

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



Bc. Hana Jand'ourková

MYKOBIOTA ŠŤOVÍKU KRMNÉHO

Mycobiota of energy sorrel

Diplomová práce

Školitel: RNDr. David Novotný Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15.08.2013

.....

Hana Jand'ourková

PODĚKOVÁNÍ

Předně chci poděkovat svému školiteli Davidu Novotnému a konzultantovi Ondřeji Koukolovi za to, že se mnou řešili vzniklé problémy a poskytovali cenné rady, jakož i laboratorní zázemí. Dále bych chtěla poděkovat Jaroslavu Salavovi za pomoc s molekulárními metodami. Děkuji také zemědělcům, kteří mi umožnili volný vstup a odběr vzorků ze svých polí a poskytli mi zajímavé informace z praxe. Můj velký dík také všem kolegům z oddělení mykologie VÚRV, zejména pak Broně Hortové za odpovědi na mé dotazy na metody v zemědělství a techničce Radce Řepové za ochotnou pomoc a vaření kávy. Kamarádce Kamile Pešicové děkuji za kritické posouzení mých četných nápadů, morální podporu a za pouštění hudby k práci. Svoji rodině děkuji za poskytnuté zázemí a za to, že se mi nepokoušeli radit.

Práce finančně podpořena projektem MZe 0002700604.

ABSTRAKT

Šťovík krmný (*Rumex patientia* L. x *Rumex tianschanicus* A. Los.) je rostlina s velkým výnosem nadzemní biomasy. Z tohoto důvodu je pěstována pro energetické účely, ale na Ukrajině je také významnou krmnou plodinou. Přestože se šťovík krmný v České republice pokusně pěstuje už od roku 1992 (provozně od roku 2001), nebyla ještě zkoumána jeho mykobiota.

Cílem této práce bylo zjistit složení mykobioty zdravých rostlin a mykobioty asociované se skvrnitostmi listů a stonků. Dále pak ověřit zda houby izolované ze skvrn tyto skvrny mohou způsobovat a jestli mohou být skvrnitosti způsobeny již dříve izolovanou houbou *Phomopsis* sp.

Houby byly kultivovány na 2% sladinovém agaru a pak morfologicky určovány. Z reprezentativních kmenů pak byla izolována DNA a sekvence úseku ITS byla porovnána s databází GenBank, tak bylo ověřeno morfologické určení a určeny sterilní druhy.

Ze zdravých rostlin bylo kultivováno celkem 24 morfotypů endofytických hub. Nejčastějšími druhy zde byly: *Clonostachys rosea* f. *rosea*, *Cladosporium cladosporioides*, *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus*, *Alternaria alternata* a *Acremonium strictum*. Ze skvrnitostí pak bylo izolováno celkem 29 morfotypů hub, dominantními druhy zde byly: *A. strictum*, *Aureobasidium pullulans*, *C. cladosporioides*, *C. rosea* f. *rosea* a *Fusarium proliferatum*.

Přestože se mezi mykobiotou zdravých rostlin a mykobiotou rostlin se skvrnitostmi lišila celková četnost jednotlivých druhů, celková druhová skladba se příliš nelišila.

Poměrně malý počet izolovaných druhů můžeme vysvětlit antifungálními účinky šťovíků i mykoparazitickou povahou některých hub.

Klíčová slova:

šťovík krmný, houby, mykobiota, endofyty, skvrnitost, energetické rostliny.

ABSTRACT

Energy sorrel (*Rumex patientia* L. x *Rumex tianschanicus* A. Los.) is a plant with a high yield of above-ground biomass. Because of this, it is grown as energy crop, but in Ukraine it is also important forage crop. Mycobiota has not been examined, even though energy sorrel is grown in the Czech Republic experimentally since 1992 (in agricultural operations since 2001).

The aims of this thesis were: to determine the composition of mycobiota of healthy plants and of mycobiota associated with leaf and stem spots, to verify whether fungi isolated from spots can cause these spots and if previously isolated fungus *Phomopsis* sp. can cause spots.

Fungi were cultivated on 2% malt extract agar and then morphologically determined. From representative strains were isolated DNA and sequences of the ITS region were compared with the GenBank databases, this verified the morphological determination and the sterile species were determined.

In total 24 morphotypes of endophytic fungi were cultivated from healthy plants. The most common species were: *Clonostachys rosea* f. *rosea*, *Cladosporium cladosporioides*, *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus*, *Alternaria alternata* and *Acremonium strictum*. From the spots were isolated in total 29 morphotypes, the dominant species were: *A. strictum*, *Aureobasidium pullulans*, *C. cladosporioides*, *C. rosea* f. *rosea* and *Fusarium proliferatum*.

