazitických hub rodu <i>Trichoderma</i> na vybrané původce onemocnění rostlin	41
5	Diskuze	49
6	Závěry	54
7	Literatura	55

1. ÚVOD

Téměř všechna odvětví lidské činnosti se v dnešní době střetávají s otázkou způsobu a schopnosti využití životního prostředí do takové míry, aby nedocházelo k jeho poškozování a zachovalo si svůj udržitelný rozvoj pro další generace. Mezi jedno z důležitých odvětví patří zemědělství. Jehož důležitost rok od roku narůstá, díky celosvětově se zvyšující poptávce po potravinách. Podle výpočtů Světové banky bude k uživení lidstva potřeba zvýšit produktivitu zemědělství do roku 2050 o 70%. Problémů, se kterými se dnes zemědělství potýká, je hned několik. Počínaje masivním rozšiřováním průmyslových a obytných zón a skokově rostoucí spotřeba obnovitelných zdrojů energie. Je důležité pochopit, jak správně postupovat v otázkách financování samotného hospodaření v polních systémech, které by vedlo k vyváženému vztahu vysokého výnosu, a přitom by byla zachována možnost využití prvků ekologického zemědělství v rámci potlačení využití pesticidů. Někdy je ovšem při expanzivním způsobu hospodaření hlavně u rozvojových zemí problém skloubit ohled na přirozené koloběhy a závislosti podporované biologickou ochranou, jejíž návratnost je časově náročnější než chemické prostředky s okamžitou účinností. Biologickou ochranu v širším i užším smyslu slova považuje dnes většina odborníků za ekologicky, hygienicky i ekonomicky nejvhodnější metodu potlačování škůdců. Nelze ji chápat jako samospasitelný zázrak, ale jako vědecky propracovanou metodu, jejíž úspěch je položen na znalostech ekologických nároků, správného poměru škůdců a jejich přirozených nepřátel. Pomocí vhodných postupů je nezbytný monitoring pohybu škodlivých organismů, za přispění odborných rad kvalifikovaných poradců a vědecky podložené prahové hodnoty, která by měla nasměrovat uživatele v dalším počínání. Celková záležitost vyžaduje schopnost systematické práce, trpělivosti a určitého nadhledu. Dalším přínosem biologické ochrany je nulové zatížení životního prostředí a díky vysoce specifickému účinku zpravidla neohrožuje necílové organismy. Působí přitom dlouhodobě a nemá vedlejší účinky na lidské zdraví. Výsledky se většinou dostaví později než u ochrany chemické, jsou však výrazně trvalejší. Dochází tedy k pečlivému zvažování použití prostředků v boji proti škodlivým organismům, jež by měli za následek ohrožení lidského zdraví či životního prostředí. Tuto skutečnost již rozpracovalo ministerstvo zemědělství podle zákona 326/2004 Sb. o rostlinolékařské péči novelizovaného zákonem 199/2012 Sb. vyhláškou 205/2012 Sb. o obecných zásadách integrované ochrany rostlin, která nabývá účinnosti 1. ledna 2014. Tato vyhláška zapracovává směrnici

2009/128/ES a stanovuje obecné zásady integrované ochrany rostlin za účelem dosažení udržitelného používání pesticidů. Klade se zde důraz na růst zdravých plodin při co

nejmenším narušení zemědělských ekosystémů. V dnešní době jsou tyto směrnice spíše využívány v systémech integrované produkce, jinak se spíše uplatňují jen některé dílčí prvky systému. Metodické postupy byly zpracovány na základě dostupných vědeckých poznatků a budou zveřejňovány na internetových stránkách rostlinolékařského portálu a do budoucna se promýšlí jejich propojení s informačními systémy výzkumných organizací a univerzit.

Cíl diplomové práce je zaměřen na monitoring výskytu nejvýznamnějších druhů mykoparazitických hub v půdách s ekologickým a konvenčním systémem hospodaření. Pro detekci těchto hub byly využity všechny dostupné izolační metody. Izolované kmeny byly po purifikaci uloženy do sbírky hub na Katedře rostlinné výroby a agroekologie. Dále byly v diplomové práci vypracovány biotesty zaměřené na účinnost vybraných odizolovaných kmenů mykoparazitických hub proti významným původcům onemocnění rostlin.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Integrovaná ochrana rostlin

Integrovaná ochrana rostlin byla zavedena do praxe už koncem 70. let, v důsledku zvýšených snah o zlepšení kvality produktů pomocí vývoje nejrůznějších systémů a metod ochrany (Pultar 1994). Integrovaná ochrana rostlin (IOR) představuje strategii, ve které jsou v socioekonomickém kontextu farmářského systému, spojení prostředí a populační dynamiky škůdců resp. původců onemocnění rostlin, využívány všechny dostupné regulační postupy, včetně fyzikálních, chemických a biologických, s cílem udržení populační hustoty škodlivých činitelů pod hladinou způsobující ekonomické poškození. Jedná se tedy o otevřený systém využívající všechny ekonomické, ekologické a toxikologické metody pro udržení škodlivých organismů pod hladinou škodlivosti s předností využívající přirozených omezujících faktorů (Pell *et al.* 2001). Dochází tedy k pečlivému zvažování použití prostředků v boji proti škodlivým organismům, jež by měli za následek ohrožení lidského zdraví či životního prostředí. V současnosti je známo několik desítek definic IOR, které se liší nejen v obecných formulacích, ale i v hlavních cílech. Stávající definiční kontinuum IOR osciluje od jednoduchých, pragmatických a úzce orientovaných definic (definice zaměřené na základní principy programů IOR zemědělských plodin a kultur) až po verze definující IOR velmi široce (definice více orientované na praktické i obecné aspekty životního prostředí, trvale udržitelný rozvoj, alternativní a ekologické systémy hospodaření apod.) (Bajwa a Kogan 2002).

Integrovaná ochrana rostlin podle Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2009/128/ES ze dne 21. října 2009 je definována jako pečlivé zvažování veškerých dostupných metod ochrany rostlin a následná integrace vhodných opatření, která potlačují rozvoj populací škodlivých organismů a udržují používání přípravků na ochranu rostlin a jiných forem zásahu na úrovních, které lze z hospodářského a ekologického hlediska odůvodnit a které snižují či minimalizují rizika pro lidské zdraví nebo životní prostředí. Integrovaná ochrana rostlin klade důraz na růst zdravých plodin při co nejmenším narušení zemědělských ekosystémů a podporuje přirozené mechanismy ochrany před škodlivými organismy (Anonym 1).

2.2. Biologická ochrana rostlin

Biologická ochrana je systém, který využívá přirozených antagonistů nebo jejich produktů za účelem regulace populací škodlivých organismů. Moderní prostředky biologické

ochrany jsou vysoce a dlouhodobě účinné a zároveň jsou šetrné k lidskému zdraví a životnímu prostředí a mají nízkou nebo vůbec žádnou toxicitu k necílovým druhům. Tím zvyšují bohatost, diverzifikaci a stabilitu přírodních systémů v zemědělské krajině a umožňují kvalitní produkci (Anonym 1 - Biocont Laboratory spol s.r.o., 2008).

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

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

Důvodem rozvoje ochrany je především zakotven ve snaze provádět aktivní, cílenou ochranu bez rušivých dopadů na ekosystém (Prokinova 1996). Důležité je i ovšem vystihnout dobu aplikace, posoudit míru poškození porostu a zaujmout správnou strategii v boji proti patogenům (Van Driesche a Heinz 2004). Hlavní roli u chorob rostlin hraje destrukce přírodních zdrojů v zemědělství. Konkrétně půdní patogeni způsobují obrovské ztráty, díky větší agresivitě. Za tyto rapidní změny podle vědců může hlavně celková změna v systému zemědělství a opomíjené skutečnosti, že infekce nenapadá jen rostliny ale i jejich prodávané plody. Jedním ze způsobů ochrany se nabízí použití fungicidů, na které jsou ale některé plodiny již resistantní. Působení chemických látek také záleží na jejich specifitě. Přípravky na bázi větší specifity neohrožují větší cílové skupiny skupiny, díky značné genetické proměnlivosti uvnitř populací, zatímco širokospektré preparáty usmrcující ve velké části i necílové organismy (Tjamos *et al.* 1992). Kombinace biologických kontrolních agens s redukováným stupněm fungicidní ochrany vede k významnému potlačení rostlinných chorob (Monte 2001). Bioagens můžou být tedy přirozeně se vyskytující organismy nebo geneticky modifikované druhy (Kůdela 1998). Směs

různých bioagens pak umožňuje lepší ochranu než využití jen jednoho samostatného agens (Harman *et al.* 2004). Využití biologické ochrany je již několik let zakotven v legislativě, díky směrnici (EU) č. 834/2007; článek 12 (g); při prevenci poškození rostlin chorobami, škůdci a plevele se přednostně využívá přirozených antagonistů, volby odolných druhů a odrůd, střídání plodin, kultivace a termických zásahů. Proto při zjištění rizika poškození porostu smějí být využity jen ochranné prostředky povolené k použití v ekologickém zemědělství.

(Seskupení přirozených nepřátel můžeme rozdělit do tří velkých kategorií:)

- Parazity (parazitoidy): jsou částečně či plně potravně a vývojově vázáni na svého hostitele.
- Predátoři: jsou na oběť vázáni pouze potravně a zpravidla osidlují stejný biotop, kde usmrcují větší počet hostitelů.
- Patogenní mikroorganismy: fungující na obligatorní či fakultativní bázi odčerpáváním živin (Landa 1994).

2.3. Strategie biologické ochrany rostlin

Strategie inokulativní introdukce

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

Strategie augmentativní introdukce

Strategie augmentativní (augmentace – zvětšení, zesílení, rozšíření) - hlavním principem této strategie je přímá manipulace s populacemi endemických nebo neendemických druhů přirozených nepřátel (mykoparazitických a antagonistických organismů) s cílem zvýšit jejich supresivní účinnost. Augmentativní strategie využívá praktické realizace této strategie

ve velkokapacitních biotechnologiích produkce mikroorganismů a jejich komerční dostupnost ve formě standardních biologických biopreparátů (mikroorganismy).

Inundativní introdukce

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

Sezónní inokulativní introdukce

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

Strategie podpory a konzervace přirozených nepřátel

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

2.4. Metody biologické ochrany

a) Introdukce antagonisty do prostředí

Metoda záměrné introdukce patogena do prostředí je nejvíce prostudovaná a v současné době v praxi nejčastěji používaná metoda biologické ochrany rostlin proti

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

Antibioza

Antibiозu můžeme definovat jako antagonistický vztah dvou mikroorganismů, kdy jeden mikroorganismus potlačuje životní funkce toho druhého pomocí vlastních metabolitů. Výsledkem může být až celkové selhání a smrt slabšího mikroorganismu (Baker a Griffin 1995). Tato inhibice je především umožněna díky tvorbě antibiotik a nízkomolekulárních difuzních látek zahrnující proteiny a enzymy (Handelsman a Parke 1989). Podle (Goldberg 1959) může nastat antibiозa i díky produkci alkoholu, etanolu a kyseliny mléčné. Někdy se ovšem tyto látky dají použít i pro potlačení původců onemocnění rostlin (Thomashow *et al.* 2002). Příkladem antagonistických hub využívajících tento mechanismus jsou houby rodu *Trichoderma* (Backer a Cook 1974), které svými účinnými metabolity bojují proti široké škále fytopatogenních mikroorganismů. Velmi zajímavé je rozdělení kmenů mykoparazitické houby *Trichoderma virens* podle jejich antibiotického profilu, na skupinu kmenů produkující gliotoxin usmrcující patogena *Rhizoctonia solani* a skupinu produkující gliovirin, který je například schopný usmrcovat houbu *P. ultimum* (Howell 1999).

Kompetice

Tento jev je vykládán jako dominance jednoho organismu nad druhým v rámci získávání a využívání nutričních zdrojů nebo též omezení přístupu k těmto zdrojům (Chet *et al.* 1997). Jiná definice jej popisuje jako vztah mezi jedinci vyvolaný společnou potřebou zdroje, jenž se vyskytuje v omezeném množství. Mezi tyto zdroje řadíme konkurenci o vodu,

živiny kyslík a prostor (Baker a Cook 1974). Množství kyslíku v půdě či u kořenů rostlin je velmi důležitým a často limitujícím faktorem ve vlhkých půdách (Griffin 1968). Mezi organické typy živin mohou sloužit výpotky či zastaralé tkáně mycelia z povrchových částí rostlin nebo také odpadní produkty jiných organismů a rostlin. Živiny se dostávají do půdy z organických substrátů, semen i kořenů díky koncentračnímu spádu a také difúzí. Pozorováním bylo prokázáno, že množství živin ovlivňuje toleranci k antibiotikům. Druhý typ boje o živiny nastává často v minerálně chudých půdách, kde je nedostatek anorganických látek, jako je například kompetice o železo v rhizosféře. Pomocí produkce komplexo-tvorných činidel s vysokou afinitou k iontům železa, dochází k nedostupnosti tohoto prvku i pro jiné mikroorganismy a inhibuje tak i jejich růst (Whipps 2001). Konkrétně pro většinu vláknitých hub je důležitá absorpce železa pro jejich životaschopnost a kvůli nedostatku železa jsou houby schopny vylučovat nízkomolekulární železité oxidy označované jako siderofory k mobilizaci železa z přírodních zdrojů (Eisendle *et al.* 2004). Později je pak mikroorganismus díky těmto železitým sideroforům schopen nastartovat absorpční mechanismus. Houby rodu *Trichoderma* produkují také velmi silné chelátové siderofory a zastavují tím růst jiných vláknitých hub (Chet *et al.* 1994).

Leeuwenhoek v roce 1676 již vypožoroval schopnost produktu určitého mikroorganismu inhibovat růst jiného jedince. Koncem 19. století se inhibice prokázala i na růstu kultur běžných bakterií (Chen *et al.* 2003). Prostorová kompetice je přímo úměrná růstové rychlosti organismu a odráží tu skutečnost, že pokud jeden organismus osídí substrát, pak si již tuto svou pozici udrží i v případě konfrontace s jiným agresivnějším organismem (Baker a Cook 1974). Prostorová konkurence je obecně vyšší v půdním prostředí, kde můžeme nelézt mnohem větší počet mikroorganismů než na nadzemních částech rostlin (Tari a Anderson 1988).

Mykoparazitismus

Tento jev byl prvně vypožorován de Barym v roce 1870 na houbě *Piptocephalis freseniana* a *Cicinobulus cesati*. Mykoparazitismus (hyperparasitismus) můžeme definovat jako nutriční závislost parazitického druhu houby na jiném druhu houby (Barnett *et al.* 1957). Jedná se o přímé napadení hostitele mykoparazitem za účelem využívání živin. Tento vztah byl popsán u všech skupin hub počínaje oddělením *Chytridiomycota* až po oddělení *Basidiomycota* (Jeffries 1997). Proces získávání živin může probíhat nejdříve rozpoznáním hostitele pokračujícím řízeným růstem k jeho hyfám. Mykoparazit se přimkne k hyfám hostitele a následně do nich proniká nebo začne hyfy hostitele omotávat infekčním

myceliem. Omotávání hyf hostitele místo penetrace, může být považováno za projev rezistence hostitele (Veselá 1986). Barnett a Binder (1973) rozdělili mykoparazity do dvou hlavních skupin v závislosti na způsobu jejich výživy, a to na destruktivní nebo biotrofní parazity. Nekrotrofní mykoparazité, jak už název napovídá, své hostitelské buňky nejdříve usmrtí a pak do nich pronikají. K usmrcování dochází degradací buněčných stěn skrze produkci hydrolytických enzymů (chitináza, β -1,3 glukanázy, celulázy), toxinů nebo antibiotik. Produkce enzymů je velmi důležitá v biologické ochraně rostlin (Lewis a Papavizas 1987). Těkavé metabolity (pyron, furanon) mohou způsobit smrt buňky dřívě, než dojde k samotnému oplétání hyf hostitele. Nekrotrofní mykoparazité se většinou však vyvíjí v těsné blízkosti hostitelských hyf a často jimi penetrují za účelem absorpce živin z již usmrcených buněk. Podle Veselé (1986) je i omotávání hyf hostitele jistá forma rezistence. Nekrotrofní parazité mají tendenci mít široké spektrum hostitelských druhů hub a jsou nespecializovaní.

Klasifikace mykoparazitů podle hostitelsko-parazitických interakcí (Jeffries 1997)

Nekrotrof

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

Biotrof

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

Biotrofní parazité penetrují hostitelské buňky a získávají živiny přímo z živého hostitele. Nezpůsobují degradaci buněčné stěny ani protoplastů a po určité době se vyvíjí na hostiteli bez známek většího poškození. Nejprve dochází k adaptaci parazita na prostředí hostitele a postupně se zvyšuje gradient odčerpávaných živin, což má za následek pomalejší růst

a vývoj napadeného jedince. K usmrcení dochází zpravidla až po utilizaci většího množství živin (Jeffries 1995). Typické pro biotrofní mykoparazity je úzké spektrum hostitelů, tvorba specifických infekčních struktur (Manocha 1990) a v porovnání s nekrotrofními mykoparazity nulová produkce exotoxinů (Jeffries 1997).

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

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

c) **Indukce resistance rostlin**

Indukovanou rezistenci rostlin můžeme chápat jako nepřímou metodu ochrany rostlin a patří mezi důležitou metodu (Sequeira 1983; Kuc 1987; Kloepper *et al.* 1992). Indukovaná rezistence je fyziologický „stav zvýšené obranné schopnosti“ vyvolaný specifickými vnějšími stimuly, pomocí něhož jsou vrozené obrany rostlin zesíleny následnými biotickými změnami (van Loon *et al.* 1998). Rezistence rostlin může být navozena lokálně nebo systemicky (ISR). Systemická indukovaná rezistence může být navozena různými mikroorganismy za účelem ochrany rostliny proti půdním či listovým patogenům (Paulitz a Matta 1999). Rostliny mají potenciální nebo faktickou schopnost využívat různé přirozené obranné mechanismy, které limitují infekci patogenem. Obranné mechanismy rostlin mohou být indukovány biotickými a některými abiotickými faktory (tzv. elicitory). Biotickými elicitory mohou být jak vlastní patogenní a nepatogenní organizmy, tak i jimi produkované metabolity. Nejznámějšími obrannými reakcemi rostlin je například zesilování buněčných stěn (depozice a akumulace ligninu, celulózy, fenolytických látek, aj.), produkce antibiotických molekul (fytoalexinů), odumření hostitelské buňky v místě infekce (hypersenzitivní reakce) a produkce reaktivních kyslíkatých látek, spojená se zvýšenou peroxidázovou aktivitou a polymerizací buněčných fenolů (Hammerschmidt a Kuae 1982; Lamb *et al.* 1989; Kuc 1995). Rostliny jsou také schopné vyvíjet rezistenci proti následnému šíření a vývoji fytopatogenů v neinfikovaných pletivech. Obranné mechanismy rostlinného organismu indukují dlouhotrvající, širokospektrální systémovou rezistenci k dané infekci (Ryals *et al.* 1994). Patogen

Coletotrichum orbiculare je využíván jako elicitor. Patogen je aplikován na děložní listy nebo první pravý list, vlivem jeho patogeneze navozuje rezistenci na svrchních listech téže rostliny. Některé bioagens využívané v biologické ochraně rostlin mohou být využity jako elicitory. Příkladem je druh bakterie *Pseudomonas* sp. a mykoparazitická houba *Trichoderma* sp.. Tyto bioagens jsou schopny navodit obranné mechanismy v rostlinách (Haas a Defago 2005; Harman 2004).

d) Využití supresivních půd

Supresivitu půdy lze definovat jako stav, při kterém je v dané půdě v důsledku přítomnosti konkurenčních mikroorganismů výrazně omezen vývoj původců onemocnění a/nebo hmyzích škůdců kulturních rostlin. Případně též jako stav, kdy škodlivý organizmus se v půdním substrátu sice vyskytuje, ale v důsledku konkurence jiných mikroorganismů není schopen vyvolat onemocnění nebo způsobit poškození rostlin. Vlastnost supresivních půd je pravděpodobně dána jak souborem abiotických (fyzikálních, chemických), tak i biotických (antagonistické mikroorganismy) faktorů (Chytilová a Dušek 2007).

2.5. Mykoparazitické houby

Mykoparazitické houby jsou přirozenými nepřáteli fytopatogenních hub, které způsobují různá onemocnění rostlin. Svoji aktivitu neprojevují na větší vzdálenost, ale jen při těsné asociaci hostitele a mykoparazita (Okrouhlá 1993). Mykoparazitické houby byly poprvé popsány roku 1800 mykology, kteří se zajímali o choroby rostlin (Veselá 1986). V současné době je popsáno okolo 1000-2000 druhů mykoparazitických hub, které napadají přibližně 2500 druhů jiných hub (Prokinová 1996). Vztahy mezi mikroorganismy a patogeny rostlin byly známy již v třicátých letech, ovšem zájem o ně vzrostl až v posledních letech po důsledcích neuváženého používání chemických pesticidů. O biologickou ochranu se tedy začalo masově zajímat až na konci sedmdesátých let (Nesrsta 1991).

Houby používané jako prostředek biologické ochrany rostlin mají v porovnání s bakteriemi žijícími rovněž v půdě daleko větší schopnost šířit se v půdě a v rhizosféře, což je dáno aktivním růstem hyf. Existuje celá řada druhů hub, které byly zkoumány jako prostředek biologické ochrany rostlin, ale mezi nimi jednoznačně dominují houby rodu *Trichoderma*. Toto odráží fakt, že houby rodu *Trichoderma* snadno rostou a mají široké spektrum hostitelů (Whipps a Lumsden 2001).

Mykoparazitické houby lze rozdělit na parazity napadající půdní patogeny, zejména druhy rodu *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* a na parazity hub napadající patogeny na

nadzemních částech rostlin, příkladem *Ampelomyces quisqualis* parazitující na patogenu způsobující padlí rostlin. Některé mykoparazitické houby mají i pozitivní účinky i na růst a vývoj rostlin (Sejketov 1982).

2.6. Houby rodu *Trichoderma*

Houby rodu *Trichoderma* jsou vláknité houby běžně se vyskytující v půdě polních i lesních ekosystémů. Ve fyloplánu se nachází v tlejícím dřevě. Nejčastěji se nachází v půdách mírného a tropického pásma. Houby rodu *Trichoderma* jsou antagonistické a mykoparazitické druhy napadající široké spektrum půdních původců onemocnění rostlin. V prostředí jsou schopny konkurovat patogenům jak osidlováním ekologické niky, tak i čerpáním živin z okolí. Jsou též dobrými dekompozitory organické hmoty a jsou schopny rozkládat celulózu (Nesrsta 1991).