There were very small differences in the total species diversity of mycobiota between the healthy plants and the plants with spots, but the difference was in the overall frequency of individual species.

Antifungal effect of sorrel and mycoparasitic nature of some fungi can explain relatively small diversity of isolated species.

Key words:

energy sorrel, fungi, mycobiota, endophytes, spots, energy crops.

OBSAH

1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE.....	8
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	9
2.1 Šťovík krmný.....	9
2.2 Využití šťovíku v energetice a pícninářství.....	10
2.3 Škůdci a choroby šťovíku krmného.....	12
2.4 Interakce mandelinky ředkvičkové a hub na šťovíku.....	13
2.5 Houby šťovíku.....	14
2.6 Seznam použitých zkratk.....	19
3. MATERIÁL A METODY.....	20
3.1 Lokality.....	20
3.2 Odběry.....	23
3.3 Sterilizace a izolace vzorků.....	25
3.4 Určování izolovaných hub.....	26
3.5 Infekční pokus.....	27
3.6 Analýza dat.....	28
4. VÝSLEDKY.....	29
4.1 Houby šťovíku krmného.....	29
4.2 Endofytické houby šťovíku krmného.....	31
4.3 Mykobiota asociovaná se skvrnitostmi šťovíku krmného.....	33
4.4 Rozdíly ve složení mykobioty mezi rostlinnými orgány.....	35
4.5 Změny mykobioty v průběhu sezony.....	39
4.6 Srovnání druhového složení a četnosti jednotlivých druhů endofytické mykobioty a hub asociovaných se skvrnitostmi.....	42

4.7 Srovnání mykobioty lokalit.....	46
4.8 Infekční pokus.....	47
4.9 <i>Phomopsis</i> sp.	49
5. DISKUZE.....	50
5.1 Metodika.....	50
5.2 Antifungální účinky šťovíku.....	51
5.3 Druhová skladba mykobioty šťovíku krmného.....	52
5.4 Vyhodnocení infekčního pokusu.....	55
5.5 <i>Phomopsis</i> sp.	56
6. ZÁVĚR.....	57
7. LITERATURA.....	58

1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Šťovík krmný (*Rumex patientia* L. x *Rumex tianschanicus* A. Los.) je rostlina v České republice pěstovaná zejména pro energetické účely. Na východ od nás je však pěstována hlavně jako krmná plodina s velkými výnosy. Mykobiota šťovíku krmného ještě nebyla zkoumána. Není známo ani, které patogenní houby způsobují poškození této rostliny. Zmínky o škůdcích a chorobách jsou jen kusé a obvykle pouze v neoborném tisku, bez vědecky ověřených výsledků.

Tato diplomová práce se věnuje endofytické mykobiotě šťovíku krmného a houbám asociovaným se skvrnitostmi listů a stonků. Zahrnuty jsou pouze kultivovatelné druhy vláknitých hub. Z druhů hub izolovaných ze skvrnitostí byly vybrány houby, o nichž je známo, že jsou patogenní pro jiné rostliny a se třemi kmeny od každého takového druhu byl proveden infekční pokus na rostlinách vypěstovaných v nesterilních podmínkách s kontrolovanou teplotou a světlem.

Do infekčního pokusu byla zahrnuta i patogenní houba *Phomopsis* sp., která byla již dříve při pokusných odběrech (pokusné políčko ve VÚRV v.v.i. v Praze-Ruzyni) izolována z nekrotických skvrn stonku. Ze šťovíku je znám druh *Phomopsis durandiana*, který byl izolován z mrtvých stonků *Rumex acetosa* a *Rumex obtusifolius* (Ellis et Ellis, 1997).

Hlavní otázky, na které má tato práce odpovědět jsou:

- 1) Jaké je složení endofytické mykobioty šťovíku krmného?
- 2) Jaké je složení mykobioty přímo v nekrotických skvrnách na stonku a listu?
- 3) Způsobují houby izolované ze skvrn tyto skvrny?
- 4) Způsobuje *Phomopsis* sp. skvrnitosti stonku či listu u šťovíku?

Rostliny byly odebírány ze čtyř lokalit v ČR, dvě se nacházely v nížině a dvě ve vyšší nadmořské výšce. Porost šťovíku je na těchto polích již starší (asi sedmiletý) a rostliny jsou pěstovány pro využití v energetice. Proběhly celkem tři odběry během sezony, která je u tohoto šťovíku zhruba od dubna do začátku července. Všechny další práce probíhaly ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v.v.i. v Praze-Ruzyni.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Šťovík krmný

Rumex patientia L. x *Rumex tianschanicus* A. Los.

Rdesnovité (*Polygonaceae*)

Šťovík krmný je mohutná rostlina vypěstovaná na Ukrajině ze šťovíku zahradního (*R. patientia* L.- mateřská linie) a šťovíku ťanšanského (*R. tianschanicus* A. Los.– otcovská linie) jako nová krmná plodina. Dnes je pěstován také jako energetická rostlina zejména pro výrobu bioplynu a pelet pro spalování. V České republice se pěstuje odrůda Rumex OK-2, nazývaná také Uteuša podle šlechtitele prof. J. A. Uteuše, který společně s prof. D. Rachmetovem tento hybrid šťovíku vypěstoval (Petříková et al., 2006; Ust'ak, 2012).

Šťovík krmný dorůstá výšky 220-280 cm, průměr stonku 15 cm nad zemí je 1,5 – 2,4 cm, jedna rostlina vytváří 4-6 vegetativních výhonů. Spodní listy jsou dlouhé 45 – 60 cm, horní listy potom 28 - 30 cm, na šířku mají horní listy 9 – 12 cm. Kořeny jsou mohutné, rozvětvené a sahají 1,5 – 2 m do hloubky. Květenství je lata, dlouhé 90 – 130 cm. Plodem je trojboká nažka, hmotnost 1000 plodů je do 4,5 g a semen 2,8 – 3,3 g. Obrůstat začíná hned s táním sněhu (obvykle tedy už v březnu) (Petříková et al., 2006; Ust'ak, 2012).

Na jednom stanovišti vydrží 15 - 20 let. Nesnáší půdy s pH nižším než 5, půdy zamokřené, písčité a silně kamenité. Je tedy vhodný pro většinu typů zemědělských půd. Je odolný vůči vymrzání. Při pěstování je třeba zbavovat mladé porosty šťovíku plevelů, v dalších letech by již měl být schopen je potlačit sám. (Petříková et al., 2006; Ust'ak, 2012).

Časté jsou obavy, aby se ze šťovíku krmného nestala další invazní rostlina, jako argument ve prospěch šťovíku zde lze uvést, že nesnáší konkurenci jiných rostlin, není vhodný ani pro pěstování ve směsích a není schopen rozvíjet se samostatně v přírodních podmínkách (Petříková, 2003).

Pokusně začali s pěstováním šťovíku krmného i v Norsku již v roce 2006, kde však museli řešit problémy s vlivy odlišného klimatu a posunutým obdobím sklizně (srpen) než je běžné v České republice (Nielsen, 2008).

2.2 Využití šťovíku v energetice a píceinářství

Šťovík krmný byl na Ukrajině primárně vypěstován jako pícnina pro skot. Pro tyto účely se seče již koncem dubna a pak ještě několikrát během roku. V České republice je pěstován i pro energetické účely, pak je sklizen obvykle v polovině července již suchý – na rozdíl od jiných energetických plodin jej není třeba dosoušet. Odrůda Rumex OK 2 během registračních odrůdových zkoušek poskytla výnos 11,8 tun sušiny na hektar, stabilně pak dosahuje výnosu 8 – 12 tun sušiny/ha, nová odrůda Biekor pak dokonce dosáhla 12,9 tuny během těchto zkoušek (Petříková et al., 2006).

V současnosti se u nás šťovík pro energetické účely pěstuje zejména pro vlastní spotřebu, tedy spalování pelet či briket v domácích kotlích pro vytápění domů. Dále se využívá v lokálních bioplynových stanicích pro výrobu bioplynu. Pro stejné účely se u nás pěstuje i ozdobnice čínská (*Miscanthus sinensis*), která má vyšší výnosy, je ale náchylná k vymrzání a její sadba je také finančně náročná (Petříková, 2012).

Z dvouletého sledování krmení skotu vyplývá, že je šťovík krmný dobyt看 dobře přijímán asi proto, že má vysoký obsah cukrů. Dokonce se zvýšila doживost (o cca 2 litry na krávu) a zlepšila se i kvalita mléka – zvýšil se podíl tuků i proteinů v mléce (Petříková, 2012).