Rod *Trichoderma* byl do mykologické literatury uveden Personem v roce 1794, druhem *T. viride* Pers. ex S. F. Gray. Houby rodu *Trichoderma* spp. jsou aktivně využívány proti celé řadě rostlinných patogenů od 20. let 20. století. Houby rodu *Trichoderma* se rozmnožují jak pohlavně, tak nepohlavně. Telemorfy náleží do rodu *Hypocrea* (Ascomycota, Ascomycetes, Hypocreales) a nepohlavní forma resp. anamorfní stádium náleží do rodu *Trichoderma* (Mitosporické houby, Hyphomycetes, Moniliales). (Nesrsta 1991; Chaverri a Samuels 2003). Vytvářejí perfektní stadia náležící do třídy *Ascomycetes* a imperfektní stadia řazená do třídy *Hyphomycetes* (Nesrsta 1991).

Úspěch druhů *Trichoderma* jako biologické agens je postaveno zejména na jejich vysoké reprodukční schopnosti, schopnosti přežít v nepříznivých podmínkách, využití živin, možnosti modifikace rhizosféry, silné agresivité resp. účinnosti proti fytopatogenům druhům hub. Tyto vlastnosti pak umožňují osidlovat různorodé habitaty v různě vysoké populační hustotě (Chet *et al.* 1997). Existuje přímý vztah mezi distribucí druhů, teplotními podmínkami a vlhkostí prostředí. Z toho lze usoudit, že půdní prostředí obohacené o nutriční zdroje a podmínky kultivace se významně podepisují na morfologii kultivovaného kmene. Houby *Trichoderma* jsou účinné jak na půdní patogeny, tak i na patogeny vyskytující se ve fyloplánu (Monte 2001). Lepší účinnost hub byla zaznamenána v kyselejších prostředí s pH okolo 3.5-5,6 (Domsch *et al.* 1980). Excelentní výsledky byly dosaženy zejména v boji proti *Pythium ultimum* a *Rhizoctonia solani* pomocí *T. virens* (Chet *et al.* 1997) a regulaci *Verticillium dahliae* pomocí *T. harzianum* v porostech brambor (Chet a Inbar 1994).

Limitujícím faktorem je vedle vlhkosti i teplota půdy. Druh *T. harzianum* se vyskytuje zejména v teplejších podmínkách a naopak *T. polysporum* a *T. viride* se vyskytují

v chladnějších oblastech (Danielson *et al.* 1973). Rozsah teplot, ve kterých mohou tyto druhy růst, je široký. Druh *T. polysporum* je schopen přežít při teplotě kolem 0°C a naopak druh *T. koningii* je schopen přežít v teplotách kolem 40 °C (Domsch *et al.* 1980). Teplota stimuluje aktivitu jejich metabolismu, speciální produkci těkavých antibiotik a enzymů (Tronsmo a Dennis 1978). Teplotu půdy ovlivňuje vodní potenciál, který stimuluje růst hyf, produkci spor, schopnost klíčit a hlavně biologickou aktivitu hub (Clarkson 2004).

Identifikace a morfologie hub rodu *Trichoderma*

Rifai (1969) a Bissett (1991) se zabývali morfologickými znaky, které jsou charakteristické pro rozlišení druhů hub rodu *Trichoderma*. V roce 1969 se Rifai pokusil vytvořit první reálný klasifikační systém druhů *Trichoderma*. Systém byl založen na rozeznávání morfologie jednotlivých druhů a na koncepci druhových agregátů. V roce 1991 podle Bisetta došlo k aktualizaci morfologické klasifikace druhů pomocí vypracovaného klíče. Typické jsou pro ně přepážky (septy) mezi jednotlivými buňkami hyf. Oba autoři se shodli, že existují problémy v identifikaci hub rodu *Trichoderma* na základě morfologických struktur. Znaky určené k charakteristice a identifikaci hub rodu *Trichoderma* jsou někdy těžko odlišitelné a proto nejsou dostatečně přesné k identifikaci jednotlivých druhů. Přesto při pečlivém pozorování morfologických struktur lze dostatečně identifikovat druhy *Trichoderma*, alespoň do té míry, do jaké byly adekvátním způsobem popsány v dostupné literatuře. Identifikace na základě morfologických znaků zůstává základní metodou pro identifikaci a ověřování druhů v *Trichodermy* (Samuels 1996). Nicméně v současné době se používají pro identifikaci genetické metody (Lieckfeldt *et al.* 1998).

Metody využívané pro odlišení jednotlivých druhů rodu *Trichoderma* jsou založeny na universálním primeru PCR identifikace spolu s UP-PCR produktem křížové hybridizace a ITS1 ribotypizace. Dochází tedy k identifikaci markerů pro rozvoj specifické detekce zkoumající označené druhy. Tímto postupem jsou zjišťovány podrobné mezidruhové souvislosti. Včetně velmi proklamovaných druhů *T. harzianum*, *T. virens*, *Clonostachys roseum* f. *roseum* (*Gliocladium roseum*), které jsou popsány jako antagonisté bojujících proti půdním patogenům. Samotná podobnost mezi druhy se vyhodnocuje dot blot hybridizací s pomocí UP-PCR, která byla použita pro seskupení druhů do patnácti genetických subjektů. ITS ribotypizace byla provedena digestací PCR, využívající rDna a produkty elektroforézy. Informace získané z kombinace UP-PCR a ribotypizace mohou objasňovat klasifikaci druhů i přes jejich odlišnosti, ovšem k nalezení specifických genetických markerů je třeba znát více genetických souvislostí. Metoda ředění na selektivních médiích kombinovaná

s morfologickými studii se tradičně používá pro populační studie druhů těchto hub (Papavizas 1985). Nevýhodou této metody je občasná záměna mezi druhy jednoho kmene nebo též problematické vyhodnocování výsledků vzácnějších isolátů. Proto je třeba použít takovou metodu, která by usnadnila rozeznání a monitoring druhů, což by přispělo k lepšímu pochopení druhů přirozeně se vyskytujících v prostředí nebo introdukovaných do prostředí ve formě biopreparátů (Jensen a Wolffhechel 1995). Některé tyto metody pak usnadňují studie efektu selekčního tlaku na diverzitu původních druhů *Trichoderma* v půdě i v rhizosféře a umožňují tak rozšíření znalostí genetických struktur a populační dynamiky původních populací v různých typech půd před introdukcí selektivních druhů. Za zmínku stojí i testování a třídění druhů podle schopnosti navodit supresivní prostředí v různých půdách (Lübeck *et al.* 1996). *Trichoderma* má potenciál se stát cenným organismem pro studie diversity a genetických struktur populací.

Znaky kolonií mohou být rozlišující a charakteristické pro jednotlivé druhy. Nicméně, popsat vzhled kolonie s dostatečnou přesností je obtížné, tak aby mohl být využit pro identifikaci druhů. Rychlost růstu kultury může napomoci k odlišení druhů, které jsou si morfologicky podobné. Tvorba konidií na konidioforech různě rozmístěných v myceliu nebo na konidioforech tvořících svazečky (synemata) nebo pustuly je obvykle charakteristické pro jednotlivé druhy. Pigmenty mohou být též charakteristické, ačkoliv barva těchto pigmentů se výrazně u hub rodu *Trichoderma* nemění. Kmeny náležející do sekce longibrachiatum mají obvykle nápadně světlé zeleno-žluté pigmenty, alespoň při první izolaci. Světlé žluté pigmenty jsou běžné u některých druhů, ale nejsou příliš výrazné. Barva mycelia druhů hub rodu *Trichoderma* přímo koreluje se stupněm sporulace kultury. Barva kultury osciluje od žluté přes různé odstíny zelené barvy. Plně sporulující kultury některých druhů mají až tmavě zelené zbarvení (Gams a Bisette 1998; Schuster a Schmoll 2010).

Tvorba větvených konidioforů a jejich agregace do synemat nebo pustul je využita pro identifikaci kmenů *Trichoderma* a jejich zařazení do sekcí a druhových agregátů. Kompaktní pustuly jsou charakteristické pro druhy zařazené v sekci Pachybasium. Větvení konidioforů může být pravidelné, kdy jsou konidiofory umístěny přeslenovitě, nebo může být větvení konidioforů nepravidelné. Větve mohou být široké a rovné nebo relativně úzké a zvlněné. Po některé druhy je typické, že špičky konidioforů končí sterilním protažením. Špičky mohou být rovné, vlnité nebo různě stočené. Konidiogenní buňky mohou být uspořádány pravidelně dokola kolem hyfy konidiofrou nebo mohou být umístěny v páru nebo různě rozmístěné. Tvar konidiogenních buněk je charakteristický pro danou sekci. Konidiogenní buňky jsou krátké a zakulacené v sekci Pachybasium, zatímco v sekci longibrachiatum jsou podlouhlé a

lahvicovité až téměř válcovité. Terminální konidiogenní buňky jsou u většiny druhů více prodloužené a štíhlé (Anonym 2). Konidie jsou jednobuněčné hladké, tenkostěnné většinou kulovité až vejčité (2,5-3,0 x 2,0-2,5 μm). Konidie vznikající z konidiogenních buněk jsou mucilagenní hmotou drženy u sebe v tzv. balíčcích (Gams a Bisette 1998).

Kolonizace kořene

Kolonizace kořenů houbami rodu *Trichoderma* přispívá k lepšímu vstřebávání a využití živin, růstu a vývoji dané rostliny a zároveň dochází k navýšení výnosu. Po aplikaci také dochází k navození resistance v rostlinách a ty odolávají snadněji jak abiotickým, tak i biotickým stresům. Po aplikaci *T. hamatum* a *T. koningii* klizňová byl zaznamenán několikanásobně vyšší výnos pěstované plodiny v polních podmínkách (Arora *et al.* 1992). Obdobné výsledky v navýšení produkce byly zaznamenány i u skleníkových plodin, kde byla aplikována *Trichoderma harzianum* (Chet *et al.* 1997). V laboratorních podmínkách byla též zjištěna větší klíčivost namořených semen díky zvýšené činnosti auxinů, cytokininu, navzdory produkci etylenu a indolu jiných vláknitých hub (Benitez *et al.* 1998). Spolu se syntézou a stimulací rostlinných hormonů dochází u *Trichoderma* k okyselování okolního prostředí vylučováním organických kyselin (např. kyselina glukonová, kyselina citronová a kyselina fumarová) (Gomez-Alarcon *et al.* 1994). Tyto kyseliny dokážou rozpouštět fosfáty, minerální kationty (železo, mangan a hořčík), což se dá velmi dobře využít k navýšení výnosu pěstovaných plodina na chudých půdách (Harman 2004).

Enzymatická a antibiotická produkce

Houby rodu *Trichoderma* produkují významné enzymy degradující polymery. V oblasti výzkumu produkce enzymů můžeme *Trichoderma* spp. zařadit hned po *Aspergillus* sp. (Kubicek a Harman 1998). Velmi významný je celulytický komplex, který degraduje i krystalickou celulózu. Z dalších významných enzymů můžeme zmínit xylanázu, chitinázu, glukonázu (Carsolio *et al.* 1994). K ochraně kořenového systému přispívají antibiotika a extracelulární lytické metabolity, vznikající díky zvýšenému buněčnému obsahu endoplasmatického retikula. Samotná ochrana není odvozena jen z tvorby vlastních antibiotik hub *Trichoderma*, ale také ze schopnosti produkovat látky stimulující rostlinný organismus k produkci vlastních antimikrobiálních sloučenin (Harman *et al.* 2004). Antibiotika působí synergisticky s enzymy a dělí se do dvou větších skupin (Benitez *et al.* 2004). Nízkomolekulární nepolární komponenty s delší působností na mikrobiální komunity a polární antibiotika a peptidy s kratšími účinky (Lorito *et al.* 1996). Podle Prokinové (1966)

mohou metabolity působit nejen stimulačně, ale také vysoce toxicky pro určité druhy hub. Kmeny jsou schopny produkovat více než 100 různých metabolitů s antibiotickou aktivitou. Produkci antibiotik je nejvíce známa *Trichoderma viride* (Harman a Kubicek 1998).

2.7. Nejvýznamnější druhy rodu *Trichoderma*

Trichoderma virens Miller, Giddens a Foster

Trichoderma virens je kosmopolitně rozšířený druh mykoparazitické houby, který byl odizolován ze sklerocií houby *Sclerotinia minor* v Beltsville v USA (Hebbar a Lumsden 1999). *T. virens* kmen GL 21 je aktivní složkou komerčního biopreparátu SOILGARD™ 12%G, který je registrován v USA. Obecně je *T. virens* z hlediska jeho možného využití v biologické ochraně rostlin považováno za velmi perspektivní druh (Wilhite *et al.* 1994).

Perfektní stádium *T. virens* patří do rodu *Hypocrea*, který vytváří dobře vyvinutá živě zbarvená stromata, v nichž jsou uložena peritécia. Imperfektní forma *T. virens* náleží do pomocného oddělení *Deuteromycota* (*Hyphomycetes*, *Moniliales*) (Hebbar a Lumsden 1999).

Houba *T. virens* vytváří zpočátku bílé vatovité mycelium, které později mění barvu na zelenou. Barva mycelia přímo koreluje se stupněm sporulace kultury. Plně sporulující kultury mají až tmavě zelené zbarvení. Mycelium *T. virens* je vláknité, větvené, přehrádkované, většinou tvořené jednojadernými buňkami. Na myceliu se tvoří septické konidiofory, které se v horní části větví. Na konidioforech se vytvářejí masy hyalinních nebo jasně zbarvených jednobuněčných konidií kulovitého tvaru, které se tvoří ve vrcholové části postupně za sebou. Konidie se drží pohromadě, neboť jejich soudružnost jim zabezpečují kapénky mucilagenního sekretu (Váňa 1996). *T. virens* je saprotrofní i mykoparazitická houba, jejíž přítomnost v půdě zvyšuje přirozenou supresivitu půd. Tento druh houby se běžně vyskytuje jako součást půdní mikroflóry ve všech půdách, zejména v půdách, které jsou bohaté na organické látky. *T. virens* parazituje na mnoha půdních houbách způsobujících padání klíčících rostlin. Mezi významné hostitele z této skupiny patří *Fusarium* spp., *Sclerotinia* spp., *Pythium* spp., *Verticillium* spp., *Botrytis* spp. a *Rhizoctonia* spp. (Dennis a Webster 1971; Howell *et al.* 2000, Howell 2002). Houba *T. virens* působí na patogeny také produkcí antibiotických metabolitů gliovirinu a gliotoxinu (Howell *et al.* 1993; Howell a Puckhaber 2005; Hanson a Howell 2004), které mají antibakteriální a fungistatické účinky. *T. virens* obvykle přežívá v půdě na organické hmotě vegetativními segmenty mycelia, někdy také chlamydosporami (Samuels a Rehner 1993).

***Trichoderma harzianum* (Rifai) 1969**

Rychlost růstu mycelia tohoto druhu je pomalejší než u jiných druhů. Má schopnosti zbarvovat agar do žluté až temně oranžové barvy. Kolonie rychle osidlují rhizosféru (Okrouhlá 1993) a díky velké produkci propagulí velmi dobře přežívají (Klein et al. 1998). Barva kolonií se mění nejprve od průsvitně bílé až po tmavě zelenou, v závislosti na sporulaci kultury. Časem se mění i struktura mycelia od hladké vrstvy na tzv. chomáčky (Nesrsta, 1991). Konidiofory se stromečkovitě větví a fialidy se formují do lahvicovitého tvaru. Konidie jsou kulovité, zbarvené do bledě zelené barvy (Kubicek a Harman 1998). Využívá se hojně v ochraně rostlin. Chrání rostliny proti kořenové hnilobě mrkve, sklerotiniové hnilobě cibule nebo také proti patogenům *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* a rodu *Fusarium* (Sivan a Chet 1989; Gullino 1992; Vinale et al. 2004). Účinnost *T. harzianum* je založen na schopnosti mobilizovat velké množství důležitých půdních živin při kompetici s jinými mikroorganismy. Na bázi této houby jsou registrovány přípravky: Root Pro, Trichodex (Izrael), RootShield, PlantShield, T22 Planterbox (USA), Trianum (Holandsko). V České Republice byl donedávna registrovaný přípravek Supresivit.

***Trichoderma viride* Pers., (1794)**

Je jedním z často popisovaných hub rodu *Trichoderma*. Houba *T. viride* je schopna degradovat organochloridové látky v půdním prostředí (Smith 1995) a schopna regulovat fytopatogenní druhy hub jako *Rhizoctonia*, *Pythium* a *Sclerotinia* (Brown a Bruce 1999; Brown et al. 1999). Zlepšuje také dostupnost fosforu pro rostliny (Rudresh et al. 2005). Kolonie houby *T. hamatum* se vyznačují rychlým růstem, po 7 dnech na MEA při 25 °C pokrývající celou Petriho misku řídkým bělavým myceliem, později při sporulaci přechází do tmavě zelené barvy. Nezbarvené konidiofory se opakovaně pyramidovitě větví. Lahvicovité konidiogenní buňky často se zakřiveným krčkem vyrůstají po 2-4. Konidie jsou kulovité až široce elipsovité s rozměry cca 3,5-4,5 μm. Bradavičnatý povrch se barví do tmavě zelené. Ve starších koloniích se často tvoří chlamydospory kulovitého tvaru (Samuels 1996). Teleomorfoou druhu *T. viride* je *Hypocrea rufa*.

***Trichoderma atroviride* (Rifai)**

Řadí se mezi vláknité kosmopolitní houby. Tvoří rychle rostoucí středně husté mycelium. Barva kolonií je vodnatě bílá s chomáčkovitě vzdušným povrchem. Pod modrým světlem jsou po týdnu inkubace dobře viditelné spory. Konidie se tvoří na kompaktních pustulách, které jsou rovnoměrně rozmístěné po médiu. Známa je její účinnost proti

Rhizoctonia solani na rajčatech, fazolích okurce a jahodách. Mechanismus byl studován na dvou kmenech *T. atroviride* P1, (ATCC 74058) a divokém kmeni získaném ze Švédska IMI 206040. Celkový úspěch je založen na schopnosti mobilizovat velké množství důležitých půdních živin při kompetici s jinými mikroorganismy. Morfologicky je snadno zaměnitelný s tmavě zelenými konidii *T. asperellum* a *T. harzianum* (Brunner *et al.* 2005; Gullino 1992).

***Trichoderma hamatum*: (Bonord.) Bainier 1906**

Kolonie *T. hamatum* rostou pomaleji, tvoří řídké mycelium, které je zbarvené bělavě nebo šedozeleně. Konidiofory jsou značně větvené, na konci hyf tvoří konidiofory. Konidiogenní buňky jsou seskupeny po 2-5 na vrcholu konidioforu, někdy vyrůstají jednotlivě a nepravidelně na delších větvích. Konidie jsou bledě zelené, hladké a oválné. *T. hamatum* se nejlépe rozvíjí na humusu promíchaného s opadem listnatých stromů (Widden a Hsu 1987).

2.8. *Coniothyrium minitans* W.A. Campb. 1947

Mykoparazitická houba *Coniothyrium minitans* (Ascomycota: Pleosporales: Leptosphaeriaceae) vytváří variabilní kultury, které se zprvu vyznačují slabším myceliálním růstem. Postupem času se povrch hyf stává zrnitější a houstne. Mycelium produkuje velké množství pyknid zformovaných do řetízků anebo bývají volně rozmístěny mezi hyfami. Jejich tvar je kulovitý až oválný s tmavě hnědým až černým nádechem o velikosti kolem 150-600 µm. Vnější stěna pyknid je tvrdší se silným pigmentem, zatímco vnitřní část je měkká a hyalinní. Obě dvě části jsou tvořeny pseudoparenchymem. Růst pyknid se prokázal nejen na povrchu, ale také i uvnitř živných kultur. Dalším útvarem jsou konidiogenní buňky, vyrůstající z vnitřní stěny pyknid. Pyknostry jsou tmavé barvy, připomínající vejčitou až elipsoidní strukturu. Jejich velikost je o dva řády nižší než velikost pyknid, cca kolem 4-7 x 3-4 µm. Známa je schopnost rozpoznání hostitele a pronikání *C. minitans* pomocí penetračních hrotů přímo pigmentovou skvrnou nebo skrz některé poškozené místo na buněčné stěně. Poté pomocí enzymů (glukanáz, chitináz) umožňuje postupnou lyzi buňky (Zeng *et al.* 2012; Kaur *et al.* 2005).

Houba *C. minitans* byla prvně izolována ze sklerocií *Sclerotinia sclerotiorum* v roce 1947 v Kalifornii, při studiích prováděných na rostlinách napadených hlízečkou obecnou (Cambell 1947). Jedná se o kosmopolitní organismus vyskytující se na všech kontinentech kromě Antarktidy (Bennett *et al.* 2006). Řadí se mezi úzce specializované mykoparazity,

napadající sklerocia hub *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, *S. minor*, *S. cepivorum* i *Botrytis cinerea* (Gerlagh *et al.* 1996; Zeng *et al.* 2012).

Spory dobře klíčí ve vlhčí půdě s teplotami mezi 5 a 25 °C. Ideální vlhkost půdy je mezi 60-70% a teplota mezi 10 a 25 °C. V sušších podmínkách se konidie na povrchu sklerocií dožívají maximálně deseti měsíců (Bennett *et al.* 2006). Stejně je to i s teplotou, mycelium při teplotě nad 30 °C blokuje svůj růst (McQuilken a Whipps 1995).

Získává se z půdy pomocí metody ředění nebo metodou prekolonizace. Využívá se proti hlízence obecné u řepky, celeru a slunečnice (Luth 2001). Neparazituje jen na sklerociích, ale i přímo na myceliu patogena (Yang *et al.* 2007; Huang 1977). Proto se stala součástí mnoha studií, které potvrzují vysoký potenciál využití toho mykoparazita, jako bioagens v ochraně proti chorobám způsobeným *S. sclerotiorum* (Yang *et al.* 2007). V dnešní době se na trhu můžeme setkat s produktem Contans WG, distribuovaný do obchodů v granulované podobě. Podmínkou účinnosti tohoto preparátu je správné rozředění přípravku a vpravení do hloubky půdy cca 5-10 cm. Postřiky je nutné provádět několik týdnů před výsadbou, tak aby se poskytl určitý čas pro kolonizace patogena.

2.9. Rod *Clonostachys Corda (Clonostachys rosea f. catenulata, C. rosea f. rosea)*

Mykoparazitické houby rodu *Clonostachys* se běžně vyskytují v půdě. Druh *Clonostachys rosea f. rosea* kolonizuje rostliny jako endofyt, ale dokáže změnit svojí potravní strategii na saprofytismus nebo parazitismus, kde napadá jiné houby, ale i hlístice. Rod *Clonostachys* nejprve vytváří vlnatě bělavé mycelium, které se po určité době zbarvuje do růžova (*C. rosea f. rosea*) nebo do zelena (*C. rosea f. catenulata*). Konečnou fází barevné přeměny je formace zeleného středu kolonie u obou druhů. Někdy se mohou objevovat i koncentrické kruhy, oddělující mezi sebou sterilní mycelium. Spodní strana kultury na živné půdě bývá nažloutlá nebo je nezbarvena. Konidie nepříliš rychle rostou a jsou formovány do řetízků obalených slizem, jejichž délka může dosahovat až 150 µm. Struktura konidií je lehce eliptická s hladkou konturou. Maximální teplota pro sporulaci je 29 °C. Optimální podmínky jsou 25-28 °C, minimum 4-8 °C. Tvoří se dva typy konidioforů: (1) přeslenitě větvené konidiofory se třemi až pěti dlouhými štíhlými fialidy, nesoucí na vrcholu kulovitý shluk konidií a (2) štětcovitě větvené konidiofory s fialidami přitisknutými k sobě a konidiemi slepenými v nepravidelné útvary na vrcholu konidioforů. Konidie z obou typů konidioforů jsou jednobuněčné, hyalinní, oválné nebo elipsovité, avšak při pohledu z boku mírně asymetrické, hladké, obvykle 5-7 x 3-4 µm velké. Hlavní diagnostickým znakem je tedy tvar konidioforů.

Významná schopnost *C. rosea* f. *rosea*, pro kterou je tato houba ceněna spočívá v produkci celé řady těkavých látek, které jsou toxické pro hmyz, bakterie i jiné houby (Sutton a Sirjusingh 1996). Mezi tyto látky patří například gliotoxin s fungistatickými účinky nebo též různé druhy antibiotik, které snižují následky posklizňového úhynu a chrání semena v době před vyklíčením. Jako biologické agens se využívá v boji proti *Botrytis cinerea*, kdy penetruje hyfy a konidie hostitele. Hlístice infikuje zachycením svých konidií k pokožce, po procesu klíčení dochází k prorůstání epidermis a k usmrcení hostitele. Zásadní využití je ovšem v boji proti patogenům. Dobré výsledky byly zaznamenány u *Moniliophthora perniciosa* (známá jako *Crinipellis perniciosa*), *Moniliophthora roreri* a *Phytophthora palmivora* (Krauss a Soberanis 2002), které omezuje v kompetici o živiny a parazitací jejich hyf. Podle studií na *Pinus radiata* má schopnosti parazitace na hyfách patogena *Fusarium circinatum*, pomocí antibiózy (Sirjusingh 1996). Nedávno byly také u toho druhu prokázány endofytické schopnosti na kakaovníku. Podle Schroers *et al.* (1999) se hojně využívá v boji proti *Clonostachys byssicola*, která osidluje rhizosféru, listy a semena kakaovníku na Kostarice (Ten Hoopen *et al.* 2003)

2.10. Izolace mykoparazitických hub z půdního prostředí

Z půdních vzorků mohou být izolovány mykoparazitické druhy hub rodu *Trichoderma*, rodu *Clonostachys*, *Coniothyrium minitans* popřípadě i houbě podobný organismus *Pythium oligandrum*. Houby rodu *Trichoderma* jsou relativně snadno izolovány z půdy několika dostupnými konvenčními metodami, a to díky jejich rychlému růstu a velké tvorbě konidií. Díky tvorbě chlamydospor jsou také snadno získávány metodami založenými na promývání půd (Gams a Bisset 1998). Pokud jde o další metody izolace těchto hub, nabízí se celá řada technik, z nichž některé je doposud nutné optimalizovat, popřípadě zpřesnit, protože získávání čistých kultur je tou nejdůležitější podmínkou pro další práci s těmito organismy. K nejvíce využívaným metodám (selektivní) izolace patří například metody PPT („Pre-colonised plate method“), využití selektivních živných půd, DTP („Dilution plate method“) (Rabeendran *et al.* 1998) a SBT („Sclerotia bait technique“), využívající jako „selektivní návnadu“ sklerocia houby *Sclerotinia sclerotiorum* (Ribeiro a Butler 1998).

Technika využívající návnadu („bait technique“) spočívá v tom, že se organický substrát obohatí o živou návnadu nebo jiný výživný zdroj (sláma, otruby, kroupy) a následně se substrát promíchá s testovaným vzorkem půdy. Předpokladem použití této techniky je ten, že přítomný organismus bude parazitovat na vložené návnadě resp. kolonizovat jiný zdroj a tím se bude na těchto složkách více rozmnožovat a hlavně bude možné tento zdroj následně

izolovat. Sklerocia jsou často používána pro selektivní izolaci mykoparazitických hub z půdy. Populace mykoparazitů může být v půdě navýšena a následně izolována i tím, že se do půdy vloží různé patogenní druhy hub, např. *Verticillium* spp., *Rhizoctonia* spp. a *Sclerotinia* spp.. Touto metodou se mohou získat druhy *Coniothyrium minitans*, *Clonostachys* spp., *Trichoderma* spp. (Gams *et al.* 2004). Ayers a Adams (1985) kvantifikovali množství vyskytujícího se druhu *Sporodesmium sclerotivorum* a dalších parazitů sklerocií z počtu infikovaných hostitelských sklerocií, která se přirozeně vyskytovala v půdě, nebo ze sklerocií, která byla do půdy záměrně vložena jako živá návnada. Vyjmutá sklerocia z půdy vložili na filtrační papír a po inkubaci sledovali jejich parazitaci. Sklerocia houby *Sclerotinia sclerotiorum* mohou sloužit i jako návnada pro izolaci mykoparazitického druhu *Pythium oligandrum* (Ribeiro a Butler 1992). Návnady nebyly obecně v minulosti využívány v širokém měřítku k izolaci druhů hub z půdy. Spíše byly používány sporadicky k zjišťování volně žijících populací mykoparazitů. Pro eliminaci destruktivních patogenů rostlin byla právě vyvinuta technika využívající návnady s cílem izolovat mykoparazitické druhy těchto nežádoucích druhů hub. Zároveň se vyvíjí selektivní živné půdy pro izolaci mykoparazitických hub (Tuite 1969; Singleton *et al.* 1992).

Pro izolaci *Verticillium bigattutum* použili metodu, kdy půdní výluh nanášeli na plně porostlou kulturu fytopatogenní houby *Rhizoctonia solani*. Morris *et al.* (1992) upřesnili metodu tím, že aplikovali půdní výluh na kulturu *R. solani* kultivovanou na živnou půdu PDA s upraveným pH na hodnotu 4. Mulligan a Deacon (1992) rozšířili metodu tak, že využili další hostitelské druhy hub. Půdní výluh aplikovali na kulturu porostlou *F. culmorum* a tím vyizolovali druh *Pythium oligandrum*, z patogena *R. solani* byly získány druhy rodu *Trichoderma*, z *Botrytis cinerea* izolovali druh *Papulospora*. Pro izolaci druhu *Clonostachys rosea* f. *rosea* použili všechny tři hostitelské druhy hub. Nanesení půdních částic z testovaného půdního vzorku na Petriho misku s potencionálním hostitelským druhem je alternativní metodou k metodě předešlé, kde se na vyvinuté mycelium fytopatogenních druhů aplikuje půdní výluh. Mycelium hostitelského druhu slouží jako živá návnada, na které mohou parazitovat mykoparazitické druhy hub (Gams *et al.* 2004; Foley a Deacon 1985). Metoda založená na aplikaci vodního výluhu nebo nanesení půdních částic na plně vyvinutou kulturu fytopatogenní houby se nazývá „pre-colonised plate method“. Petriho misky porostlé kulturou *Pythium* byly též použity pro izolaci mykoparazitického druhu *P. oligandrum* (Gams *et al.* 2004).

Pro izolaci mykoparazitických hub se zároveň vyvíjí selektivní živné půdy (Tuite 1969, Singleton *et al.* 1992). Pro izolaci druhu *Talaromyces flavus* z půdy je vyvinuta

selektivní živná půda, kde je využita živná půda PDA obohacená o kyselinu mléčnou (0,1%), antibiotika (4 mg pimaricinu a 30 mg nystatinu) a hovězí žluč (Oxgall, 0,5 g na litr) (Morris *et al.* 1984). Izolovat rychle rostoucích a hojně sporulující druhy hub rodu *Trichoderma* je obvykle jednoduché. Semiselektivní techniky mohou být použity pro zjišťování konkrétních druhů (Elad *et al.* 1981; Askew a Laing 1993). Elad a Chet (1983) modifikovali médium pro izolaci hub rodu *Trichoderma* (glukóza 3g, agar 20 g, MgSO₄ +7H₂O 0,2 g, K₂HPO₄ 0,9 g, KCl 0,15 g, NH₄NO₃ 1 g, chloramfenikal 0,25 g, fenaminosulfát 0,3 g, PCNB 0,2 g, Rose Bengal 0,15 g, destilovaná voda 1L) přidáním 20 mg captanu na litr média po jeho vysterilování. Askew a Laing (1993) nahradili fenaminosulfát s propamokarbem nebo metalaxylem. Tyto látky potlačili druh hub z oddělení Oomycota. K selektivní izolaci druhu *Clonostachys rosea* f. *rosea* a *Trichoderma virens* použili Park *et al.* (1992) médium s benzylem, propionátem sodným, bengálskou červení a antibiotiky, doplněného o 1 mg etheru a 60 mg acriflavinu nebo 20 mg gliotoxinu na litr. Williams *et al.* (2003) vyvinuli selektivní živnou půdu pro izolaci mykoparazitických a antagonistických hub rodu *Trichoderma*. Pomocí této selektivní půdy může být kvantifikováno i množství propagulí *Trichoderma* ve vzorku půdy. Základní médium je složeno z 0,2 g MgSO₄.7H₂O, 0,9 g K₂HPO₄, 1,0 g NH₄NO₃, 0,15 g KCl, 0,15 g bengal rose, 3 g glukózy, a 20 g bakteriologického agaru na jeden litr destilované sterilní vody. Do takto připraveného zchlazeného média na 60 °C jsou přimíchány antimikrobiální přísady v objemu 40 ml (0,25 g chloramphenicol, 9,0 ml streptomycin stock solution (1% wt/vol), 0,2 g quintozone, a 1,2 ml of propamocarb). Pro detekci mykoparazitických hub rodu *Trichoderma* z půdního prostředí jsou v současnosti používána další různá selektivní média. Příkladem selektivních médií, která byla publikována, je médium označené TSMC "*Trichoderma* selectivní medium" citované Chen *et al.* (1988), TSMAs vyvinuto Elad *et al.* (1983). Toto médium bylo dále modifikováno (Askew a Laing 1993) a označeno TSB. Doposud nebyla vyvinuta selektivní živná půda pro izolaci druhů *Clonostachys rosea* f. *catenulata*, *C. rosea* f. *rosea*, *C. minitans* nebo organismus *Pythium oligandrum*.

Nejčastěji používanou metodou pro izolaci půdních druhů hub je tzv. metoda zředovací "dilution plate method". Půdní vzorky musí být ředěny několikrát v sérii za sebou (1:9). Naředěný výluh je následně inokulován na živné médium obohaceného o antibiotika. Tato metoda je jednoduchá a rychlá, poskytuje poměrně opakovatelné výsledky a přináší vynikající srovnávací údaje. Vzorek půdy se převede do sterilní vody nebo roztoku 0,05-0,2% agaru, dextrinu nebo 0,1-0,2% karboxymethyl celulózy. Tyto ingredience jsou přidávány proto, aby došlo ke zpomalení sedimentace půdních částic čímž je půdní výluh rovnoměrně

rozvrstven v ředěném množství suspenze. Vzhledem k tomu, že se liší půdy v hustotě propagulí, doporučuje se zkušební analýzy s cílem určit poměr půda/voda tak, aby se na Petriho misce v průměru 100 mm objevilo minimálně 5 kolonií hub a maximálně 30 kolonií. Nízká hustota kolonií zaručí, že nedojde k interakci mezi izolovanými druhy hub (Gams *et al.* 2004).

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. Monitoring výskytu mykoparazitických hub v půdě

Monitoring přítomnosti mykoparazitických hub byl prováděn na lokalitách s konvenčním a ekologickým systémem hospodaření. Na vybraných lokalitách vždy sousedil pozemek ekologického systému hospodaření s pozemkem konvenčně zpracovávaným. Všechny vtypované lokality se nacházely na území jižních Čech. Lokality byly vyhledávány pomocí veřejného registru půdy (Lpis).

Tabulka 1: Základní charakteristika lokalit ekologických (EZ) a konvenčních (KZ) farem zahrnutých do studie monitoringu přirozeného výskytu entomopatogenních hub v půdě.

Obec, okres	Označení lokality	Výměra (ha)	GPS souřadnice	Nadm. výška	Plodina	
					2010	2011
Nakolice, Č. Budějovice	1/EZ	9,93	N48 48.110 E14 50.021	480	jetel	ječmen
	1/KZ	2,00	N48 48.123 E14 49.883	483	pšenice	ječmen
Nakolice, Č. Budějovice	2/EZ	9,93	N48 48.110 E14 50.021	480	jetel	ječmen
	2/KZ	10,36	N48 47.967 E14 50.117	481	žito	pšenice
Hradiště, Český Krumlov	3/EZ	31,50	N48 43.937 E14 32.906	631	oves	pšenice
	3/KZ	8,00	N48 43.762 E14 33.446	611	řepka	pšenice
Dobročkov, Prachatice	4/EZ	22,52	N48 54.253 E14 08.985	664	jetel	jetel
	4/KZ	8,12	N48 54.320 E14 09.370	652	louka	louka
Dobrá Voda, Jindřichův Hradec	5/EZ	18,84	N49 03.620 E15 05.924	612	konopí	konopí
	5/KZ	12,20	N49 03.717 E15 06.053	613	jetel	jetel
Bílá, Jindřichův Hradec	6/EZ	22,38	N49 04.264 E15 02.370	531	pšenice	oves
	6/KZ	10,75	N49 04.340 E15 01.936	530	pšenice	mák
Dančovice, Jindřichův Hradec	7/EZ	12,97	N48 57.845 E15 33.276	463	ječmen	pšenice
	7/KZ	141,06	N48 58.134 E15 33.464	467	pšenice	ječmen
Rancířov, Jindřichův Hradec	8/EZ	36,07	N48 55.747 E15 31.129	493	ječmen	ječmen
	8/KZ	104,97	N48 56.106 E15 30.880	486	jetel	jetel
Hluboká u Dačic, Jindřichův Hradec	9/EZ	155,10	N48 54.889 E15 32.237	485	žito	oves
	9/KZ	31,61	N48 54.551 E15 32.825	491	pšenice	jetel
Dvory, Prachatice	10/EZ	13,56	N49 02.601 E13 57.258	575	pšenice	pšenice
	10/KZ	17,72	N49 02.842 E13 57.107	565	oves	pšenice
Dvorec, Prachatice	11/EZ	7,56	N49 05.664 E14 02.153	482	pšenice	oves
	11/KZ	10,03	N49 05.524 E14 02.312	474	oves	pšenice
Pístina, Jindřichův Hradec	12/EZ	3,52	N49 03.080 E14 53.313	446	louka	louka
	12/KZ	13,30	N49 03.127 E14 53.249	445	pšenice	tritikále
Novosedly nad Nežárkou, J.Hradec	13/EZ	17,68	N49 05.755 E14 50.495	422	pšenice	louka
	13/KZ	7,01	N49 05.514 E14 50.197	422	pšenice	ječmen

3.1.1. Odběry a skladování půdních vzorků

Z hodnocené lokality byl odebrán reprezentativní půdní vzorek o objemu přibližně 1,5 litru, který byl složen z 5 dílčích vzorků. Půdní vzorky byly odebírány standardně na všech vybraných lokalitách. Jednotlivé kroky odběrů byly následující:

- vzorky půdy se po odstranění vegetačního pokryvu odebraly pomocí zahradnické lopatky do hloubky 10-15 cm.
- půdní vzorky byly vloženy do sterilních polyetylenových sáčků – půdní vzorek byl složen z dílčích vzorků o objemu cca 1,5 litru.
- současně s odběrem vzorků půdy byly zaznamenány náležitosti lokality (pracovní název lokality, GPS souřadnice, datum odběru, účel odběru, typ hospodaření - ekologický a konvenční systém hospodaření apod.).
- před odběrem nového vzorku půdy byla zahradnická lopatka zbavena zbytků půdy a vysterilována alkoholem kvůli zamezení přenosu půdních mikroorganismů z jedné lokality na druhou.
- vzorky byly po odběru v terénu uloženy do tepelně izolovaného kontejneru a do doby analýzy uskladněny v chladu (4-7°C).

3.1.2. Monitoring mykoparazitických hub v půdě pomocí semi-selektivních živných půd - *Metoda DPT („Dilution plate technique“)*

Principem metodického postupu je aplikace výluhu získaného z analyzovaných půdních vzorků na povrch standardního živného média doplněného o širokospektrální antibiotika. V první řadě je nutné půdní výluh postupně ředit a sestupnou řadou ředění následně nanášet na povrch živné půdy PDA (semi-selektivní médium) obohacené o antibiotika potlačující růst a vývoj bakterií. Tento postup je výhodný převážně pro detekci rychle rostoucích druhů antagonistických a mykoparazitických hub schopných rychle porůstat povrch živné půdy, resp. se následně vyvíjet i na jiných druzích hub, které se v půdě též vyskytují. Postup lze specifikovat následovně:

- 25 ml půdního vzorku bylo umístěno do Erlenmayerovy baňky a následně bylo přidáno 100 ml sterilní destilované vody.
- Erlenmayerovy baňky s půdním výluhem byly umístěny na reciprokou třepačku po dobu 30 minut.
- promíchaný výluh byl ředěn v poměru 1:9 (1 ml výluhu je přidán do 9 ml destilované vody).

- naředěný půdní výluh byl pomocí pipety inokulován na povrch agarizovaného živného média PDA s přidavkem antibiotika.
- výluh byl rovnoměrně rozetřen po povrchu agarizovaného média pomocí sterilní spatuly.
- pro každý půdní vzorek určený k analýze byly založeny 2 opakování.
- inokulované Petriho misky byly umístěny do plastických sáčků a inkubovány v termostatu při teplotě $25\pm 1^\circ\text{C}$, fotoperioda 0/24.
- hodnocení vzorků na přítomnost mykoparazitických hub bylo prováděno po 7- 10 dnech.
- v případě tvorby kolonií byly druhy/kmeny mykoparazitických hub izolovány přenosem na standardní živnou půdu (bramboro-dextrózová živná půda, PDA)

3.1.3. Selektivní živná média s fungicidními aditivami a bengálské červeni - *Selektivní živné médium (THSM - Trichoderma harzianum selective medium)*

Princip metodického postupu je podobný jako u předchozí metody, jen je do standardní živné půdy PDA vedle širokospektrálních antibiotik přidána bengálská červeň a účinná látka fungicidní povahy. V tomto případě byla do živné půdy přidána účinná látka propamocarb. Selektivní živné médium způsobuje inhibici růstu převážné většiny půdních hub a bakterií, nicméně půda ne zcela inhibuje růst řady některých druhů mykoparazitických hub rodu *Trichoderma*. Pomocí tohoto selektivního média tedy lze odizolovat pouze houbu *Trichoderma harzianum*. Postup lze specifikovat následovně:

- 25 ml půdního vzorku bylo umístěno do Erlenmayerovy baňky a následně bylo přidáno 100 ml sterilní destilované vody a baňky byly umístěny na reciprokou třepačku po dobu 30 minut.
- promíchaný výluh byl ředěn v poměru 1:9 (1 ml výluhu je přidán do 9 ml destilované vody).
- selektivní živná půda THSM (Williems *et al.* 2003) se používá pro kvalitativní nebo kvantitativní analýzu přítomnosti pouze mykoparazitické houby *T. harzianum*.
- naředěný půdní výluh byl pomocí pipety inokulován na povrch selektivního živného média THSM a výluh byl rovnoměrně rozetřen po povrchu agarizovaného média pomocí sterilní spatuly.
- pro každý půdní vzorek určený k analýze byly založeny 2 opakování.
- inokulované Petriho misky inkubovány v termostatu při teplotě $25\pm 1^\circ\text{C}$, fotoperioda 0/24.

- hodnocení vzorků na přítomnost mykoparazitických hub bylo prováděno po 10 - 14 dnech.
- v případě tvorby kolonií byly houba *Trichoderma harzianum* izolována na standardní živnou půdu (bramboro-dextrózová živná půda – PDA).

3.1.4. Monitoring přítomnosti mykoparazitických hub v půdě pomocí metody - „*Sclerotia bait method*“ (SBT, sklerocia houby *S. sclerotiorum*)

Principem metody je detekce přítomnosti mykoparazitických hub pomocí základní vlastnosti těchto hub, tj. schopnost parazitovat na vhodném hostitelském druhu. Při realizaci záměrů této studie byla využita sklerocia fytopatogenní houby *S. sclerotiorum*. V analýze byl standardně využit následující metodický postup:

- z dokonale homogenizovaného půdního vzorku bylo odebráno 40 ml půdy a vzorek určený k analýze byl přenesen do plastové sterilní Petriho misky (průměr 90 mm).
- pokud bylo nutné, půdní vzorek byl rovnoměrně zvlhčen sterilní destilovanou vodou.
- do každé Petriho misky se vzorkem byl vložen balíček s 10 sklerocii fytopatogenní houby *S. sclerotiorum* zabalených do sterilní gázy a následně byl balíček překryt vzorkem půdy
- misky s půdou a sklerocii byly vloženy do plastického sáčku, aby byly zajištěny optimální vlhkostní podmínky a zabránilo se případnému vysušování analyzovaného vzorku půdy.
- inkubace probíhala v termostatu (teplota 25±1°C, fotoperioda 0/24).
- po 24 až 28 dnech se sklerocia z půdního vzorku vyjmula a umístila se na 2% vodní agar a takto vyjmutá sklerocia se nechala inkubovat v termostatu po dobu dalších 10 dnů.
- po 10 denní inkubaci se vizuálně hodnotilo každé sklerocium a v případě parazitace se mykoparazitický druh/kmen houby odizoloval na povrch živné půdy PDA nebo PDA s antibiotikem.

3.1.5. Monitoring přítomnosti mykoparazitických hub v půdě pomocí mycelia fytopatogenní houby metody *S. sclerotiorum* - „*Pre-colonization plate method*“ (PPM)

Principem metody je detekce přítomnosti mykoparazitických hub pomocí základní vlastnosti těchto hub, tj. schopnost parazitovat na vhodném hostitelském druhu. Při realizaci záměrů této studie byla využita plně vyvinutá kultura fytopatogenní houby *S. sclerotiorum* na živné půdě PDA. V analýze byl standardně využit následující metodický postup:

- z dokonale homogenizovaného půdního vzorku byly odebrány 3 ml půdy.