V Kazachstánu (Omarova et al., 1998) bylo zkoumáno chemické složení nadzemní části a kořene šťovíku odrůdy Rumex K-1 a jeho vhodnost pro případné medicínské využití. Nalezeny byly tyto chemické látky: karoteny, xantofyly, chlorofyly a a b, anthracenové deriváty, hypericin, antokyany, flavonoidy, taniny, organické kyseliny, kyselina askorbová, polysacharidy a lipidy. Pro obsah těchto látek doporučují tuto rostlinu i pro využití ve farmacii. Hypericin je fotosenzitivizující látka, což by dle mého názoru mohlo způsobovat problémy při větším zkrmování zvířaty.

Na tomto místě je třeba podotknout, že Hutla et al. (2005) pokusným porovnáním produkce emisí CO a NO_x jasně ukázali, že šťovík krmný z porovnávaných energetických rostlin vhodných pro pěstování v ČR (*Phalaris arundinacea*, *Reynoutria sachalinensis*, *Miscanthus sinensis* a pšeničná sláma) produkuje největší množství emisí CO. Množství CO produkovaného šťovíkem přesáhlo 4,5krát limit vycházející z usnesení vlády České republiky. Jako řešení této situace doporučují spalování šťovíku společně s obilnou slámou.

Díky svým do hloubky rostoucím a větvičím se kořenům se šťovík hodí jako opatření proti erozi. Mohly by z něj být vytvořeny protierozní pásy nebo by mohl být pěstován na svažitéch pozemcích, kde by měla voda možnost se vsáknout (Honsová, 2012).

Zkoumána byla také možnost využití šťovíku krmného odrůdy K-1 ve fytořemediaci (Zhuang et al., 2007; Zhuang et al., 2005), konkrétně schopnost extrahovat Cd, Pb a Zn z půdy. Šťovík K-1 však nevykazoval schopnost akumulovat dostatečné množství ani jednoho z uvedených kovů.



Obr. 1: Šťovík krmný před sklizní (foto David Novotný, 2007)

2.3 Škůdci a choroby šťovíku krmného

Jako hlavní škůdci jsou na šťovíku krmném uváděni zlatohlávek, dřepčik (druhy neupřesněny) (Petříková et. al., 2006) a mandelinka ředkvičková (*Gastrophysa viridula*) (Ust'ak, 2012).

O houbových chorobách je uváděno pouze to, že ve vlhkých letech bývají listy napadány antraknózou (původce není uváděn). Sporadicky se začátkem července může vyskytnout cercosporióza (původce není uváděn) (Ust'ak, 2012).

V jižní části České republiky byl zaznamenán výskyt viru PVX (potato virus X) na šťovíku, což by mohlo způsobit problémy při ochraně brambor. Dosud byl výskyt tohoto viru u brambor úspěšně kontrolován zejména vhodným střídáním plodin na polích, bylo by tedy zapotřebí upravit osevní plán tak, aby nebyl šťovík a brambory pěstovány na stejném pozemku po sobě (Petřík, 2009).

Šťovík krmný nebyl jinak systematicky zkoumán, co se výskytu chorob týče, ani u nás, ani ve světě.

2.4 Interakce mandelinky ředkvičkové a hub na šťovíku

Jak bylo řečeno výše mandelinka ředkvičková (*Gastrophysa viridula*) je častým škůdcem šťovíku krmného (Ust'ak, 2012). U jiných druhů šťovíku byl zkoumán vliv mandelinky ředkvičkové na růst šťovíků, ale i její interakce s houbovými patogeny a možnost využití mandelinky a těchto patogenů při biologickém boji s invazními nebo přemnoženými druhy šťovíku. Tento vztah by mohl mít význam i při pěstování šťovíku krmného.

Hatcher et al. (1994) sledovali vliv současné infekce rzi *Uromyces rumicis* a požerkem mandelinkou na vývoj a růst 2 druhů šťovíků. U šťovíků *Rumex obtusifolius* a *R. crispus* se vlivem působení rzi a následným požerkem mandelinky zvýšil negativní dopad na růst. Společný negativní vliv na obrůstání semenáčků po zimě a na podzimní růst byl pak potvrzen (Hatcher, 1996), byl pozorován i nepříznivý vliv na kvalitu a velikost kořenů. Z těchto důvodů je zkoumána možnost využití infekce *U. rumicis* a *G. viridula* při biologickém boji se šťovíky, toto využití je však problematické jak pro obtížné uvádění do praxe tak proto, že mandelinka napadá a působí značné ztráty i na zemědělských plodinách a okrasných rostlinách (Martinková et Honěk, 2004).

Požerem mandelinkou ředkvičkovou snižuje infekci *R. obtusifolius* houbovými patogeny – *Uromyces rumicis*, *Venturia rumicis* a *Ramularia rubella*. Navozená rezistence vůči těmto patogenům je zřejmě systémová (alespoň u *U. rumicis* a *V. rumicis*) a mohla by být navozena takovými látkami, jako jsou kyselina jasmonová a salicylová. Naproti tomu nákaza jedním z těchto patogenů zvyšovala pravděpodobnost a rozsah infekce druhým patogenem (Hatcher et Paul, 2000).



Obr. 2: Mandelinka ředkvičková (*Gastrophysa viridula*). (Foto: Miroslav Fiala, 2009)

2.5 Houby šťovíků

Jak bylo řečeno výše, nebyl šťovík krmný zkoumán na výskyt hub, můžeme však očekávat, že složení jeho mykobioty se alespoň částečně překrývá s jinými druhy šťovíků. V tabulce č. 1 jsou uvedeny jak patogenní tak saprotrofní houby.

Tab. 1: Patogenní a saprotrofní houby šťovíků

Jméno houby	Systematické zařazení	Patogen/saprofyt	Napadená část	Hostitelské druhy	Literatura
<i>Ascochyta foliicola</i>	Pleosporales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Ascochyta rumicis-patientiae</i>	Pleosporales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Chalara urceolata</i>	Incertae sedis	Saprofyt	stonek	----	Ellis et Ellis, 1997
<i>Crocicreas cyathoideum</i> var. <i>cacaliae</i>	Helotiales	Saprofyt	stonek	<i>R. acetosa</i>	Ellis et Ellis, 1997
<i>Dasyscyphus sulphureus</i> = <i>Belonidium sulphureum</i>	Helotiales	Saprofyt	stonek	----	Ellis et Ellis, 1997
<i>Dendryphiella vinosa</i>	Pleosporales	Saprofyt	stonek	----	Ellis et Ellis, 1997
<i>Diaporthe pardalota</i>	Diaporthales	Saprofyt	stonek	----	Ellis et Ellis, 1997
<i>Erysiphe polygoni</i> = <i>E. betae</i>	Erysiphales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Helotium consobrinum</i> = <i>Hymenoscyphus consobrinus</i>	Helotiales	Saprofyt	stonek	nejčastěji na <i>R. acetosella</i> a <i>R. conglomeratus</i>	Ellis et Ellis, 1997
<i>Hymenoscyphus rumicis</i>	Helotiales	Saprofyt	plody	<i>R. acetosa</i>	Ellis et Ellis, 1997
<i>Hymenoscyphus scutula</i>	Helotiales	Saprofyt	stonek	----	Ellis et Ellis, 1997
<i>Keissleriella gallica</i>	Pleosporales	Saprofyt	stonek	<i>R. acetosa</i>	Ellis et Ellis, 1997
<i>Leptosphaeria macrospora</i> = <i>Paraleptosphaeria macrospora</i>	Pleosporales	Saprofyt	stonek	----	Ellis et Ellis, 1997
<i>Leptosphaeria ogilviensis</i>	Pleosporales	Saprofyt	stonek	----	Ellis et Ellis, 1997
<i>Leveillula</i> sp.	Erysiphales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Mollisia polygoni</i> = <i>Pyrenopeziza polygoni</i>	Helotiales	Saprofyt	stonek	<i>R. acetosella</i>	Ellis et Ellis, 1997
<i>Ovularia canegrícola</i>	Capnodiales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Ovularia obliqua</i>	Capnodiales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985