- Půdní vzorek byl nanesen na 3 místa plně porostlé kultury *S. sclerotiorum*.
- misky s nanesenými vzorky půdy byly vloženy do plastického sáčku
- inkubace probíhala v termostatu (teplota 25±1°C, fotoperioda 0/24).
- po 14 nebo 21 dnech byl hodnocen stav parazitice kultur *S. sclerotiorum*
- v případě vizuální parazitace mycelia nebo parazitovaných sklerocií mykoparazitickým druhem/kmenem houby, byl tento druh mykoparazita odizolován na povrch živné půdy PDA nebo PDA s antibiotikem.

3.2. Sběrka lokálních kmenů hub zachycených v průběhu monitoringu

Z monitoringu na lokalitách bylo získáno značné množství izolátů/kmenů mykoparazitických hub, které jsou k dlouhodobému uchování ukládány do účelově založené sbírky kultur na KRV, ZF, JU. Pro dlouhodobé uchování je použit systém imobilizace biomasy čistých kultur hub do alginátové matrice spolu s nutritivním aditivem. Pelety jsou uloženy v plastových falkonkách, označeny příslušným kódem a skladovány v mrazáku při teplotě -20 °C.

3.3. Charakterizace kmenů pomocí středových kultur

3.3.1. Morfologické markery

U jednotlivých izolátů mykoparazitických hub byl hodnocen fenotypový projev kultur na základě středových kultur narostlých na umělém živném médiu PDA po 7. resp. 14. dnech kultivace při teplotě 20°C. Nejprve byla středová kultura kmenů fotograficky zdokumentována a následně byla detailně hodnocena vizuálně. Sledovanými parametry jsou barva kultury, typ sporulace kultury, přítomnost pustul (shluk konidioforů na myceliu). Mezi druhy/kmeny je velká variabilita sledovaných znaků, která umožňuje jejich odlišení.

3.3.1.1. Příprava středových kultur

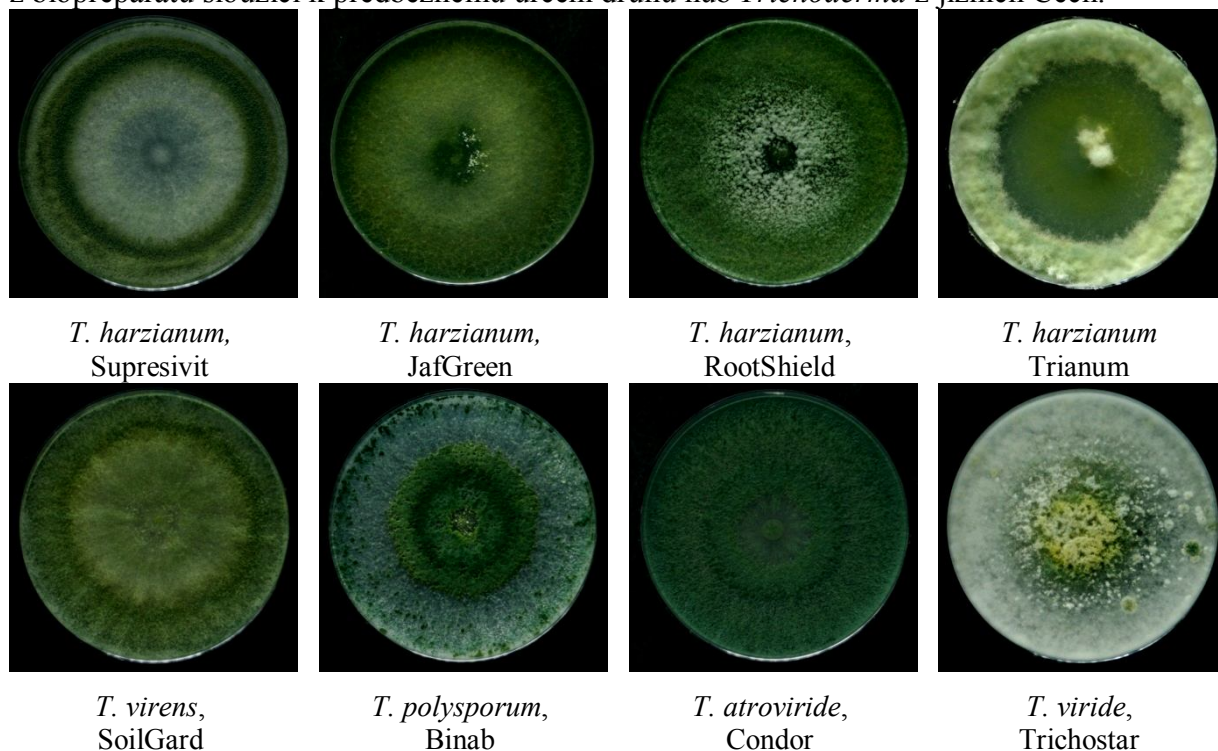
- izoláty získané v rámci izolací z půdních vzorků byly přečištěny přes standardní živné půdy (PDA, případně PDA s antibiotikem).
- Z čisté kultury byla vytvořena suspenze spor přelitím plně vysportované kultury 0,05% roztokem Tween 80.
- suspenze byla pomocí inokulační kličky nanesena doprostřed misky obsahující živnou půdu PDA (2 opakování od každé varianty).

- po zaschnutí kapky byly misky uloženy do plastového sáčku a uloženy do termostatu s konstantní teplotou 25°C na dobu 7 dnů resp. 14 dnů.

3.3.1.2. Určování druhů mykoparazitických hub

Identifikace hub rodu *Trichoderma* je relativně snadná, ale jednotlivé druhy *Trichoderma* je obtížné od sebe odlišit na základě morfologických znaků i za použití přesnějších kritérií (Bissett 1991b, Gams a Bissett 1999). Rifai v roce 1969 rozdělil houby *Trichoderma* do devíti skupin podle rodů. Přesto je i v jednotlivých skupinách určitý stupeň různorodosti (Šimková 2007). Příbuzný druh *Trichoderma virens* je zřetelně odlišitelný od jiných druhů *Trichoderma* Websterem a Lomasem (1964). Zřetelně odlišitelný je z důvodu, že byl dříve řazen do jiného rodu, a to do rodu *Gliocladium*, z kterého byl následně opět přeřazen zpět do rodu *Trichoderma*. Identifikace tohoto druhu je tedy na základě morfologických znaků snadná a v této práci je jako jediný druh hub rodu *Trichoderma* identifikován. V rámci členění dle fenotypového projevu je tento druh zařazen do morfotypu označeného A. V rámci identifikace druhů byly použity kmeny reizolované z komerčně dostupných biopreparátů. Na základě fenotypových projevů druhů inkorporovaných do biopreparátů byly vybrány nativní kmeny izolované z monitoringu půd jižních Čech předběžně identifikovány. Předpokládá se, že nativní kmeny budou v budoucnu na pracovišti DP identifikovány na základě genetických metod. Identifikace se provede zejména na vybraných kmenech, které vykážou vynikající biologické a produkční vlastnosti. Z tabulky 2 je patrné, že fenotypové projevy druhu *Trichoderma harzianum* reizolovaných z různých biopreparátů (JafGreen, RootShield, Supresivit, Trianum) jsou velmi variabilní. Na základě této variability byly kmeny odpovídající fenotypu *T. harzianum* zařazené do morfotypu C, D a E. Morfotyp B odpovídá druhu *T. atroviride* reizolovaného z přípravku Condor a morfotyp F druhu *T. viride*, který je součástí přípravku Trichostar. Druhem *T. polysporum* z biopreparátu Binab byly označeny kmeny, které byly začleněny do morfotypu G a H.

Tabulka 2: Fenotypové makrofotografie druhů hub *Trichoderma* re-izolovaných z biopreparátů sloužící k předběžnému určení druhů hub *Trichoderma* z jižních Čech.



3.3.2. Radiální růst

Radiální růst středových kultur slouží k parametrickému hodnocení rychlosti růstu tj. kolonizaci prostředí. Na umělých živných půdách, kde jsou rovnoměrně rozloženy živiny, vytvářejí mykoparazitické houby pravidelné „kruhové“ kultury. Cílem testu je vedle morfologických rozdílů u jednotlivých kmenů zaznamenat i průběh růstu mycelia středových kultur kultivovaných po dobu 7 dnů (*Trichoderma*) na standardní živné půdě PDA při teplotě 20°C. Rozměr kultury se stanovuje měřením dvou na sebe kolmých průměrů, z nichž se spočítá průměr kultury v denních intervalech, nebo přírůstek mycelia v čase.

3.3.3. Výtěžnost spor mykoparazitické houby

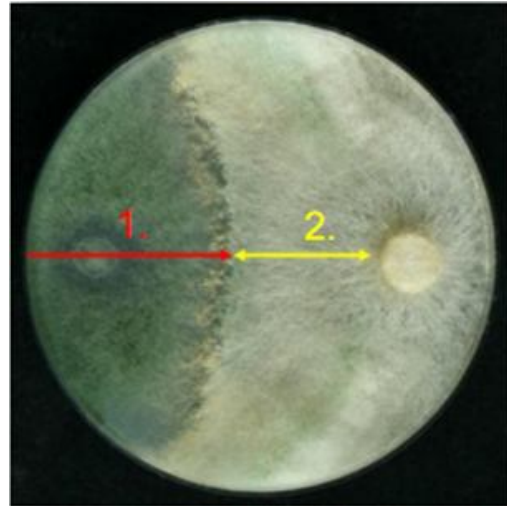
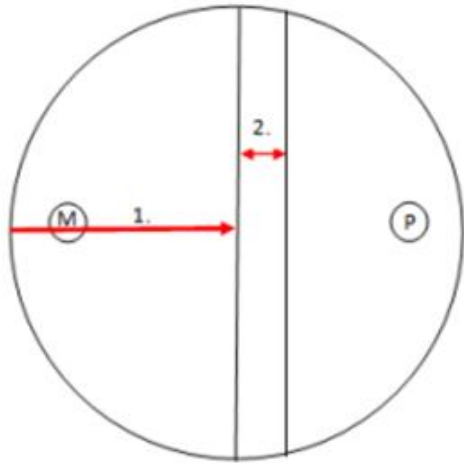
Cílem testu je stanovit množství vyprodukovaných spor při kultivaci mykoparazitických hub na umělé živné půdě PDA. Produkce spor se stanovovala ze středových kultur inkubovaných po dobu 7 dnů v termostatu. Kultura kmenů mykoparazitických hub v Petriho miskách byly spolu s živnou půdou PDA homogenizovány v mixéru s adekvátním množstvím vody (100 ml na jednu Petriho misku). Pomocí počítačí komůrky - hematocymetru (Neubauerova vylepšená komůrka) byla stanovena produkce spor, která se vyjádřila na jednu Petriho misku.

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

Cílem interakčních testů je determinovat a kvantifikovat vztah mezi mykoparazitem a patogenem. V případě fytopatogenní houby *S. sclerotiorum* jde zejména o supresi tvorby sklerocií. Model preventivní aplikace byl simulován párovým testem, při kterém byla suspenze jednotlivých kmenů mykoparazitických hub inokulována na plotnu živné půdy PDA současně s vyříznutým bločkem z kultury fytopatogenní houby. Suspenze o standardním titru 1×10^6 spor v 1 ml každého testovaného kmene/druhu hub rodu *Trichoderma* byla inokulována ve formě kapky pomocí laboratorní kličky (10 μ l) na okraj Petriho misky. Bloček fytopatogenní houby o průměru 10 mm byl umístěn na protilehlou stranu. Kontrolní verze představovala varianta, ve které byl jak patogen, tak jednotlivé kmene/druhy hub rodu *Trichoderma* inokulovány zvlášť na oba protilehlé okraje Petriho misky. Petriho misky byly vloženy v plastických sáčcích do termostatu (20 ± 1 °C) a inkubovány. Hodnocení interakcí bylo provedeno 7. den po dodání fytopatogenních hub na PDA pomocí fotodokumentace a stanovením zóny dotyku a zóny mykoparazitismu.

3.3.4.1. Zóna dotyku a zóna mykoparazitismu

Po 7 dnech byla ze spodní strany Petriho misky každé varianty měřena zóna dotyku tj. zóna vzájemného střetnutí mykoparazitické houby s fytopatogenní houbou. Zóna dotyku je délka v mm od okraje misky v místě inokulace mykoparazita do místa střetu fytopatogenní houby s mykoparazitem (viz. Obr.č.1). Zóna mykoparazitismu je definována jako oblast, kde dochází k přerůstání kultury fytopatogenní houby kmenem/druhem mykoparazitické houby. Měří se od zóny dotyku do vzdálenosti, kde v době měření zatím končí růst mycelia mykoparazita na kultuře fytopatogenní houby.



M = kmen mykoparazitické houby

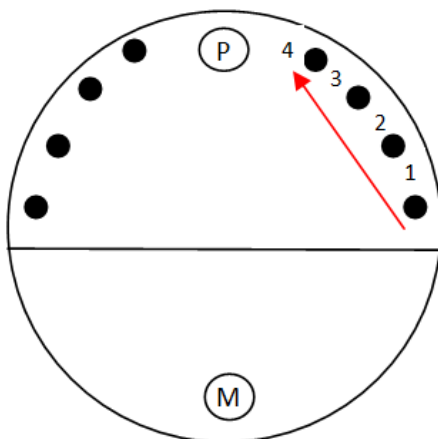
P = patogen (fytopatogenní houba *S. sclerotiorum* nebo *R. solani*)

1. = zóna dotyku – měřena od okraje misky k místu střetu mykoparazita s patogenem

2. = zóna mykoparazitismu – zóna přerůstání kultury patogena mykoparazitickou houbou

3.3.4.2. Počet sklerocií a ověření parazitace sklerocií

V každé variantě byl hodnocen počet vyvinutých sklerocií. Z naměřených hodnot byl vypočten průměrný počet sklerocií na jednu Petriho misku. Pro ověřování parazitace sklerocií houbami rodu *Fusarium* byla nově vyvinutá sklerocia houby *S. sclerotiorum* přenesena na střed živné půdy PDA v malých Petriho miskách (60 mm). V interakcích se sklerocia tvořila na obou stranách Petriho misky, do pokusu byla vzata sklerocia jen z jedné strany. Petriho misky byly vloženy do plastického sáčku a sklerocia byla inkubována při 20 ± 1 °C. Po 7 dnech byla hodnocena parazitace sklerocií.



M = kmen mykoparazitické houby;

P = patogen (fytopatogenní houba);

1., 2., 3 ... = sklerocia, u kterých byla zjišťována parazitace houbami rodu *Trichoderma*.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

4.1. Monitoring mykoparazitických hub v půdě s ekologickým a konvenčním systémem hospodaření na lokalitách oblasti jižních Čech

V rámci zjišťování diverzity přirozeně se vyskytujících mykoparazitických hub byly půdní vzorky odebírány z vybraných lokalit na území jižních Čech. Každý půdní vzorek byl analyzován pomocí čtyř izolačních technik. Izolované kmeny/druhy mykoparazitických hub byly uloženy do sbírky s předpokladem dalšího využití v programech integrované ochrany rostlin. Na území jihočeského regionu bylo celkem odebráno 26 půdních vzorků ze stejného počtu lokalit (Tabulka 4.1). Půdní vzorky byly odebrány z orné půdy na ekologicky a konvenčně hospodařících systémech. Přítomnost mykoparazitických hub byla detekována ve všech půdních vzorcích, nicméně detekce přítomnosti mykoparazitických hub byla rozdílná na základě toho, jaká byla použita izolační metoda.

Selektivní živná půda založená na izolaci druhu *T. harzianum* byla použita k analýze všech 26 vzorků. Pomocí této metody byla mykoparazitická houba *T. harzianum* odizolována z 16 lokalit, tj. v 61,54% půdních vzorků. V 10 půdních vzorcích se tento druh nepodařilo detekovat vůbec. Pomocí semi-selektivní živné půdy založené na živné půdě PDA s přidavkem antibiotik se podařilo odizolovat houby rodu *Trichoderma* ze všech půdních vzorků (100%). Tato metoda (DPT) byla vhodná i pro izolaci druhu *T. virens* (1 lokalita) a *C. rosea* f. *catenulata* (2 lokality).

Při použití monitorovací metody „živých pastí“ byly pomocí sklerocií *S. sclerotiorum* (SBM) zachyceny na 20 lokalitách (76,92%) tři druhy mykoparazitických hub (*T. virens* – 1 lokalita, *C. rosea* f. *catenulata* – 4 lokality, *L. muscarium* – 2 lokality), neurčené druhy náležejících do rodu *Trichoderma* (17 lokalit) a na 6 lokalitách nebyl pomocí sklerocií odchytnut žádný druh mykoparazitických hub. Detekce pomocí mycelia fytopatogenní houby *S. sclerotiorum* („Pre-colonization plate method“) byla zaznamenána přítomnost mykoparazitických hub na 12 lokalitách (46,15%), z toho na 11 lokalitách byly izolovány neurčené druhy hub rodu *Trichoderma* a na jedné lokalitě byl odizolován druh *T. virens*. Pomocí této metody nebyl odizolován žádný druh mykoparazitické houby na 14 lokalitách. Při analýze půdních vzorků byl předpoklad, že se pomocí metody využívající živé návnady podaří izolovat také druh *Coniothyrium minitans*, což se bohužel nepotvrdilo.

Tabulka 1: Odizolované druhy mykoparazitických hub v rámci monitoringu na vybraných lokalitách v regionu jižních Čech pomocí 4 izolačních technik.

Lokalita (č/system)	Zkrácený kód	<i>Sclerotia bait technique</i>	<i>Pre-colonization S. sclerotiorum</i>	Dilution plate technique	Selektivní živná půda THSM
1EZ	Nakolice, ČB	<i>Tri</i>	-	<i>Tri</i>	-
1KZ		<i>Tri</i>	-	<i>Tri</i>	<i>Tha</i>
2EZ	Nakolice, ČB	-	-	<i>Tri</i>	-
2KZ		<i>Tri</i>	<i>Tri</i>	<i>Tri</i>	<i>Tha</i>
3EZ	Hradiště,	<i>Tri</i>	<i>Tri</i>	<i>Tri</i>	<i>Tha</i>
3KZ	Č.Krumlov	-	-	<i>Tri</i>	<i>Tha</i>
4EZ	Dobročkov, Prachatic	<i>Gca</i>	<i>Tri</i>	<i>Tri</i>	-
4KZ		<i>Tri</i>	-	<i>Tri, Gca</i>	-
5EZ	Dobrá Voda,	<i>Lmu, Tri</i>	-	<i>Tri</i>	-
5KZ	J.Hradec	<i>Lmu, Tri</i>	-	<i>Tri</i>	-
6EZ	Bílá,	-	<i>Tri</i>	<i>Tri</i>	-
6KZ	J.Hradec	<i>Tri, Gca</i>	<i>Tri</i>	<i>Tri</i>	<i>Tha</i>
7EZ	Dančovice	<i>Gca</i>	<i>Tri</i>	<i>Tri</i>	<i>Tha</i>
7KZ	J.Hradec	-	-	<i>Tri</i>	<i>Tha</i>
8EZ	Rancířov,	<i>Tri</i>	-	<i>Tri, Tvi</i>	-
8KZ	J. Hradec	<i>Tvi</i>	-	<i>Tri</i>	<i>Tha</i>
9EZa	Hluboká u	<i>Tri</i>	<i>Tri</i>	<i>Tri</i>	-
9KZ	Dačic, J.Hradec	-	<i>Tri</i>	<i>Tri</i>	<i>Tha</i>
10EZ	Dvory, Prachatic	<i>Tri, Gca</i>	<i>Tri</i>	<i>Tri</i>	-
10KZ		-	-	<i>Tri</i>	<i>Tha</i>
11EZ	Dvorec, Prachatic	<i>Tri</i>	-	<i>Tri</i>	<i>Tha</i>
11KZ		<i>Tri</i>	<i>Tvi</i>	<i>Tri</i>	<i>Tha</i>
12EZ	Pístina,	<i>Tri</i>	-	<i>Tri</i>	<i>Tha</i>
12KZ	J. Hradec	<i>Tri</i>	<i>Tri</i>	<i>Tri</i>	<i>Tha</i>
13EZ	Novosedly nad	<i>Tri</i>	-	<i>Tri, Gca</i>	<i>Tha</i>
13KZ	Nežárkou, J. Hradec	<i>Tri</i>	<i>Tri</i>	<i>Tri</i>	<i>Tha</i>

Tvi – *Trichoderma virens*, *Tha* – *Trichoderma harzianum*, *Tri* – *Trichoderma* spp., *Lmu* – *Lecanicillium muscarium*, *Lec* – *Lecanicillium* spp., *Gca* – *Clonostachys rosea* f. *catenulata* (= *Gliocladium catenulatum*)

Všechny izolované kmeny byly uloženy do sbírky hub na Katedře rostlinné výroby a agroekologie. V následujících experimentech jsou vybrané druhy hub rodu *Trichoderma*, které byly použity pro zjišťování jejich morfologických, produkčních a biologických vlastností.

4.2. Morfologické markery mykoparazitických hub rodu *Trichoderma*

U jednotlivých izolátů/kmenů mykoparazitických hub byl hodnocen fenotypový projev kultur na základě středových kultur narostlých na umělém živném médiu PDA:

- Suspenze konidií kmenů izolovaných ze vzorků půd o standardním titru 1×10^6 v 1 ml
- Nanesení suspence konidií pomocí sterilní laboratorní kličky na střed Petriho misky s živnou půdou PDA (4. opakování)
- Inkubace kmene v termostatu $20 \pm 1^\circ\text{C}$
- Hodnocení fenotypového projevu kultur po 7 a 14 dnech kultivace

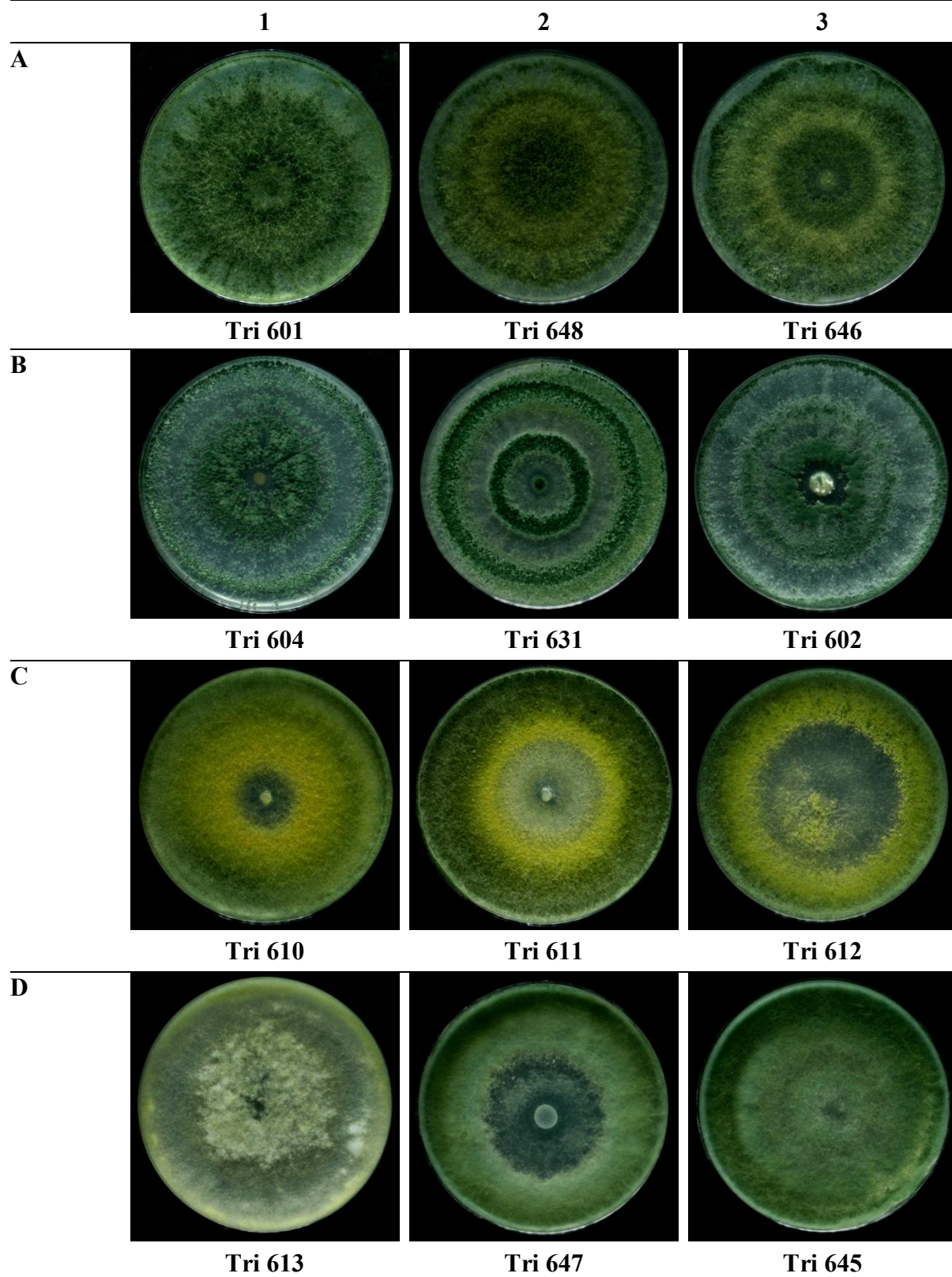
Hodnocení fenotypových projevů probíhalo tak, že byla nejdříve středová kultura vybraných kmenů fotograficky zdokumentována a následně byla detailně hodnocena vizuálně. Sledovanými parametry byla barva kultury, typ sporulace kultury, přítomnost pustul (shluk konidioforů na myceliu). Mezi druhy/kmeny je velká variabilita sledovaných znaků, která umožňuje jejich odlišení.

Tabulka 2: Souhrnná tabulka jednotlivých znaků u vybraných izolovaných kmenů hub rodu *Trichoderma*.

Morfotyp	Kmen	Metoda izolace**	Hodnocené znaky			
			Struktura	Pustuly	Barva	Druh*
A	Tri 601	DPT	vláknitá	-	tmavě zelená	<i>T. virens</i>
	Tri 646	SBT	vláknitá	-	tmavě zelená	<i>T. virens</i>
	Tri 648	SBT	vláknitá	-	tmavě zelená	<i>T. virens</i>
B	Tri 623	DPT	kompaktní	+	tmavě zelená	<i>T. atroviride</i> like
	Tri 631	DPT	kompaktní	+	tmavě zelená	<i>T. atroviride</i> like
	Tri 633	DPT	kompaktní	+	tmavě zelená	<i>T. atroviride</i> like
	Tri 649	SBT	kompaktní	+	zelená / žlutá	<i>T. atroviride</i> like
C	Tri 607	DPT	vláknitá	-	zelená / žlutá	<i>T. harzianum</i> like
	Tri 652	SBT	vláknitá	-	zelená / žlutá	<i>T. harzianum</i> like
	Tri 653	SBT	vláknitá	-	zelená / žlutá	<i>T. harzianum</i> like
	Tri 655	SBT	vláknitá	-	zelená / žlutá	<i>T. harzianum</i> like
D	Tri 645	PPM	kompaktní	-	světle zelená	<i>T. harzianum</i> like
	Tri 647	SBT	kompaktní	-	světle zelená	<i>T. harzianum</i> like
F	Tri 641	DPT	kompaktní	+	zelená / žlutá	<i>T. viride</i> like
G	Tri 650	SBT	kompaktní	+	světle zelená	<i>T. polysporum</i> like
	Tri 651	SBT	kompaktní	+	světle zelená	<i>T. polysporum</i> like
H	Tri 605	SBT	kompaktní	+	světle zelená	<i>T. polysporum</i> like
	Tri 616	THSM	kompaktní	+	světle zelená	<i>T. polysporum</i> like

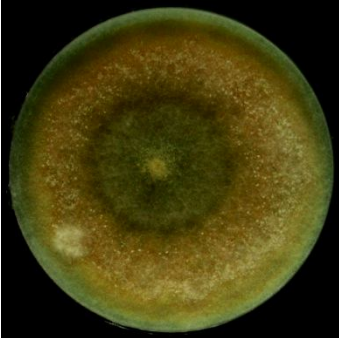
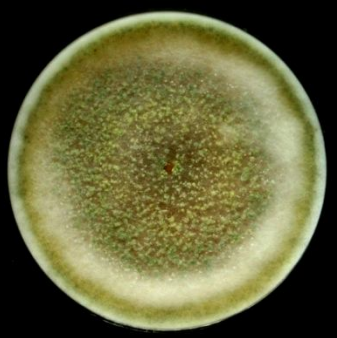
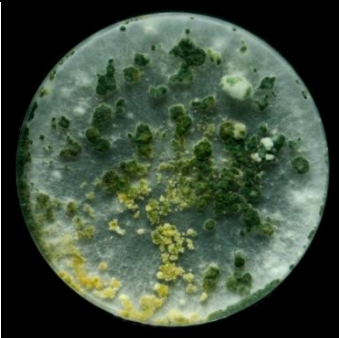


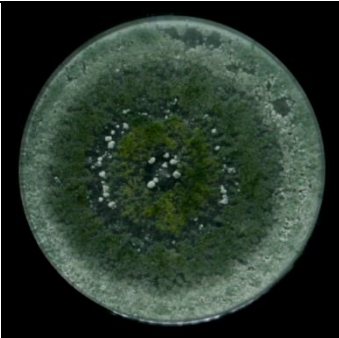
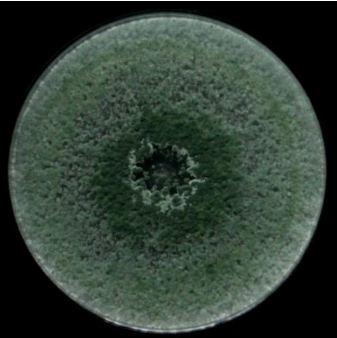

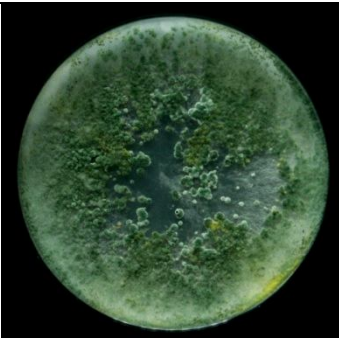
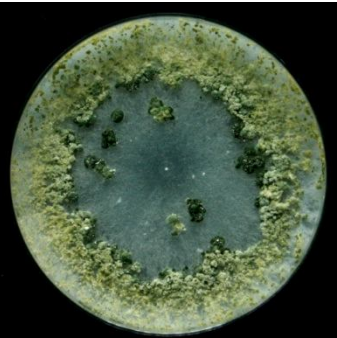
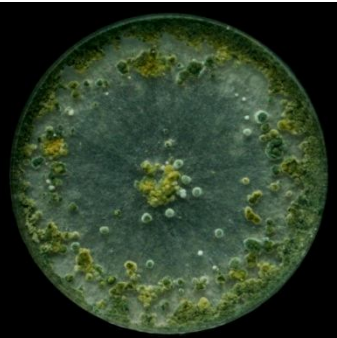
*předběžná identifikace druhů proběhla na základě fenotypového projevu druhů hub rodu *Trichoderma* re-izolovaných z komerčně dostupných biopreparátů v EU a USA, viz. metodika

Tabulka 3a: Vybrané kmeny hub rodu *Trichoderma* získaných během monitoringu zařazené do jednotlivých skupin morfotypů. Morfotypy byly určeny na základě fenotypového projevu kultur izolovaných kmenů z komerčních preparátů (viz. kapitola metodika, tabulka 2)



Tabulka 3b: Vybrané kmeny hub rodu *Trichoderma* získaných během monitoringu zařazené do jednotlivých skupin morfotypů. Morfotypy byly určeny na základě fenotypového projevu kultur izolovaných kmenů z komerčních preparátů (viz. kapitola metodika, tabulka 2)

pokračování tabulky

Morfotyp	1	2	3
E			
	Tri 614	Tri 615	
F			
	Tri 617	Tri 641	Tri 621
G			
	Tri 650	Tri 651	Tri 637
H			
	Tri 638	Tri 639	Tri 643

4.3. Produkční vlastnosti mykoparazitických hub rodu *Trichoderma*

4.3.1. Radiální růst hub rodu *Trichoderma*

Tabulka 4: Radiální růst hub rodu *Trichoderma* na umělé živné půdě PDA (kontinuální měření kultur kmenů v intervalu 24 hodin).

Morfotyp	Kmen	Zóna dotyku mezi druhy <i>Trichoderma</i> s patogeny (mm)						
		24 hodin		48 hodin		72 hodin		96 hodin
A	Tri 601	15,00±0,00	ab	40,25±0,66	c	60,25±0,43	hi	83,0±0,00
	Tri 646	16,38±0,48	a	45,88±0,78	b	71,63±1,22	cde	83,0±0,00
	Tri 648	12,63±0,48	c	39,13±0,60	cd	58,50±0,50	i	83,0±0,00
B	Tri 623	10,00±1,41	d	37,38±3,08	cdef	79,63±0,86	b	83,0±0,00
	Tri 631	7,88±0,93	ef	37,13±3,62	cdef	70,38±3,12	def	83,0±0,00
	Tri 633	7,88±0,78	ef	34,88±0,60	efg	68,88±0,60	efg	83,0±0,00
	Tri 649	7,00±0,50	f	25,13±3,55	i	59,63±2,34	hi	83,0±0,00
C	Tri 607	7,63±0,70	f	36,13±2,09	def	72,75±2,28	cd	83,0±0,00
	Tri 652	9,63±0,71	de	35,50±1,12	cd	66,88±0,50	h	83,0±0,00
	Tri 653	6,38±0,70	f	25,25±1,09	i	54,38±1,22	j	83,0±0,00
	Tri 655	6,50±0,50	f	30,50±1,66	h	61,50±1,32	hi	83,0±0,00
D	Tri 645	13,75±0,43	bc	52,63±1,87	a	83,00±0,00	a	83,0±0,00
	Tri 647	13,00±1,22	c	49,50±2,44	ab	83,00±0,00	a	83,0±0,00
F	Tri 641	7,25±0,43	f	35,00±1,80	efg	68,38±3,04	fg	83,0±0,00
G	Tri 650	7,13±0,33	f	33,63±0,48	fgh	70,50±0,50	def	83,0±0,00
	Tri 651	6,88±0,33	f	34,13±1,05	efgh	73,63±1,84	c	83,0±0,00
H	Tri 605	7,88±1,05	ef	31,13±1,36	gh	66,75±1,64	g	83,0±0,00
	Tri 616	10,13±1,17	d	37,88±2,93	cde	73,38±2,60	cd	83,0±0,00

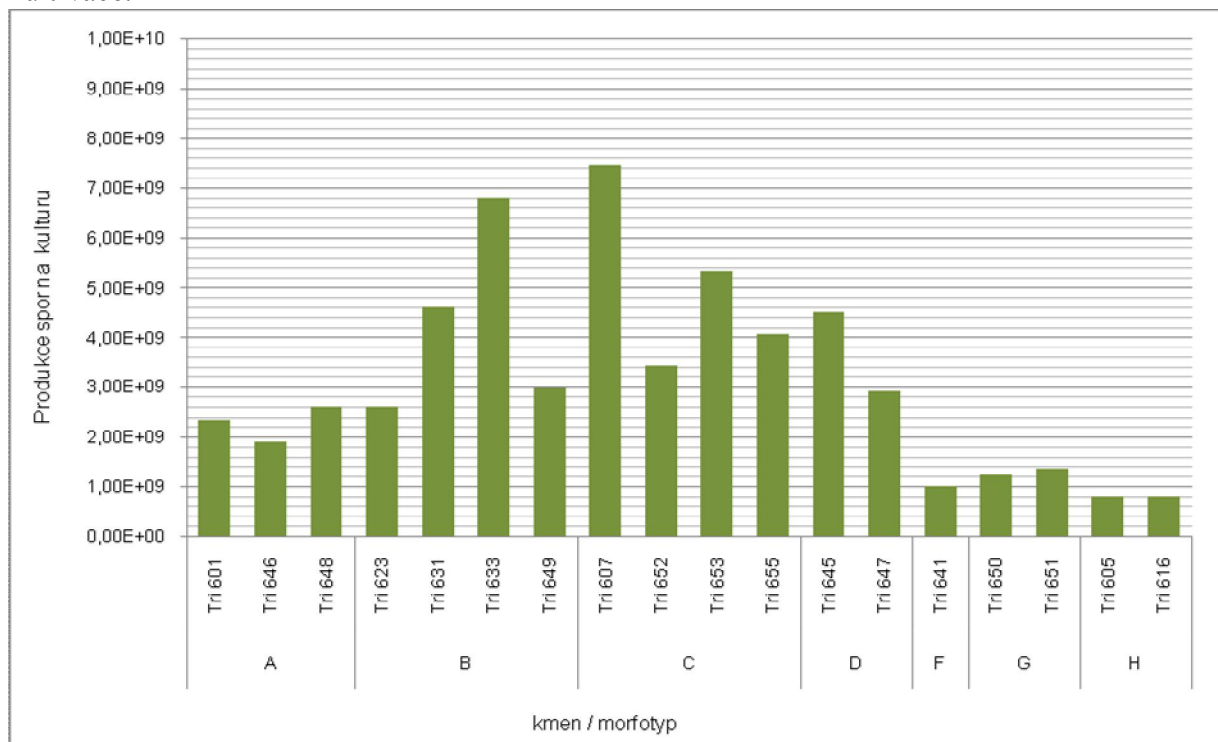
Největší rychlost růstu středových kultur byly po 24 hodinách zaznamenány u kmenů druhu *T. virens* a zároveň u kmene Tri 645 a Tri 647, které byly zařazeny do monotypu D (*T. harzianum* like). Průměr středových kultur se pohyboval po 24 hodinách od 12,63 do 16,38 mm. Kmeny Tri 616, Tri 623 a Tri 652 vytvořily po 24 hodinách kulturu o průměru téměř 10 mm. Ostatní kmeny vykázaly pomalejší start růstu kultur. Po 24 hodinách byl zaznamenán statistický rozdíl v kolonizaci Petriho misek jednotlivými kmeny hub rodu *Trichoderma* ($F=126,38$; $df=17,126$; $p=0,0000$). Po 48 hodinách byl opět zaznamenán statisticky průkazný rozdíl mezi kmeny ($F=77,439$; $df=17,126$; $p=0,0000$). Dynamiku růstu si zachovaly opět kmeny zařazené do morfotypu A a D, nicméně kmeny Tri 645 a Tri 647 vykázaly po 48

hodinách daleko rychlejší rychlejší růst než kmeny druhu *T. virens*. Po 48 hodinách naopak nejpomaleji kolonizovaly Petriho misku kmeny Tri 655, Tri 653 a Tri 649. Průměr kultury byl ve srovnání s nejlepšími kmeny téměř o polovinu kratší. Kmeny Tri 645 a Tri 647 dosáhly okraje Petriho misky již po 72 hodinách. Kmeny, které během 24 a 48 hodinách vykázaly pomalejší růst než kmeny druhu *T. virens*, naopak v průběhu od 48 hodin po 72 hodin tyto kmeny předběhly. Mezi kmeny *T. virens* byl nejpomaleji rostoucí kmen Tri 648 naopak nejrychleji kolonizoval misku kmen Tri 646. V rámci hodnocení radiálního růstu kmenů hub rodu *Trichoderma* byl po 72 hodinách opět zaznamenán statisticky průkazný rozdíl ($F=77,439$; $df=174,77$; $p=0,0000$). Po 4 dnech všechny kmeny dosáhly okraje Petriho misky.

4.3.2. Produkce spor hub rodu *Trichoderma*

Rozdíl v produkci spor mezi jednotlivými kmeny byl hodnocen po 7 dnech kultivace v řízených podmínkách.

Graf 1: Porovnání výtěžnosti spor hub rodu *Trichoderma* z živné půdy PDA po 7 dnech kultivace.



Nejvíce spor produkoval kmen Tri 607 (7,48E+09) a Tri 633 (6,81E+09). Nejméně produkční byly kmeny zařazené do morfotypu F, G a H. Tyto kmeny produkují spory v tzv. pustulách. Produkce spor se pohybovala u těchto kmenů od 8,00E+08 do 1,38E+09. Mezi jednotlivými kmeny byl zaznamenán statisticky průkazný rozdíl v produkci spor po 7 dnech ($F=2304,4$; $df=17,18$; $p=0,0000$).

Tabulka 5: Produkce spor hub rodu *Trichoderma* ze středové kultury kultivované na živné půdě PDA po 7 dnech kultivace.

Morfotyp	Kmen	Produkce konidií	
		Průměr na 1 kulturu	Tukey HSD
A	Tri 601	2,36E+09	i
	Tri 646	1,93E+09	j
	Tri 648	2,63E+09	h
B	Tri 623	2,61E+09	h
	Tri 631	4,63E+09	d
	Tri 633	6,81E+09	b
	Tri 649	2,99E+09	g
C	Tri 607	7,48E+09	a
	Tri 652	3,43E+09	f
	Tri 653	5,34E+09	c
	Tri 655	4,09E+09	e
D	Tri 645	4,51E+09	d
	Tri 647	2,91E+09	g
F	Tri 641	1,01E+09	l
G	Tri 650	1,25E+09	k
	Tri 651	1,38E+09	k
H	Tri 605	8,21E+08	l
	Tri 616	8,00E+08	l

4.4. Biologická účinnost mykoparazitických hub rodu *Trichoderma* na vybrané původce onemocnění rostlin

4.4.1. Zóna dotyku a zóna mykoparazitismu

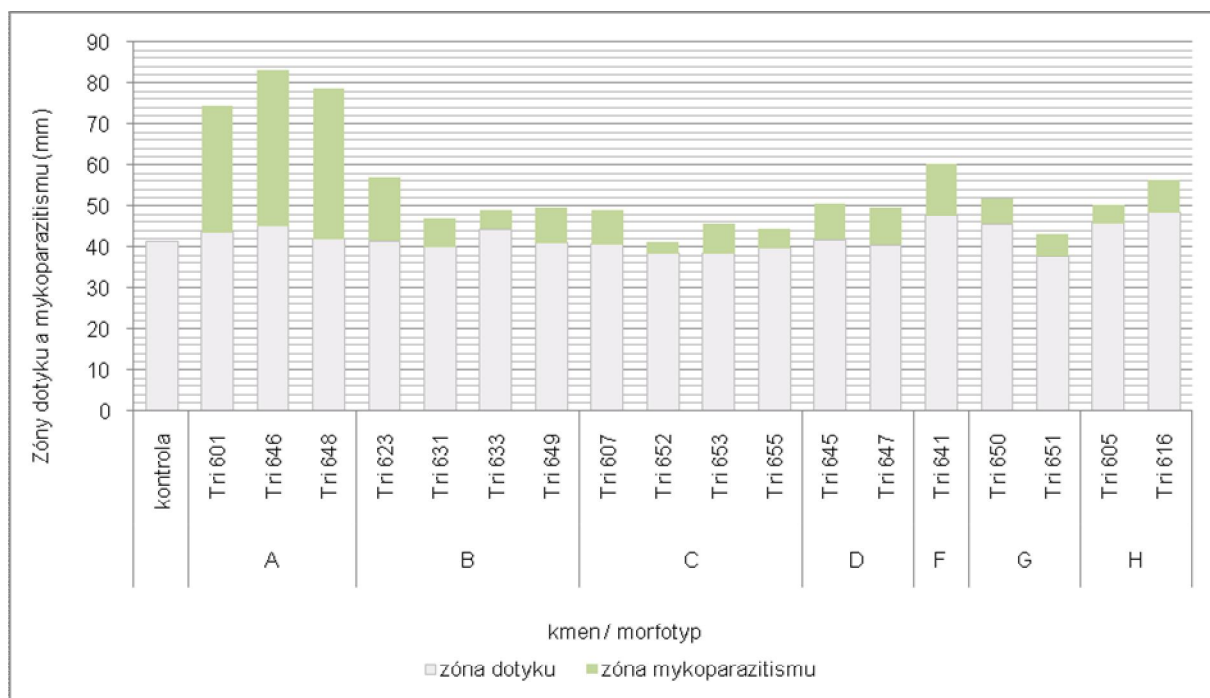
Cílem interakčních testů je determinovat a kvantifikovat vztah mezi mykoparazitem a patogenem. V pokusu byl hodnocen vliv kmenů hub rodu *Trichoderma* na supresi fytopatogenních druhů hub a následné schopnosti parazitovat jejich stélku nebo i sporulačních struktur.

Tbulka 6: Hodnocení zóna dotyku v interakci hub rodu *Trichoderma* s vybranými fytopatogenními druhy rostlin (měřeno 7. den od inokulace).