<i>Peronospora rumicis</i>	Peronosporales	Patogen	listy	<i>R. acetosa</i> , <i>R. acetosella</i>	Ellis et Ellis, 1997; Brandenburger, 1985
<i>Phomopsis durandiana</i>	Diaporthales	Saprofyt	stonek	<i>R. acetosa</i> , <i>R. obtusifolius</i>	Ellis et Ellis, 1997
<i>Phyllosticta acetosae</i>	Botryosphaeriales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Phyllosticta acetosellae</i> = <i>Phoma acetosellae</i>	Botryosphaeriales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Phyllosticta rumicis</i>	Botryosphaeriales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Physoderma majus</i>	Blastocladales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Plagiostoma devexum</i>	Diaporthales	Saprofyt	stonek	<i>R. obtusifolius</i>	Ellis et Ellis, 1997
<i>Puccinia acetosae</i>	Pucciniales	Patogen	listy	<i>R. acetosa</i> , <i>R. acetosella</i>	Ellis et Ellis, 1997; Brandenburger, 1985
<i>Puccinia biformis</i>	Pucciniales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Puccinia ornata</i>	Pucciniales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Puccinia pachyphloea</i>	Pucciniales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Puccinia pedunculata</i>	Pucciniales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Puccinia phragmitis</i>	Pucciniales	Patogen	listy	<i>R. acetosa</i> , <i>R. conglomeratus</i> , <i>R. crispus</i> , <i>R. hydrolapathum</i> , <i>R. obtusifolius</i>	Ellis et Ellis, 1997; Brandenburger, 1985
<i>Puccinia rumicicola</i>	Pucciniales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Ramularia bulgarica</i>	Capnodiales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Ramularia circumfusa</i>	Capnodiales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Ramularia decipiens</i>	Capnodiales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Ramularia pratensis</i>	Capnodiales	Patogen	listy	<i>R. acetosa</i> , <i>R.</i> <i>acetosella</i> , <i>R.</i> <i>hydrolapathum</i>	Ellis et Ellis, 1997; Brandenburger, 1985
<i>Ramularia rubella</i>	Capnodiales	Patogen	listy	<i>R. acetosa</i> , <i>R.</i> <i>conglomeratus</i> , <i>R.</i> <i>crispus</i> , <i>R.</i> <i>obtusifolius</i>	Ellis et Ellis, 1997
<i>Ramularia rumicis</i>	Capnodiales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Ramularia rumicis-crispi</i>	Capnodiales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Ramularia rumicis-scutati</i>	Capnodiales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985

<i>Rhizoctonia crocorum</i> = <i>Helicobasidium purpureum</i>	Cantharellales	Patogen	kořeny	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Sclerotinia fuckeliana</i> = <i>Botryotinia fuckeliana</i>	Helotiales	Saprofyt	stonek	----	Ellis et Ellis, 1997
<i>Septoria rumicis</i>	Capnodiales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Sphaeropsis</i> sp.	Botryosphaeriales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Synchytrium anomalum</i>	Chytridiales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Torula herbarum</i>	Incertae sedis	Saprofyt	stonek	----	Ellis et Ellis, 1997
<i>Uromyces acetosae</i>	Pucciniales	Patogen	listy	<i>R. acetosa</i> , <i>R. acetosella</i>	Ellis et Ellis, 1997; Brandenburger, 1985
<i>Uromyces alpinus</i>	Pucciniales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Uromyces polygoni-aviculariae</i>	Pucciniales	Patogen	listy	<i>R. acetosella</i>	Ellis et Ellis, 1997; Brandenburger, 1985
<i>Uromyces rumicis</i>	Pucciniales	Patogen	listy	<i>R. conglomeratus</i> , <i>R. crispus</i> , <i>R. hydrolapathum</i> , <i>R. obtusifolius</i> , <i>R. maritimus</i> , <i>R. sanguineus</i> , <i>R. pulcher</i>	Ellis et Ellis, 1997; Brandenburger, 1985; Silva et al. 1997
<i>Uromyces tingitanus</i>	Pucciniales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Urophlyctis ruebsaameni</i>	Blastocladales	Patogen	kořeny	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Urophlyctis</i> sp. = <i>Physoderma</i> sp.	Blastocladales	Patogen	květy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Ustilago goeppertiana</i> = <i>Microbotryum goeppertianum</i>	Ustilaginales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Ustilago kuehneana</i>	Ustilaginales	Patogen	semeník, prašníky, stonek, list	<i>R. acetosa</i> , <i>R. acetosella</i> , <i>R. crispus</i>	Ellis et Ellis, 1997; Brandenburger, 1985
<i>Ustilago parlatoresi</i> = <i>Microbotryum parlatoresi</i>	Ustilaginales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Ustilago stygia</i> = <i>Microbotryum</i> <i>stygium</i>	Ustilaginales	Patogen	květy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Ustilago warmingii</i> = <i>Microbotryum warmingii</i>	Ustilaginales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Venturia rumicis</i>	Pleosporales	Patogen	listy	<i>R. acetosa</i> , <i>R. acetosella</i> , <i>R. crispus</i> , <i>R. obtusifolius</i>	Ellis et Ellis, 1997; Brandenburger, 1985

Eriksen et al. (2002) uvádí, že *R. longifolius* vytváří arbuskulární mykorhizu, i když ji našli jen v malém počtu pozorovaných vzorků kořenů. Hyfy sledovali i uvnitř kořenů *R. acetosella*, ale nenašli žádné arbuskuly ani vesikuly.