Morfotyp	Kmen	Zóna dotyku mezi druhy <i>Trichoderma</i> s patogeny (mm)							
		<i>S.sclerotiorum</i>		<i>R. solani</i>		<i>B. cinerea</i>		<i>F. solani</i>	
	kontrola	41,50±0,00	abcd	41,50±0,00	a	41,50±0,00	ab	41,50±0,00	a
A	Tri 601	43,50±1,50	abcd	36,50±0,50	cde	42,75±1,48	ab	48,75±0,43	de
	Tri 646	45,00±1,22	abcd	37,00±1,22	bcd	42,00±1,12	ab	47,00±2,55	e
	Tri 648	42,00±1,22	abcd	36,00±0,71	cde	43,00±0,00	ab	50,75±1,30	bcd
B	Tri 623	41,50±1,12	abcd	39,50±0,50	abc	45,25±2,28	a	53,75±0,83	bc
	Tri 631	40,00±2,35	bcd	36,75±0,83	cd	46,25±1,92	a	53,25±1,09	bc
	Tri 633	44,25±0,83	abcd	35,25±0,83	def	45,75±1,30	a	51,25±0,83	bcd
	Tri 649	41,00±4,06	abcd	33,00±1,58	ef	41,25±2,49	ab	54,25±1,48	b
C	Tri 607	40,75±2,97	bcd	41,75±3,70	a	44,50±4,15	ab	53,50±2,06	bc
	Tri 652	37,75±1,92	cd	40,50±0,87	ab	44,75±1,09	a	51,50±0,50	bcd
	Tri 653	38,50±3,28	cd	32,25±1,09	f	38,50±3,28	b	50,25±0,83	cde
	Tri 655	39,75±1,48	cd	34,75±0,83	def	41,50±1,12	ab	52,75±0,43	bc
D	Tri 645	41,75±1,92	abcd	40,50±0,87	ab	45,75±0,83	a	53,25±1,09	bc
	Tri 647	40,50±0,50	bcd	41,00±0,00	a	43,00±0,71		51,50±2,06	bcd
F	Tri 641	47,50±3,20	ab	34,50±0,50	def	44,50±1,80	ab	51,50±0,87	bcd
G	Tri 650	45,50±2,96	abc	35,25±0,43	def	45,50±1,66	a	52,25±0,83	bcd
	Tri 651	45,50±2,18	abc	35,50±0,50	def	44,25±3,11	ab	51,00±0,71	bcd
H	Tri 605	45,75±2,86	abc	34,75±0,43	def	45,75±3,11	a	53,75±0,43	bc
	Tri 616	48,50±0,50	a	37,25±0,83	bcd	44,50±0,50	ab	54,25±0,43	b

V kontrolní variantě, kde byly na protilehlých okrajích Petriho misky umístěny bločky fytopatogenní houby *S. sclerotiorum*, došlo k dotyku obou kultur tohoto patogena uprostřed Petriho misky, tj. ve vzdálenosti 41,50 mm od jejího okraje (vnitřní průměr Petriho misky o průměru 90 mm má 83 mm). Kmeny Tri 616 a Tri 641 hub rodu *Trichoderma* izolovaných z půd s ekologickým a konvenčním způsobem hospodaření rostly nejrychleji ze všech variant. Zóna dotyku v interakci s fytopatogenní houbou *S. sclerotiorum* byla vytvořena ve vzdálenosti 48,50 mm (Tri 616) resp. 47,50 mm (Tri 641) od okraje misky, kde byly mykoparazitické houby nainokulovány. Obdobné výsledky kolonizace Petriho misky i vykazovaly kmeny Tri 605, Tri 650 a Tri 651. Naopak pomalejší kolonizaci agarové plotny vykazovaly kmeny Tri 652 (38,50 mm), Tri 653 (38,50 mm) a Tri 655 (39,75 mm) (*Trichoderma harzianum* like). Tyto kmeny se dotkly fytopatogenní houbou *S. sclerotiorum* v přibližně stejné vzdálenosti od kraje misky. Ostatní kmeny hub rodu *Trichoderma* se dotkly s patogenem ve vzdálenosti od 40 do 50 mm. Vliv růstu jednotlivých kmenů byl na vzdálenost zóny dotyku statisticky významný ($F=4,388$; $df = 18,57$; $p=0,0009$).

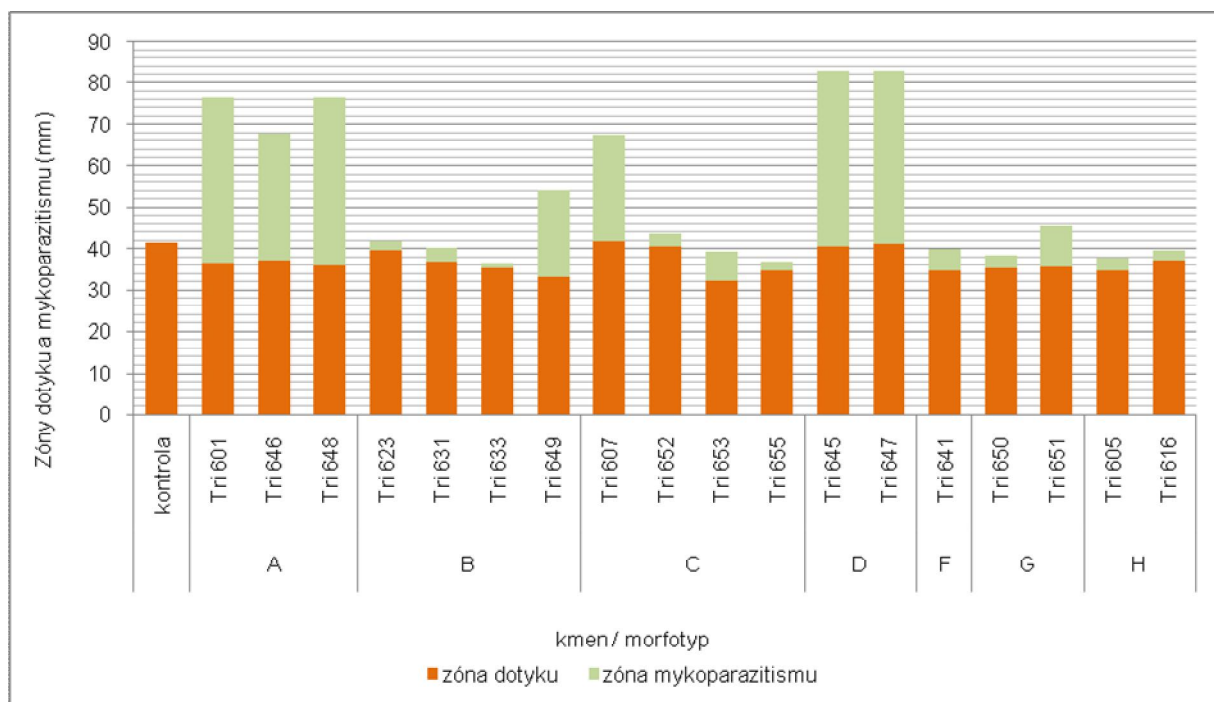
Graf 2: Hodnocení zóny dotyku a zóny mykoparazitismu mezi druhy/kmeny hub rodu *Trichoderma* a patogenem *S. sclerotiorum*



U všech variant byla měřena i zóna mykoparazitismu. Nejlepší mykoparazitickou schopnost prokázala mykoparazitická houba *T. virens*. Zóna mykoparazitismu u těchto kmenů byla širší než 31 mm široká. Ostatní kmeny vykazovaly daleko menší schopnost parazitovat

tohoto patogena. Nejmenší schopnost vykázal kmen Tri 652, zóna dotyku byla široká pouze 2,75 mm. Vliv na účinnost proti *S. sclerotinia* byl v rámci kmenů statisticky významný ($F=340,95$; $df= 18,57$; $p=0,0000$).

Graf 3: Hodnocení zóny dotyku a zóny mykoparazitismu mezi druhy/kmeny hub rodu *Trichoderma* a patogenem *R. solani*



V kontrolní variantě došlo k dotyku obou kultur *R. solani* uprostřed Petriho misky. V rámci testovaných kmenů byla zaznamenána rozdílná délka zóny dotyku. Houby rodu *Trichoderma* se střetly s fytopatogenní houbou *R. solani* ve vzdálenosti od 32,25 mm do 41,75 mm. Z tohoto testu vyplývá, že nejrychleji kolonizoval Petriho misku kmen Tri 607 a následně kmeny Tri 645 a Tri 647. Nejpomaleji kolonizoval misku kmen Tri 653 tudíž patogen *R. solani* měl větší možnost se rozrůstat. V rámci vzdálenosti zóny dotyku byly mezi kmeny zaznamenány statistické rozdíly ($F=582,50$; $df = 18,57$; $p=0,0000$).

Nejširší mykoparazitická zóna 45 mm byla zaznamenána v interakci s patogenem *R. solani* u kmene Tri 645. Tento kmen vykazoval nejen rychlý růst a tím i omezení patogena v kolonizaci prostředí, ale i vykazoval na něj i nejlepší účinnost. Houby *T. virens* opět prokázaly výraznou účinnost i proti patogenu *R. solani*. Ve srovnání s účinností proti *S. sclerotiorum* vykázaly širší zónu mykoparazitismu u *R. solani* o 2 mm resp. 9 mm. Nejmenší účinnost proti *R. solani* vykázal kmen Tri 633. Tento kmen parazitoval mycelium *R. solani* pouze do vzdálenosti 1,25 mm. V rámci interakce mezi patogenem *R. solani* a jednotlivými

druhy/kmeny hub rodu *Trichoderma* byly výrazně rozdíly v jejich účinnosti ($F=721,67$; $df = 18,57$; $p=0,0000$).

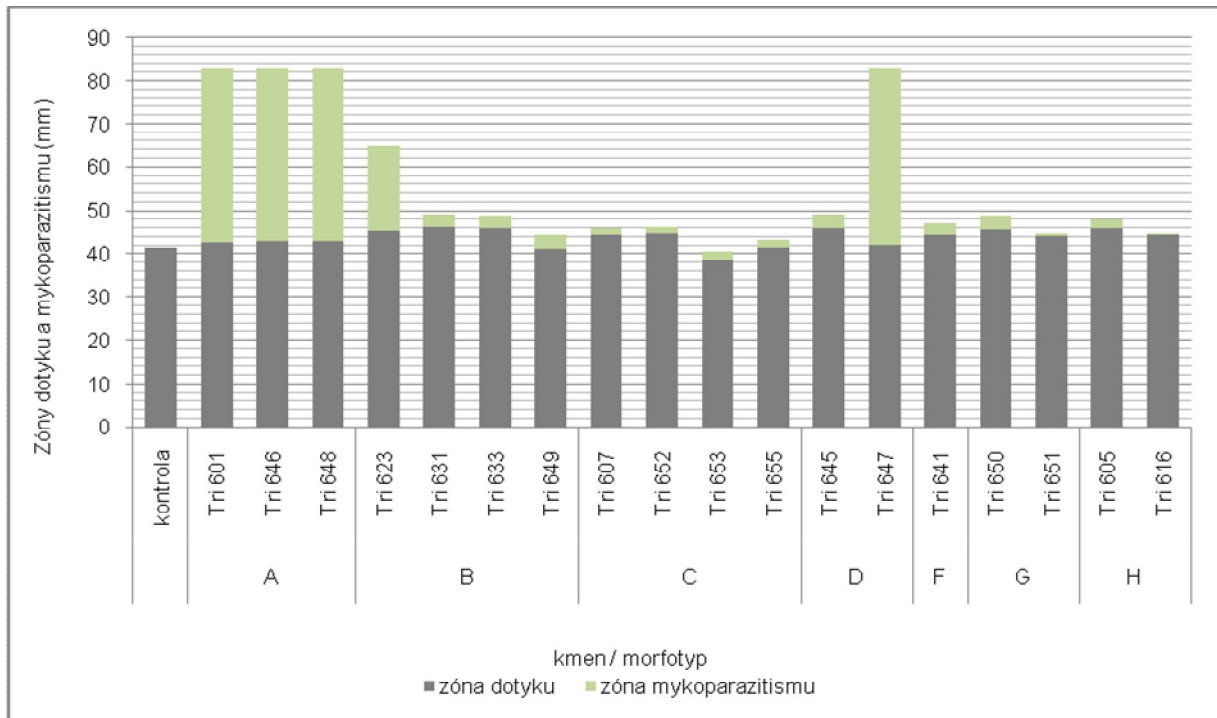
Tabulka 7: Hodnocení zóny mykoparazitismu v interakci hub rodu *Trichoderma* s vybranými fytopatogenními druhy rostlin (měřeno 7. den od inokulace)

Morfortyp	Kmen	Zóna mykoparazitismu v interakci <i>Trichoderma</i> s patogeny (mm)							
		<i>S.sclerotiorum</i>		<i>R. solani</i>		<i>B. cinerea</i>		<i>F. solani</i>	
A	Tri 601	31,00±0,71	b	40,00±0,00	b	40,25±0,43	a	3,75±0,43	efgh
	Tri 646	38,00±1,12	a	30,75±1,30	c	40,00±0,71	a	4,50±0,50	defgh
	Tri 648	36,75±0,83	a	40,50±0,87	b	40,00±0,00	a	4,00±0,00	defgh
B	Tri 623	15,50±1,50	c	2,25±0,43	gh	19,50±1,80	b	12,50±3,35	c
	Tri 631	6,75±0,43	defg	3,50±0,50	gh	2,75±1,64	c	2,50±0,50	fgh
	Tri 633	4,75±0,43	fgh	1,25±0,83	gh	3,00±1,87	c	1,25±0,43	gh
	Tri 649	8,75±2,17	d	21,00±2,24	gh	3,25±1,38	c	28,75±1,48	a
C	Tri 607	8,25±2,17	de	25,75±1,92	d	1,25±1,30	c	8,25±2,28	cdef
	Tri 652	2,75±0,43	h	3,25±0,83	gh	1,50±1,12	c	9,75±2,17	cd
	Tri 653	7,25±1,48	defg	7,00±0,71	f	2,00±1,22	c	5,00±0,00	defgh
	Tri 655	4,75±0,43	fgh	2,00±0,87	gh	1,75±0,48	c	8,75±0,83	cde
D	Tri 645	9,00±0,00	d	42,50±0,50	a	3,50±0,50	c	27,25±5,36	ab
	Tri 647	9,25±0,83	d	42,00±0,00	ab	41,00±0,71	a	25,00±1,41	ab
F	Tri 641	12,75±0,83	c	5,25±1,30	fg	2,50±0,87	c	3,00±0,71	efgh
G	Tri 650	6,50±0,50	defg	3,00±0,00	gh	3,25±1,09	c	6,25±0,43	defg
	Tri 651	5,25±0,83	efgh	10,00±1,12	gh	0,50±0,87	c	5,75±0,43	defgh
H	Tri 605	4,50±0,50	gh	3,00±0,00	gh	2,25±0,43	c	22,75±3,27	b
	Tri 616	7,75±0,43	def	2,25±0,43	gh	0,25±0,43	c	1,00±0,00	h

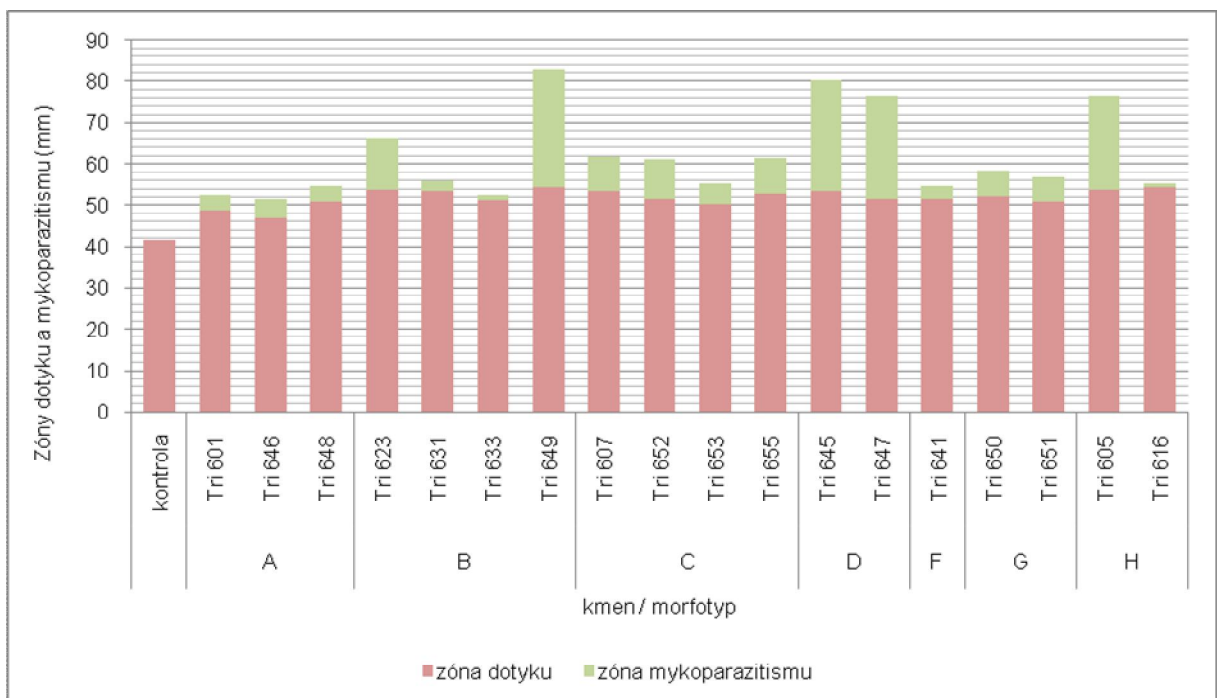
V rámci testovaných kmenů nebyla zaznamenána výrazně rozdílná délka zóny dotyku, nicméně byla zaznamenána statistická rozdílnost ($F= 3,072$; $df=18,57$; $p=0009$). Houby rodu *Trichoderma* se střetly s fytopatogenní houbou *B. cinerea* ve vzdálenosti od 38,50 mm do 46,25 mm. Nejrychleji kolonizoval Petriho misku od kraje kmen Tri 631, naopak nejpomaleji kmen Tri 653.

Účinnost kmenů na patogena *B. cinerea* byla statisticky rozdílná ($F=582,50$; $df=18,57$; $p=0,0000$). Nejúčinnější byl druh *T. virens* a kmen Tri 647 a Tri 623. Ostatní kmeny vykazovaly velmi nízkou schopnost parazitovat na kultuře *B. cinerea* a u kmenů Tri 616 a Tri 651 byla účinnost téměř nulová.

Graf 4: Porovnání zóny dotyku a účinnost jednotlivých druhů/kmenů hub rodu *Trichoderma* v interakci s patogenem *B. cinerea*.



Graf 5: Porovnání zóny dotyku a zóny mykoparazitismu mezi jednotlivými druhy/kmeny hub rodu *Trichoderma* v interakci s *F. solani*.



Druh *Fusarium solani* je výrazně pomalu rostoucí druh, proto zóna dotyku jednotlivých kmenů byla výrazně větší než v interakci s předchozími testovanými patogeny ($F=7,820$; $df= 18,57$; $p=0,0000$). Nejmenší zóna dotyku byla zaznamenána u kmene Tri 646 (47 mm) a největší u kmene Tri 616 a Tri 649. Oba kmeny se dotkly s patogenem *F. solani* ve vzdálenosti 54,25 mm od kraje misky, kam byl inokulován mykoparazit.

Nejlepší schopnost parazitovat patogena *F. solani* vykazaly kmeny Tri 649, Tri 645, Tri 647 a Tri 649. Dále dobrou účinnost vykazoval i kmen Tri 623. Ostatní kmeny vykazaly výrazně nižší schopnost parazitovat na myceliu *F. solani*. Hyfy ostatních kmenů přerůstaly kulturu *F. solani* maximálně do vzdálenosti 10 mm. Velmi nízkou skoro nulovou účinnost prokázal kmen Tri 616 a kmen Tri 633. Kmeny mykoparazitické houby *T. virens* prokázaly na tohoto patogena nejmenší účinnost ve srovnání s účinností proti *S. sclerotiorum*, *R. solani* a *B. cinerea*. Mykoparazitické houby měly statistický vliv na parazitaci mycelia *F. solani* ($F=70,595$; $df= 18,57$; $p=0,0000$).

4.2.1.1. Vývoj sklerocií a jejich parazitace v interakci s mykoparazitickými druhy hub rodu *Trichoderma*

V rámci interakčních testů byl dále sledován vliv mykoparazitických hub rodu *Trichoderma* na tvorbu sklerocií fytopatogenní houby *S. sclerotiorum* a zároveň byla sledovaná schopnost parazitace sklerocií mykoparazitických druhem, která byla na kultuře *S. sclerotiorum* vyvinuta. Z jednotlivých variant byla odebrána sklerocia z jedné strany kultury *S. sclerotiorum* a jednotlivě byla umístěna na povrch živné půdy PDA v Petriho miskách (60 mm). Po 7 dnech byla sledována jejich parazitace.

V kontrolní variantě bylo na kultuře *S. sclerotiorum* vytvořeno 15,50 sklerocií. Tvorba sklerocií byla inhibována v interakci s houbami rodu *Trichoderma*. Největší inhibici tvorby sklerocií houbou *S. sclerotiorum* vykázal kmen Tri 650 následně kmeny Tri 641 a Tri 616. U těchto kmenů bylo vytvořeno méně než 6 sklerocií. Druh *T. virens* ovlivnila též tvorbu sklerocií, kdy se počet sklerocií vytvořených *S. sclerotiorum* pohyboval od 6,25 do 7 sklerocií. Vliv testovaných kmenů byl statisticky průkazný ($F=24,910$; $df=18, 57$; $p=0,000$) na vývoj sklerocií fytopatogenní houby *S. sclerotiorum*.