U extraktů z několika druhů šťovíků byla také zkoumána jejich schopnost potlačovat některé patogenní houby, zejména patogeny kulturních plodin. Růst a sporulaci *in vitro* u hub *Fusarium solani* a *Drechslera biseptata* omezil či zastavil extrakt *R. vesicarius* (Abu-Taleb et al., 2011). Jako velmi účinný se ukázal při pokusech také extrakt *R. crispus* proti závažnému patogenu ječmene – *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* a dále proti houbě *Sphaerotheca fuliginea* - patogenu okurek (Kim et al., 2004). Takovéto extrakty by byly vhodnou alternativou syntetickým fungicidům a mohly by být využívány v integrované ochraně zemědělských plodin.

Máme-li mluvit o endofytech je potřeba si tento pojem vymežit, existuje totiž několik definic endofytismu. Podle původní definice De Baryho (1866, podle Petrini, 1986) jde prostě o organismus žijící uvnitř tkání hostitele (jako protiklad epifytů, žijících na povrchu). Toto vymezení však bylo nedostatečné. Carroll (1986) z endofytů vylučuje mykorhizní houby a potenciální patogeny a další houby, které mohou růst i vně svého hostitele. V současnosti však chápeme endofyty podle definice Petriniho (1991), která je pro praxi asi nejlépe uchopitelná. Endofytem je každá houba, která tráví alespoň část svého životního cyklu uvnitř tkání svého hostitele bez vnějších projevů choroby. Latentní patogeny, saprofyty i epifyty, všechny mohou být v některé části svého života endofyty.

Petriniho definici (Petrini, 1991) odpovídá také metodika izolace endofytů. Část rostliny, z které chceme endofyty izolovat povrchově sterilizujeme a umístíme na živné médium. Každá houba, která pak ze vzorku vyroste je považována za endofyt. Tohoto postupu a definice se drží i tato práce.

Na základě Petriniho definice, také můžeme předpokládat, že mnohé z výše uvedených patogenů a saprofytů jsou v části svého životního cyklu i endofyty.

Proč bychom se však měli zajímat o endofyty zemědělských plodin? Asi nejdůležitější význam endofytů pro zemědělství je, že některé endofyty mohou fungovat jako antagonisté houbových patogenů a navozovat rezistenci vůči herbivorům (Cheplick et Clay, 1988; Matta, 1971 a Kuč et Hammerschmidt, 1978; podle Carroll, 1986). Zároveň, jak bylo zmíněno výše, jsou některé endofyty v jiné části životního cyklu patogeny, rostliny s takovým endofytem pak mohou fungovat jako rezervoár těchto hub.

Endofyty u šťovíků obecně nebyly moc zkoumány. U *R. acetosa* byly jako nejčastější endofyty kořene v zimě zjištěny žlutě zbarvené druhy kvasinek, a v listech *Penicillium* sp.

V létě potom v listech dominovalo *Septofusidium elegantulum* a v kořenech *Cylindrocarpon* sp. V obou částech rostliny se pak objevovalo *Cladosporium* sp. a *Alternaria* sp. Dále bylo z kořene izolováno *Helicosporium phragmitis* známé dříve jen z lipnicovitých (Poaceae), pak několik zástupců řádu Mucorales (*Absidia*, *Mucor*, *Zygorhynchus*), ve studii bohužel chybí celkový soupis identifikovaných endofytů. Celkově však *R. acetosa* hostil menší spektrum druhů než druhé dvě rostliny, s nimiž byl porovnáván, tedy *Cirsium arvense* a *Plantago lanceolata*. Tento závěr je vysvětlován antifungálním účinkem některých chemických složek šťovíku (Wearn et al., 2012).

2.6 Seznam použitých zkratk

ITS	anglicky <i>internal transcribed spacer</i> , mezerník mezi sekvencí malé a velké ribozomální podjednotky
f.	latinsky <i>forma</i> , forma druhu
var.	latinsky <i>varietas</i> , varieta druhu
f. sp.	latinsky <i>forma specialis</i> , obvykle označení pro druh parazita specializovaný na určitého hostitele
sp.	latinsky <i>species</i> , označení druhu určitého rodu

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Lokality

Vzorky šťovíku byly odebrány ze čtyř lokalit. Dvě lokality se nachází ve vyšší nadmořské výšce – u obcí Pohoří (okres Klatovy; střed pole GPS: N 49°25.46252', E 13°31.71915' a asi 660 m n.m.) a Štipoklasy (okres Klatovy; GPS: N 49°24.86097', E 13°32.01385' a asi 640 m n.m.) a dvě lokality v nížině – u obcí Lubník (okres Ústí nad Orlicí; GPS: N 49°53.14423', E 16°39.30535' a asi 370 m n.m.) a Kněžice (okres Nymburk; GPS: N 50°15.51555', E 15°18.64093' a asi 220 m n.m.). Na všech těchto lokalitách byl šťovík krmný pěstován již asi 7 let, jedná se tedy o starší zavedený porost.