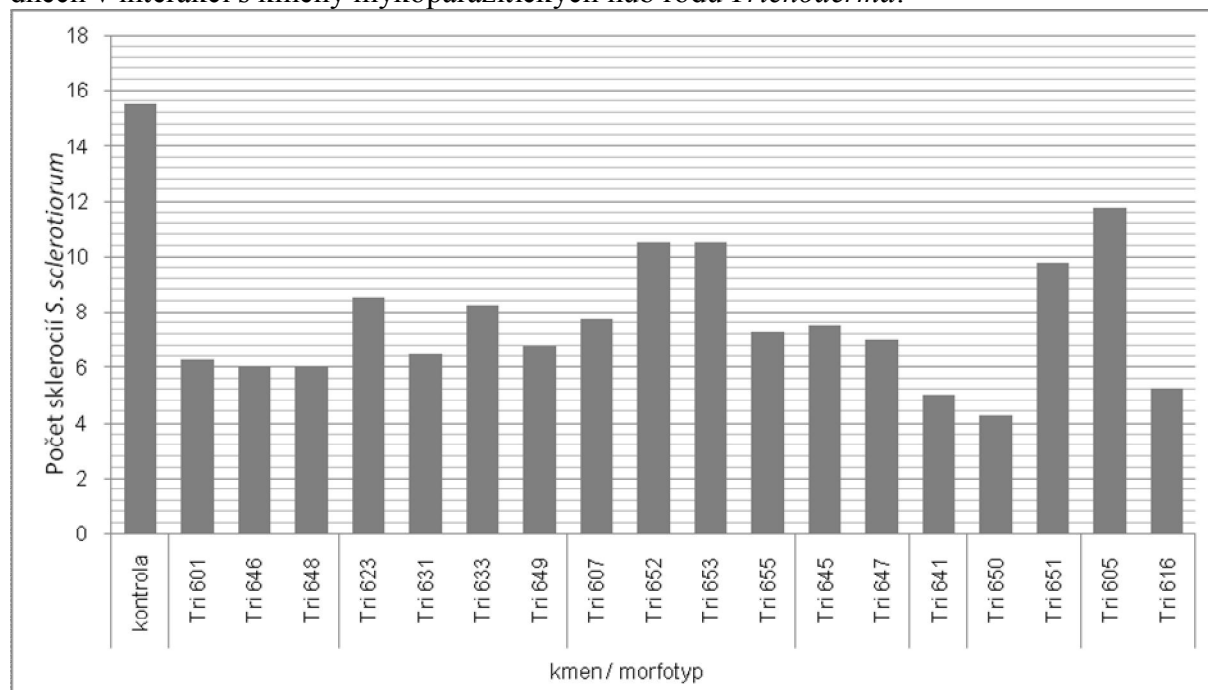
Tabulka 8: Průměrný počet sklerocií a procento parazitice sklerocií fytopatogenní houby *S. sclerotiorum* v interakci s jednotlivými druhy mykoparazitických hub.

Morfortyp	Kmen	Sklerocia <i>S. sclerotiorum</i>		
		Průměrný počet		% parazitovaných
	kontrola	15,50±0,50	a	0,00
A	Tri 601	6,25±0,83	efgh	80,00
	Tri 646	7,00±0,00	efg	100,00
	Tri 648	7,00±0,00	efg	80,00
B	Tri 623	8,50±1,12	cde	66,67
	Tri 631	6,50±2,06	efgh	100,00
	Tri 633	8,25±1,48	cde	40,00
	Tri 649	6,75±1,09	efgh	33,33
C	Tri 607	7,75±0,83	def	50,00
	Tri 652	9,75±0,43	bcd	40,00
	Tri 653	10,50±0,50	bc	60,00
	Tri 655	7,25±0,83	defg	100,00
D	Tri 645	7,50±0,71	efg	40,00
	Tri 647	7,00±0,71	efg	25,00
F	Tri 641	5,00±0,71	gh	100,00
G	Tri 650	8,75±0,43	cde	66,67
	Tri 651	4,25±0,43	h	40,00
H	Tri 605	11,75±0,83	b	100,00
	Tri 616	5,25±0,43	fgh	100,00

Po interakčních testech mezi fytopatogenní houbou *S. sclerotiorum* a kmeny hub rodu *Trichoderma* byla ze všech variant odebrána sklerocia a jednotlivě umístěna na povrch živné půdy PDA v Petriho miskách (60 mm). Po 7 dnech byla sledována jejich parazitace. V případě, že byla sklerocia parazitována, na živné půdě došlo k prosazení mykoparazitické houby a pokud parazitována nebyla, povrch misky s živnou půdou byl pokryt kulturou fytopatogenní houby *S. sclerotiorum*.

Nejlepší účinnosti byla zaznamenána u kmenů druhu *T. virens*. Všechny tři kmeny vykazovaly téměř 100% účinnost proti tomuto patogenu. Zajímavé výsledky byly dosaženy u kmene Tri 605 a Tri 616. U těchto kmenů byla zaznamenána 100% účinnost i přesto, že zóna mykoparazitismu byla úzká. Tento jev byl zaznamenán i u dalších kmenů.

Graf 6: Porovnání počtu sklerocií vytvořených fytopatogenní houbou *S. sclerotiorum* po 7 dnech v interakci s kmeny mykoparazitických hub rodu *Trichoderma*.



5. DISKUZE

První část výzkumu se zabývala monitoringem mykoparazitických hub rodu *Trichoderma*, *Clonostachys* a *Lecanicillium* v půdách s ekologickým a konvenčním systémem hospodaření na jihočeských lokalitách. Pro určení přítomnosti těchto hub byly využity 4 metody izolace o různé citlivosti. Tradiční metody pro posouzení celkové rozmanitosti hub v půdním prostředí spoléhá hlavně na tzv. metodu ředění („Dilution plate technique“). Rouxell (1997) podrobně popsal veškeré experimentální postupy běžně používané v rámci metody zřed'ovací DPT. Metoda je založena na přímé izolaci a zahrnuje kombinaci jemného rozptýlení částic půdy a sériové ředění fragmentů (mycelium, spory) hub v půdách, které jsou následně naočkovány na umělá živná média. Nejlepší výsledky pro izolaci hub vykázala metoda zřed'ovací, pomocí které byly na všech lokalitách odizolovány houby rodu *Trichoderma* a zároveň na stanovišti v Rancířově u Jindřichova Hradce byl touto metodou detekován druh *Trichoderma virens*. Druh *T. virens* je na základě mikro-morfologických znaků odlišný od ostatních druhů *Trichoderma*, proto lze tento druh snadno rozpoznat a určit (Websterem a Lomasem 1964). Ostatní druhy se již nepodařilo s přesností určit díky vzájemné morfologické podobnosti (Bissett 1991, Gaius a Bissett 1999). DPT patří mezi nejpoužívanější základní metody, založené na promývání půdy (Gams, Bissett 1998). Z praktického hlediska však nemá tato metoda takovou vypovídací schopnost jako metody založené na využití živé návnady. Hlavním důvodem je to, že metodou DPT se mohou odizolovat i kmeny hub rodu *Trichoderma*, která nemusí být virulentní k cílovým fytopatogenním druhům hub. V rámci diplomové práce se ukázala tato metoda jako doplňková, která řekne, zda li se v půdních vzorcích druhu *Trichoderma* vyskytují. Při dalších experimentech založených na izolaci mykoparazitických druhů hub je třeba ředit vzorek více než jedenkrát, proto aby došlo k získání méně půdních druhů hub na živné půdě PDA. Tímto krokem získáme například to, že u jednotlivých druhů/kmenů *Trichoderma* bude snadné rozpoznat fenotypový projev vytvořených kolonií. Při jednom ředění není možné na živné půdě rozeznat hranice kultur jednotlivých půdních druhů hub. V případě, že se ve vzorku půdy objeví *Trichoderma*, při delší kultivaci tento rod parazituje na dalších vyskytujících se druzích hub a proto je možné tyto mykoparazity snadno přečistit do čisté kultury.

Při použití selektivní živné půdy THSM byly odizolovány kmeny mykoparazitické houby *T. harzianum* (Williems *et al.* 2003). Selektivní médium je vyvinuto k izolaci právě tohoto druhu, nicméně až v budoucnu při použití genetických metod k identifikaci izolatů/kmenů se tato skutečnost může stoprocentně potvrdit.

Metodu založenou na využití živé návnady „*Sclerotia* bait technique“ můžeme považovat za relativně jednoduchou metodu pro detekci širokého spektra přirozeně se vyskytujících mykoparazitických hub a jejich prostorového rozšíření, a to nezávisle na ročním období a výskytu původců onemocnění v půdě. Kromě těchto ekologických studií nám tato metoda umožňuje i selekci kmenů, které jsou virulentní k patogenu *Sclerotinia sclerotiorum* a rovněž nabízí i možnost detekovat nové kmeny mykoparazitických hub využitelné v praktické biologické ochraně (Ribeiro a Butler 1992, Ondřej *et al.* 2010). Antagonistická schopnost houby *Clonostachys rosea f. catenulata* byla využívána v biologické ochraně jahod proti *B. cinerea* (Sutton a Peng, 1993). Houby jako *Trichoderma* spp. nebo *Clonostachys rosea* jsou schopny parazitovat řadu sklerocií při využití metody živých pastí. Van Toor (2002) uvádí, že ze sklerocií ponechaných nějaký čas v půdě odizoloval kmeny *T. virens*, *T. viride* a *Fusarium lateritium*. Čím byla sklerocia v půdě větší, tím byla větší šance, že odolají virulenci mykoparazita (van Toor 2002). Naopak, Papavizas a Lewis (1989) objevili, že kmeny GL 3 a GL 21 houby *T. virens* úspěšně potlačovaly choroby způsobené fytopatogenním druhem *Sclerotinium rolfsii*. Nejlepší účinnost vykázaly mykoparazitické druhy hub proti malým sklerociím (Sr-1), částečně byly účinné vůči sklerociím Sr-116 (středně velká sklerocia) a neúčinné vůči sklerociům Sr-3 (velká sklerocia).

Metoda SBT je založena na obohacení organického substrátu resp. půdního vzorku o živou návnadu. Mnohem vyšší výskyt hub rodu *Trichoderma* byl zjištěn v půdách, kde se preferovalo ekologické zemědělství obohacené hodně o organickou hmotu, než tam kde byl využíván konvenční způsob hospodaření. V případě diplomové práce se využívala sklerocia fytopatogenní houby *Sclerotinia sclerotiorum*, které se často používají pro selektivní izolaci mykoparazitických hub z půdy. Pro izolaci mykoparazitických hub z půdy by bylo možné kromě sklerocií druhu *S. sclerotiorum* využít i sklerocia houby *Botrytis cinerea* a *Claviceps purpurea* (Ondřej *et al.* 2010).

Metoda SBT se vyznačuje vysokou citlivostí a podle výsledků jako jediná metoda prokázala na lokalitě v Dobré Vodě u Jindřichova Hradce výskyt i entomopatogenního druhu *Lecanicillium muscarium*. Houba *Lecanicillium muscarium* (= *Verticillium lecanii*) vykazuje i statut mykoparazitického druhu, zejména pak na fytopatogenní druhy hub rodu *Erysiphales* (Ownley *et al.* 2010, Askary *et al.* 1998).

Lze však předpokládat, že i přes vysoký efekt parazitace sklerocií *S. sclerotiorum* mykoparazitickými druhy hub, mohou být výsledky této metody zkreslené zejména tím, že se odizolují rychleji rostoucí druhy hub, které kolonizují vložená sklerocia rychleji a následně je parazitují. Ne vždy se tak mohou odizolovat druhy, které jsou více virulentní

k fytopatogennímu druhu *S. sclerotiorum*. Mezi významný mykoparazitický druh schopný parazitovat a následně degradovat sklerocia *S. sclerotiorum* je *Coniothyrium minitans* (Bennett *et al.* 2006). Jones a Stewart (2000) zjistili, že 39 kmenů houby *Coniothyrium minitans* ukázalo velmi značné rozdíly ve schopnosti parazitovat sklerocia *S. sclerotiorum* v laboratorních podmínkách. Pět kmenů vykázalo vysokou schopnost parazitace, zatímco ostatní kmeny vykázaly buď velmi malou, nebo dokonce nulovou schopnost. Různé kmeny vykazovaly i rozdílnou antagonistickou schopnost. V rámci použití izolačních technik se předpokládalo, že bude tento mykoparazitický druh *C. minitans* během monitoringu na vybraných lokalitách v rámci diplomové práce detekován. Bohužel se tato hypotéza nepotvrdila.

Při použití metody založené na využití mycelia fytopatogenní houby *S. sclerotiorum* („Pre-colonization plate method“) byly opět odizolovány pouze mykoparazitické druhy hub rodu *Trichoderma*. Druh *Coniothyrium minitans* opět nebyl touto metodou detekován. Zároveň v rámci metody využívající k izolaci mykoparazitických hub mycelium fytopatogenního druhu houby *S. sclerotiorum*, lze tohoto patogena nahradit druhem jiným (např. *Fusarium culmorum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*) (Mulligan a Deacon 1992).

Zástupci hub z rodu *Trichoderma* jsou kosmopolitní a rostou v celé řadě substrátů podobně jako rostlinné zbytky (García *et al.* 2005). Jakmile *Trichoderma* v půdě rozpozná svého hostitele, jeho hyfy se začnou bohatě větvit a pomocí těchto hyf mykoparazit kontaktuje hostitele. Když mykoparazit dosáhne hostitele, jeho hyfy se často obtočí kolem hostitelských hyf a následně začnou kolonizovat celou stélku hostitelského druhu houby (Dwivedi a Shukla 2002). Skutečnost je ta, že v polních podmínkách má vliv celá řada biotických a abiotických faktorů, které mohou ovlivnit celkový antagonistický a mykoparazitický efekt. Pomocí laboratorních „in-vitro“ testů je umožněn celkový výběr kmenů *Trichoderma* vhodných jako prostředek biologické ochrany. Zapotřebí je však dalšího výzkumu k ověření nejvíce významných kmenů, které se následně využijí v přírodních nebo polních podmínkách. Celkově lze říci, že z půd je možné odizolovat celou řadu hub, které mají antagonistické a mykoparazitické schopnosti s různým využitím zejména pak v zemědělství, ale i lesnictví (Ibarra-Medina *et al.* 2010).

V této práci byl hodnocen morfologický a fenotypový projev vybraných izolovaných kmenů hub rodu *Trichoderma* na živných půdách PDA. Hodnocení těchto projevů bylo realizováno po 7 a 14 dnech inkubace v teplotě 20 °C. Druhy byly zařazovány do monotypů na základě podobnosti s druhy hub rodu *Trichoderma* re-izolovaných z komerčně dostupných preparátů. Důležitými znaky byl typ sporulace a přítomnosti pustul, což je stále základní

metoda určování druhů (Samuels 1996). V rámci testu radiálního růstu lze usuzovat, jak jsou jednotlivé testované kmeny schopny rychle kolonizovat ekologickou niku a následné zjišťování výtěžnosti i to, jak moc jsou tyto kmeny produkční. Z výsledků vyplývá, že kmeny zařazené do morfotypu D vykazovaly nejrychlejší růst. Byly schopny kolonizovat celou Petriho misku již po 72 hodinách. Kmeny byly určeny jako *Trichoderma harzianum* like, protože jejich fenotypový projev odpovídal přípravku Trianum, komerčně produkováný resp. distribuovaný holandskou firmou Koppert. Ostatní kmeny hub rodu *Trichoderma* dosáhly okrajů až po 96 hodinách při teplotě 20°C. Významným druhem, který v časných fázích rychleji roste a tím kolonizuje ekologickou niku, je *Trichoderma virens*. Kmeny vykazovaly rychlejší růst ve srovnání s ostatními kmeny po 24 a 48 hodinách. V pozdější fázi rostly pomaleji. Kmeny zařazené do morfotypu B a C vykazaly vyšší produkční schopnosti po 7 dnech kultivace. Jednalo se opět o druh *Trichoderma harzianum* like (fenotypově podle přípravku JafGreen) a *T. atroviride* like (fenotypově podle přípravek Condor).

Nejdůležitější fází výzkumu ovšem bylo bezesporu hodnocení zóny dotyku a zóny mykoparazitismu v interakci hub rodu *Trichoderma* s vybranými fytopatogenními druhy hub. Izoláty *Trichoderma* spp. byly demonstrovány antagonisticky k řadě patogenních hub (Howell 2003). Účinnost kmenů hub rodu *Trichoderma* byla hodnocena po 7 denní kultivaci. První pokus hodnotil interakci s fytopatogenní houbou *S. sclerotiorum*. Nejrychlejší růst a parazitování tohoto fytopatogenna byl zaznamenán u *Trichoderma virens* a *Trichoderma viride* like. Naopak pomalejší kolonizaci agarové plotny a též nejmenší zónu mykoparazitismu vykazovaly kmeny *Trichoderma harzianum*, u kterých byl prokázán pomalejší růst a tvorba mycelia. Nejlepší účinnost prokázala *Trichoderma virens*, u které byla naměřená zóna mykoparazitismu širší než 31 mm. Wilhite *et al.* (1994) prokázali vysoký potenciál, z hlediska využití tohoto druhu v biologické ochraně rostlin. Druh *Trichoderma virens* vykázal i výborné účinky na eliminaci fytopatogenních druhů *Rhizoctonia solani* a *Botrytis cinerea*. Naopak, téměř nulou účinnost vykázal tento druh proti *Fusarium solani*. Druh *Trichoderma harzianum* like vykázal též vynikající účinky proti *R. solani* a *B. cinerea*. Ve srovnání s druhem *T. virens* byla houba *T. harzianum* daleko účinnější proti *F. solani*. Na pracovišti byla prokázána velká schopnost eliminace druhu *F. solani* mykoparazitickou houbou *T. viride* kmene reizolovaného z přípravku Trichostar. Kmen Tri 641 zařazený do morfotypu F právě na fenotypovém projevu tohoto komerčního kmene nevykázal po 7 dnech dobrou účinnost. Vyplývá to z faktu, že druh *T. viride* je pomaleji rostoucí druh a tím pádem je kolonizace prostředí pomalejší, nicméně po delší době je schopen tento druh úplně parazitovat mycelium *F. solani* a úplně potlačit jeho sporulaci. Vyprodukované mikro i

makrokonidie druhu *F. solani* jsou pokryty masou spor právě druhu *T. viride*. Z hlediska praktického využití se jeví druh *T. viride* jako nejúčinnější proti *Fusarium* spp., nicméně jeho potenciál je těžké využít vzhledem k horším produkčním vlastnostem na pevných agarových plotnách resp. přirozených substrátech (Khandelwal *et al.* 2012). Z hlediska biotechnologické produkce spor by bylo vhodné využít submerzní produkci ve fermentorech.

Výsledky studií zaměřených na charakterizaci kmenů hub rodu *Trichoderma* a jejich vzájemného porovnávání naznačují nutnost respektovat lokální, přirozeně se vyskytující kmeny hub, protože představují kvalitativně velmi významnou složku přirozené supresivity prostředí.

6. ZÁVĚRY

- Monitoring provedený na všech 26 vybraných pozemcích přinesl velmi důležité informace o výskytu druhů vláknitých mykoparazitických hub.
- Na základě čtyř metod izolace se podařilo vytvořit komplexní velmi propracovaný systém izolace mykoparazitických hub z půdy, kdy každá z metod má svou určitou vypovídací schopnost.
- Pomocí zředovací metody byly ve všech půdních vzorcích zastoupeny houby rodu *Trichoderma*.
- Pomocí selektivní živné půdy THSM byly odizolovány kmeny *T. harzianum*. Selektivní médium je vyvinuto k izolaci právě tohoto druhu, nicméně až v budoucnu při použití genetických metod k identifikaci izolátů/kmenů se tato skutečnost může stoprocentně potvrdit.
- Z mykoparazitických hub byly stabilně izolovány druhy rodu *Trichoderma*, dále se podařilo odizolovat druh *Trichoderma virens* a *Clonostachys rosea* f. *catenulata*.
- Během monitoringu se nepodařilo zaznamenat výskyt druhu *Coniothyrium minitans*, který je úzce specializovaný na patogena *S. sclerotiorum*.
- Naopak pomocí sklerocií houby *S. sclerotiorum* se podařilo odizolovat druh *Lecanicillium muscarium*, který je obecně řazen mezi entomopatogenní houby, nicméně nese i statut mykoparazita.
- Druhy *Trichoderma* spp. získané pomocí sklerocií se v některých případech velmi výrazně morfologicky odlišovaly od kmenů izolovaných zředovací metodou z půdních výluhů.
- Jednotlivé izoláty/kmeny nejsme schopni stoprocentně určit na druhové úrovni proto byly pro práci využity fenotypové projevy druhů hub rodu *Trichoderma* re-izolovaných z komerčně dostupných preparátů.
- Kmeny mykoparazitických druhů hub zejména pak získaných metodou živých pastí slouží jako významný ukazatel schopnosti půdy úspěšně potlačovat houbové původce onemocnění rostlin.
- V rámci hodnocení produkčních a biologických vlastností hub rodu *Trichoderma* byly zaznamenány rozdíly mezi jednotlivými kmeny.
- Druh *Trichoderma virens* je účinný proti fytopatogenní houbě *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* a *Botrytis cinerea*. Naopak téměř nulovou aktivitu vykazuje proti patogenu *Fusarium solani*.
- Některé kmeny druhu *T. harzianum* vykazovaly velmi dobrou účinnost proti *R. solani*, *B. cinerea* a *F. solani*. Naopak proti *S. sclerotiorum* vykázaly nízkou účinnost. Kmeny hub rodu *Trichoderma* významně potlačily vývoj sklerocií fytopatogenní houby *S. sclerotiorum*, vytvořená sklerocia následně parazitovaly.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- Adams P.B., Ayers W.A. (1985): The world distribution of the mycoparasites *Sporidesmium sclerotivorum*, *Teratosperma oligocladum* and *Laterispora brevirama*. *Soil Biology and Biochemistry*, 17 (4): 583–584.
- Alabouvette C., Lemanceau P. (1999): Joint Action of Microbials for Disease Control. In: Hall F.R., Menn J.J. (Eds.): *Biopesticides – Use and Delivery*. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, 117-135.
- Altieri M.A. (1994): Biodiversity and Pest Management in Agroecosystems. *Haworth Press, New York*, 185 pp.
- Arora D.K., Elander R.P., Mukerij K.G. (1992): *Handbook of applied mycology, Fungal Biotechnology*, vol 4. Marcel Dekker, New York.
- Askary H., Carriere Y., Belanger R.R., Brodeur J. (1998): Pathogenicity of the fungus *Verticillium lecanii* to aphids and powdery mildew. *Biocontrol Sci. Technol.*, 8: 23–32.
- Askew D.J., Laing M.D. (1993): An adapted selective medium for the quantitative isolation of *Trichoderma* species. *Plant Pathology*, 42: 686-690.
- Bagar M. (2007): Biologická ochrana rostlin. *Metodické listy č. 12, Spolek poradců v ekologickém zemědělství ČR.* (http://www.eposcr.eu/files/informac/vyd_publ/ML12%20Biologicka%20ochrana.pdf; on-line: 8. 4.2011).
- Bach de P. (1964): The scope of biological control. In: *Biological control of insect Pests and Weeds*. Chapman and Hall Ltd., London. 3-20. cit. sec. Johnson M. W. (2000): *Biological Control of Pests*, ENTO 675. UH-Manoa, 1-5.
- Bajwa W.I., Kogan, M. (1997): Compendium of IPM Definitions (CID). Electronic Publication (<http://www.ippc.orst.edu/IPMdefinitions>). *Integrated Plant Protection Center (IPPC), Oregon State University, Corvallis, OR.*
- Baker K.F., Cook R.J. (1974): Biological control of plant pathogens. *The American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota*, 196.
- Baker R., Griffin G.J. (1995): Molecular Strategies for Biological Control of Fungal Pathogens. In: Rueveni R. (ed.) *Novel approaches to integrated pest management*. Lewis, CRC Press, Boca Raton, 369.
- Barnett H.L., Binder, F.L. (1973): The fungal host-parasite relationship. *Annu. Rev. Phytopathol*, 11:273.
- Barnett H.L., Lilly V.G. (1957): *Physiology of Fungi* McGraw-Hill, New York, NY, USA. 342-350.
- Benitez T., Delgado-Jarana J., Rincon A.M. (1998): Biofungicides: *Trichoderma* as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi. *Trivandrum*, pp 129-150.
- Benitez T., Rincon, A.M., Limon, M.C., Codon, A.C. (2004): Biocontrol of *Trichoderma* strains. Department of Genetics, University of Sevilla, Spain *Int Microbiol.* (4):249-60.
- Bennett A.J., Leifert C., Whipps J.M. (2006): Survival of *Coniothyrium minitans* associated with sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(1): 164-172.

- Bissett J. (1991): A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany*, 69: 2357–2372.
- Bissett J. (1991): A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section Longibrachiatum. *Can. J. Bot.* 69:2418–2420.
- Brown H.L., Bruce A. (1999): Assessment of the biocontrol potential of *Trichoderma viride* isolate-part I: establishment of field and fugal cellar trials. *Int Biodeterior Biodegrad* 44:219-223.
- Brown H.L., Bruce A., Staines H. J. (1999). Assessment of the biocontrol potential of a *Trichoderma viride* isolate: Part II: Protection against soft rot and basidiomycete decay. *International biodeterioration & biodegradation*, 44(4): 225-231.
- Campbell W.A.A. (1947): New species of *Coniothyrium parasitic* on sklerotia. *Mycologia* 39:190.
- Carsolio C., Gutierrez., Jimenez B., Van Montagu M., Herrera-Estrella (1994): Primary structure and expression pattern of the 33-kDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Proceeding of the National Academy of Science, USA* 91 (23), 10903-10907.
- Clarkson J. P., Mead, A., Payne, T., Whipps, J. M. (2004): Effect of environmental factors and *Sclerotium cepivorum* isolate on sclerotial degradation and biological control of white rot by *Trichoderma*. *Plant Pathology*, 53: 353-362.
- Danielson R. M., and C. B. Davey (1973): "The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils." *Soil Biology and Biochemistry*, 5(5): 485-494.
- Dennis C., Webster J. (1971): Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. Hyphal interaction. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 57:363.
- Domsch K. H., Gams W., Anderson T. H. (1980): "Compendium of soil fungi". *Academic Press. Vol.1, New York*.
- Dwivedi B.P., Shukla D.N. (2002): Biocontrol of *Fusarium* wilt of guava (*Psidium guajava* L.) using *Trichoderma* and *Gliocladium* species. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 15:399-400.
- Edel-Hermann V., Brenot S., Gautheron N., Aime S., Alabouvette C., Steinberg C. (2009): Ecological fitness of the biocontrol agent *Fusarium oxysporum* Fo47 in soil and its impact on the soil microbial communities. *FEMS microbiology ecology*, 68(1): 37-45.
- Eisendle M., Oberegger H., Buttinger R., Illmer P., Haas H. (2004): Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacC-mediated ambient-Ph regulatory system in *Aspergillus nidulans*. *Euk Cell*, 3:561-563.
- Elad Y., Chet I., Boyle P., Henis Y. (1983): Parasitism of *Trichoderma* sp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology*, 73: 85-88.
- Elad Y., Chet I., Henis Y. (1981): A selective medium for improving qualitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Phytoparasitica*, 9: 59-67.

- Foley M.F., J.W. Deacon (1985): Isolation of *Pythium oligandrum* and other necrotrophic mycoparasites from soil. *Transactions of the British Mycological Society*, 85: 631-639.
- Gams W., Bissett J. (1998): Morphology and Identification of *Trichoderma*. In: Kubicek C.P., Harman G.E., (Eds): *Trichoderma and Gliocladium. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. Taylor and Francis Ltd., London*, pp. 3–34.
- Gams W., Diederich P., Pöldmaa K. (2004): Fungicolous fungi. In: Mueller G.M., Bills G.F., Foster M.S. (eds.): *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press*, 343-392.
- García B.F.J., Santamarina M.P., Roselló J. (2005): *Trichoderma*: mecanismos de control. *Phytoma*, 172:106-107.
- Gerlagh M., Whipps J. M., Budge S. P., Goossen van de Geijn H. M. (1996): Efficiency of isolates of *Coniothyrium minitans* as mycoparasites of *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum* and *Botrytis cinerea* on tomato stem pieces. *European Journal of Plant Pathology*, 102: 787–793.
- Gomez-Alarcon G., de la Torre M. A. (1994): Mecanismos de corrosion microbiana sobre los materiales Petrem. *Microbiologia* 10:11-120.
- Griffin D.M. (1968): A Theoretical Study Relating the Concentration and Diffusion of Oxygen to the biology of organisms in soil. *New Phytol.* 67:561-577.
- Gullino M. L. (1992): Control of *Botrytis* rot of grapes and vegetables with *Trichoderma spp.* In: Tjamos E.C., Papavizas G.C., Cook R.J. (Eds.): *Biological Control of Plant Disease. Progress and challenges for the future*, eds. Plenum Press, New York, pp. 125-132.
- Haas D., Defago G. (2005): Biological control of soilborne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev.Microbiol*, 3: 307–319.
- Hammerschmidt R., Kuae J. (1982): Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. *Physiol. Plant Pathol.*, 20:73-82.
- Handelsman J., Parke J.L. (1989): Mechanisms in biocontrol of soil-borne plant pathogens. In: Kosuge T., Nester E., (Eds.): *Plant-Microbe Interactions, Vol. 3., McGraw-Hill, New York*, 27-61.
- Hanson L.E., Howel C.R. (2004): Elicitors of Plant Defense Responses from Biocontrol Strains of *Trichoderma virens*. *Phytopatology*, 94(2):171-6.
- Harman G.E. (2004): Overview of new insights into mechanisms and uses of *Trichoderma* based product. *Phytopathology*, 94(6): S138-S138.
- Harman G.E., Howell C.R., Viterbo., Chet I., Lorito M. (2004): *Trichoderma* species-opportunistic virulent plant symbionts, A reviews. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 43-56
- Hebbar K.P., Lumsden R.D. (1999): Biological control of seedling diseases. In: Hall F.R., Menn J.J. (Eds): *Biopsticides-use and delivery. Humana Press, Totowa, New Jersey*, 155-170.
- Howell C.R. (2003): Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The History and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87: 4-10.

- Howell C.R., Hanson L.E., Stipanovic R.D., Puckhaber L.S. (2000): Induction of *Trichoderma* species. *Transactions of the British Mycological Society*, 71: 469-474.
- Howell C.R., Stipanovic R. D., Lumsden R. D. (1993): Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling diseases. *Biocontrol Sci. Technol.*, 3: 435-441.
- Howell C.R. (1999): Selective isolation from soil and separation in vitro of P and Q strains of *Trichoderma virens* with differential media. *Mycologia*, 91(6): 930-934.
- Howell C.R., Puckhaber L.S. (2005): A study of the characteristics of „P” and „Q” strains of *Trichoderma virens* to account for differences in biological control efficacy against cotton seedling diseases. *Biological Control*, 33:217-222.
- Howell, C. R. (2002): Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium spp.* and its biological control with *Trichoderma spp.*" *Phytopathology*, 92(2): 177-180.
- Chaverri P., Samuels G. J. (2003): *Hypocrea/Trichoderma* (ascomycota, hypocreales, hypocreaceae): species with green ascospores. *Studies in Mycology* 48. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS): Utrecht. 116 pp. <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm> (on-line 25.4.2013.)
- Chen H., Hower D.G. (2003): Bacteriocins and their food applications. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety*, 2(3): 81-100.
- Chen W., Hoitink H.A.J., Madden L.V. (1988): Microbial activity and biomass in container media for predicting suppressiveness to damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Phytopathology*, 78: 1447-1450.
- Chet I., Elad Y. (1983): Mechanism of mycoparasitism. *Colloques INRA*, 18:35-40.
- Chet I., Inbar J. (1994): Biological control of fungal pathogens. *Appl Biochem Biotechnol*, 48: 37-43.
- Chet I., inbar J., Hadar Y. (1997): Fungal antagonists and mycoparasites. In: Esser K., Lemke P.A. (Eds.): *The Mycota IV—Environmental and Microbial Relationships*. Springer, Verlag Berlin Heidelberg. 165-184.
- Chytilová V., Dušek K. (2007): Metodika testování odolnosti brukvovitých plodin k nádorovitosti. *Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., s. 19*.
- Ibarra-Medina V.A., Ferrera-Cerrato R., Alarcón A., Lara-Hernández M.E., Valdez-Carrasco J.M. (2010): Isolation and screening of *Trichoderma* strains antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotinia minor*. *Revisia Mexicana de micología*, 31:53 -63.
- Jeffries P. (1995): Biology and ecology of mycoparasitism. *Canadian Journal of Botany*, 73: 1284-1290.
- Jeffries P. (1997): Mycoparasitism. In: Esser K., Lemke P.A. (Eds.): *The Mycota IV—Environmental and Microbial Relationships*. Springer, Verlag Berlin Heidelberg, 149-164.
- Jensen D.F., Wolffhechel H. (1995): The use of Fungi, particularly *Trichoderma spp.* and *Gliocladium spp.* to control root rot and damping off diseases. In: Hokkanen H., Lynch J.M. (Eds.): *Biocontrol Agents: Benefits and Risks*. Cambridge University Press pp. 177-189.

- Jones E.E., Stewart A. (2000): Selection of mycoparasites of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* isolated from New Zealand soils. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 28:105-114.
- Kaur J., Munshi G.D., Singh R.S., Koch E. (2005): Effect of Carbon Source on Production of Lytic Enzymes by the Sclerotial Parasites *Trichoderma atroviride* and *Coniothyrium minitans*. *Journal of Phytopathology*, 153 (5): 274-279.
- Khandelwal M., Datta S., Mehta J., Naruka R., Makhijani K., Sharma G., Kumar R., Subhas Ch. (2012): Isolation, characterization & biomass production of *Trichoderma viride* using various agro products- A biocontrol agent. *Advances in Applied Science Research*, 3(6):3950-3955.
- Kloepper J.W., Tuzun S., Kuc J. (1992): Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Sci. Technol.*, 2:349-351.
- Krauss U., Soberanis W. (2002): Effect of fertilization and biocontrol application frequency on cocoa pod diseases. *Biological Control*, 24: 82–89.
- Kuae J. (1987): Plant immunization and its applicability for disease control. In: Chet I. (Ed): *Innovative approaches to plant disease control*. Wiley, New York. pp.255-274.
- Kubicek CH. P., Harman G. E. (1998): *Trichoderma and Gliocladium*. Basic biology, taxonomy and genetics, 1: 277.
- Kuc J. (1995): Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol*, 33: 275–297.
- Kůdela V. (1998): Obecná fytopatologie (Fytopatogení prokaryota). *Jihočeská univerzita-Zemědělská univerzita, České Budějovice*.
- Kůdela V., Bartoš P., Čača Z., Dirlbek J., Frič F., Lebeda A., Šebesta J., Ulrychová M., Valášková E., Veselý D. (1989): Obecná fytopatologie. *Academica, Praha*, 387.
- Lamb C.J., Lawton M.A., Dron M., Dixon R.A. (1989): Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell* 56, 215-224
- Landa Z. (1994): Entomopatogenní houby v biologické ochraně rostlin. *Habilitační práce, Jihočeská Univerzita, Zemědělská fakulta, České Budějovice*.
- Landa Z. (2002): Biologická ochrana zahradních rostlin proti chorobám a škůdcům v polních podmínkách, ve sklenících a fóliovnících. In: Demo M., Hričovský I. (Eds.): *Trvalo udržatelné technologie v záhradnictve. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre*, 225-280.
- Lewis J. A., Papavizas G.C. (1987): Application of *trichoderma* and *gliocladium* in alginate pellets for control of *Rhizoctonia* damping-off. *Plant Pathology*, 36:438-446.
- Lieckfeldt E., Kuhls K., Muthumeenakshi S. (1998): Molecular taxonomy of *Trichoderma* and *Gliocladium* and their teleomorphs. In: Kubicek C.P., Harman.G.E. (Eds.): *Trichoderma and Gliocladium*. London; Bristol, PA: Taylor & Francis. pp. 35-56.
- Lorito M., Farkas V., Rebuffat S., Bodo B., Kubicek C.P., (1996): Cell wall synthesis is a major target of mycoparasite antagonism by *Trichoderma harzianum*. *Journal of Bacteriology*, 178: 6382-6385.

- Lübeck M., Sarrocco S., Mikkelsen L., Vergara M., Jensen D., Vannacci G. (1996): Histopathological studies of sclerotia of phytopathogenic fungi parasitized by a GFP transformed *Trichoderma virens* antagonistic strain. *Mycological Research*, 110(2): 179-187.
- Manocha M.S. (1990): Cell-cell interaction of fungi. *Journal of Plant Disease and Protection*, 97: 655-669
- Marois U., Fravel D.R., Papavizas G.C. (1984): Ability of *Talaromyces flavus* to occupy the rhizosphere and its interaction with *Verticillium dahliae*. *Soil Biology and Biochemistry*, 16: 387-390.
- McQuilken M.P., Whipps J.M. (1995) Production, survival and evaluation of solid-substrate inocula of *Coniothyrium minitans* against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Eur J Plant Pathol.*, 101:101–110.
- Monte E. (2001): Understanding *Trichoderma* between biotechnology and microbial ecology. *Int Microbiol 4:1-4 Mycology Research*, 99 (4): 441-446.
- Morris R.A.C., Coley-Smith J.R., Whipps J.M. (1992): Isolation of the mycoparasite *Verticillium biguttatum* from sclerotia of *Rhizoctonia solani* in the United Kingdom. *Plant Pathology*, 41(4): 513-516.
- Mulligan D.F.C., Deacon J.W. (1992): Detection of presumptive mycoparasites in soil placed on post-colonized agar plates. *Mycological Research*, 96: 605–608.
- Nesrsta M. (1991): Produkce antibiotik a toxinů u rodu *Trichoderma*. *Miscelanea prognostica*, Vol.3, 9-27.
- Okrouhlá M. (1993): Biologické zdroje pro nechemickou ochranu rostlin. *Ústav zemědělských a potravinářských informací Praha*, s. 5-38.
- Ondřej M., Cagaš B., Ondráčková E. (2010): Effect of the mycoflora of ergot (*Claviceps purpurea*) sclerotia on their viability. *Plant Protection Science*, 46: 66-71.
- Ownley B.H., Gwinn K.D., Vega, F.E. (2010): Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl*, 55: 113-128.
- Papavizas G.C. (1985): *Trichoderma* a *Gliocladium* - biology, ecology, and potential of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 23, 23-54.
- Papavizas G.C., Lewis J.A. (1989): Effect of *Gliocladium* and *Trichoderma* on damping-off and blight of snapbean caused by *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse. *Plant Pathology*, 38(2): 278-286.
- Park Y.H., Stack J.P., Kenerley C.M. (1992): Selective isolation and enumeration of *Gliocladium virens* and *G. roseum* from soil. *Plant Diseases*, 76: 230–255.
- Paulitz T.C., Matta A. (1999): The role of the host in biological control of diseases, In: Albajes R., Gullino M.L., Van Lenteren J.C., Elad Y. (Eds): Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops. *Kluwer Academic Publisher, Wageningen, The Netherlands*, pp. 394-410.
- Pell J.K., Eilenberg, J., Hajek, A.E., Steinraus, D.C. (2001): Biology, Ecology and Pest *Phytium* spp. *Microbial Ecolog*, 7(1): 29–38.

- Prokinová E. (1996): Biologická ochrana proti houbovým chorobám rostlin. *ÚZPI, Rostlinná výroba*, 7:12.
- Pultar O. (1994): Alternativní metody ochrany ovocných dřevin proti škůdcům. *Rostlinolékař*, 1: 16-18.
- Rabeendran N., Jones E.E., Stewart A. (1998): Isolation and in vitro screening of soil fungi for biological control of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Proc. 51st N.Z. Plant protection Conference*, 102-106.
- Rehner S. A., Samuels, G. J. (1995): Molecular systematics of the *Hypocreales*: a teleomorph gene phylogeny and the status of their anamorphs. *Canadian Journal of Botany*, 73(S1), 816-823.
- Ribeiro W.R.C., Butler E.E. (1998): Isolation of mycoparasitic species of *Pythium* with spiny oogonia from soil in California. *Fytopatologia Brasileira*, 23: 176-179.
- Rifai M. A. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*, 116: 1-56.
- Rouxell L. (1997): Microscopy and culture based method. *Journal of Vegetable Crop Production*, 7(2): 35–37.
- Ryals J., Uknes S., Ward E. (1994): Systemic acquired resistance. *Plant Physiology*, 104: 1109-1112.
- Samuels G. J. (1996). *Trichoderma* a review of biology and systematics of the genus. *Mycological Research*, 100, 923-935.
- Sejketov G.Š. (1982): Griby roda *Trichoderma* ich ispolzovanie v praktike nauka. *Kazachskoj SSSR, Alma-Ata*, 248.
- Sequeira L. (1983). Mechanisms of induced resistance in plants. *Annual Reviews in Microbiology*, 37(1): 51-79.
- Schroers H.L., Samuels G.J., Seifert K., Gams W. (1999): Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia*, 91 (2): 365–385
- Schuster A., Schmoll M. (2010): Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(3): 787-799.
- Singleton L.L., Mihail J.D., Rush C.M. (1992): Methods for research on soil-borne phytopathogenic fungi. *St Paul, MN, USA, American Phytopathological Society Press*, 264 pp.
- Sirjusingh C., Sutton J. C. (1996): Effects of wetness duration and temperature on infection of geranium by *Botrytis cinerea*. *PlantDis.*, 80: 160-165.
- Sirjusingh C., Sutton J. C., Tsujita M. J. (1996): Effects of inoculum concentration and host age on infection of geranium by *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.*, 80: 154-159.
- Sivan A., Chet I. (1989): The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopatology*, 79: 198-203.
- Smith W.H. (1995): Forest occurrence of *Trichoderma* species: emphasis on potential organochlorine (xenobiotic) degradation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 32(2): 179–183.

- Sutton J.C., Peng G. (1993): Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. *Phytopathology*, 83: 615-621.
- Šimková J. (2007): Využití biologické ochrany při pěstování ovsa. *Diplomová práce, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Č. Budějovicích*, pp. 78.
- Tari P.H., Anderson A.J. (1988): Fusarium wilt suppression and agglutinability of *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:2037-2041.
- Ten Hoopen G.M., Rees R., Aisa P., Stirrup T., Krauss U. (2003): Population dynamics of epiphytic mycoparasites of the genera *Clonostachys* and *Fusarium* for the biocontrol of black pod (*Phytophthora palmivora*) and moniliasis (*Moniliophthora roreri*) on cocoa (*Theobroma cacao*). *Department of Natural Sciences, Bath University, Bath BA2 7AY, UK*, pp. 587-596
- Thomashow L.S., Bonsall R.F., Weller D.M. (2002): Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ. In: *Manual of Environmental Microbiology (2nd ed.) ASM Press, Washington DC*, 638-647.
- Tjamos E.C., Papavizas G.C., Cook R.J. (eds) (1992): Biological control of plant diseases. Progress challenges for the future. *Plenum Press, New York*.
- Tronsmo A., Dennis C. (1978). Effect of temperature on antagonistic properties of *Trichoderma virens*. *Transactions of the British Mycological Society*, 71: 469-474.
- Tuite J. (1969): Plant pathological methods (Fungi and Bacteria). *Burgess publishing Co., Minneapolis, USA*, pp. 81-91.
- Van Driesche R. G., Heinz K.M. (2004): Biological control as a component of IPM systems. In: Heinz K.M., van Driesche R.G., Parella M.P. (Eds.): *Biocontrol in protected culture. Batavia, IL, Ball Pub.* p. 25-37.
- Van Loon L.C. (1999): Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In: Datta S.K., Muthukrishnan S. (Eds.): *Pathogenesis-related proteins in plants. Boca Raton: CRC Press*, 1-19.
- Van Toor R.F. (2002): Development of biocontrol methods for *Camellia* flower blight caused by *Ciborinia camelliae* Kohn.
<http://researcharchive.lincoln.ac.nz/dspace/handle/10182/1841> [on-line 23.4.2013].
- Vána J. (1996): Systém a vývoj hub a houbových organismů. *Univerzita Karlova Praha, Karolinum*, 99-112.
- Veselá D. (1986): Biologická ochrana proti chorobám kořenů vzcházejících rostlin. Sborník Ref. Z 1. Sem. „*Biotechnologie v integrované ochraně rostlin. Mykopreparáty československé výroby a jejich využití v ochraně polních kultur, VÚRV Praha-Ruzyně*“.
- Webster J., Lomas N. (1964): Does *Trichoderma viride* produce gliotoxin and viridin?. *Transactions of the British Mycological Society*, 47(4), 535-540.
- Whipps J.M., Lumsden R.D. (2001): Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. In: Butt T, Jackson C, Magan N, eds. *Fungal biocontrol agents-progress, problems and potential. Wallingford: CAB International*.

- Widden P., Hsu D. (1987): Competition between *Trichoderma* species: Effects of temperature and litter type. *Soil Biology and Biochemistry*, 19(1), 89-93.
- Wilhite S. E., Straney D. C. (1996): Timing of gliotoxin biosynthesis in the fungal biological control agent *Gliocladium virens* (*Trichoderma virens*). *Applied microbiology and biotechnology*, 513-518.
- Wilhite S.E., Lumsden R.D., Straney D.C. (1994): Mutational analysis of gliotoxin production by the biocontrol fungus *Gliocladium virens* in relation to suppression of pythium damping-off. *Phytopathology*, 84:816–821.
- Williams J., Clarkson J.M., Mills P.R., Cooper R.M. (2003): A Selective Medium for Quantitative Reisolation of *Trichoderma harzianum* from *Agaricus bisporus* Compost. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (7): 4190-4191.
- Yang L., Miao H.J., Li G.Q., Yin L. M., Huang H.C. (2007): Survival of the mycoparasite *Coniothyrium minitans* on flower petals of oilseed rape under field conditions in central China. *Biological Control*, 40(2): 179-186.
- Yang R., Han Y.C., Li G.Q., Jiang D.H., Huang H.C. (2007): Suppression of *Sclerotinia sclerotiorum* by antifungal substances produced by the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *Eur J Plant Pathol.*, 119:411–420.
- Zeng W.T., Kirk W., Hao J.J. (2012): Field management of *Sclerotinia* stem rot of soybean using biological control agents. *Biological control*, 60(2): 141-147.