Na těchto lokalitách byl proveden agrochemický rozbor půd dle Mehlicha 3. Výsledky rozborů jsou uvedeny v tabulce 2 a 3. Jak je vidět z výsledků, lokality se liší zejména v obsahu přijatelných živin, což může mít vliv na vitalitu rostlin na daném místě.

Tab.2: Výsledky agrochemického rozboru půd

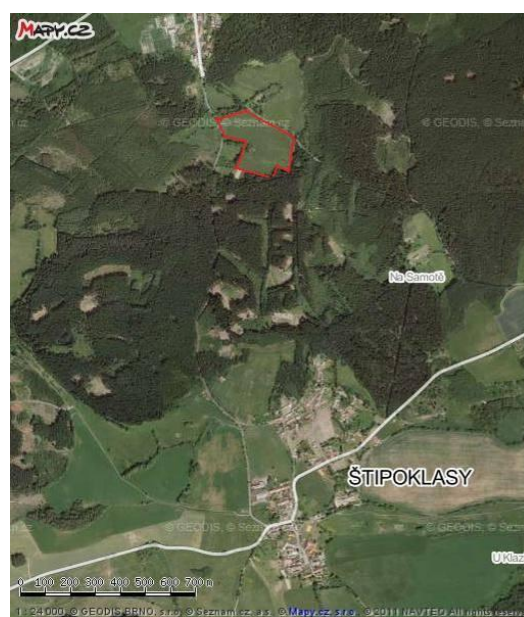
	Půdní reakce	Půdní reakce	Sušina	Obsah přijatelných živin mg/kg půdy v sušině			
Lokalita	pH/KCl	pH/H ₂ O	%	P	K	Ca	Mg
Pohoří	4,40	5,42	97,95	105	192	1054	108
Štipoklasy	5,70	6,52	98,13	224	805	1823	198
Lubník	5,77	6,80	97,96	53,2	117	2566	160
Kněžice	6,14	7,18	96,09	46,8	402	5637	348

Tab. 3: Výsledky agrochemického rozboru půd

	Cox	Humus	Nt	Potřeba vápnění
Lokalita	% sušiny	% sušiny	% sušiny	CaO q/ha
Pohoří	2,03	3,50	0,177	31,50
Štipoklasy	2,50	4,31	0,214	10,10
Lubník	1,65	2,84	0,142	8,00
Kněžice	3,42	5,90	0,260	5,50



Obr. 3: Poloha lokalit v ČR (mapa - www.gozgastro.cz, 2013).



Obr. 4 a 5: Poloha lokalit: červeně je vyznačena lokalita se šťovíkem, na obr. 4 – u obce Pohoří, na obr. 5 – u obce Štipoklasy. (mapa – www.seznam.cz, 2013)



6.



7.

Obr. 6 a 7: Poloha lokalit: červeně je vyznačena lokalita se št'ovíkem, na obr. 6 – u obce Lubník, na obr. 7 – u obce Kněžice. (mapa – www.seznam.cz, 2013)

3.2 Odběry

V sezóně roku 2011 proběhly tři odběry z každé lokality, první na přelomu dubna a května, druhý na přelomu května a června a třetí na konci června před zaschnutím šťovíku.

Při každém odběru bylo sebráno 20 náhodně vybraných zdravých (tj. bez skvrnitostí listu či stonku, bez hnilob) rostlin i s kořenem pro izolaci endofytických hub, z odběru byly vyřazeny i rostliny napadené mandelinkou ředkvičkovou. Pokud se vyskytovaly rostliny se skvrnitostmi listu či stonku, bylo odebráno 20 postižených listů či stonků (nebo obojí) pro izolaci hub asociovaných se skvrnitostmi.

Celkem bylo ze čtyř lokalit odebráno 240 zdravých rostlin šťovíku. Z každé této rostliny byly odebrány vzorky z vegetativních orgánů – kořene, stonku a listu. Z jedné rostliny tak byly založeny celkem 3 Petriho misky, z nichž na každé bylo 5 segmentů daného rostlinného orgánu. Z celkového počtu 240 rostlin, tak bylo založeno 720 primárních misek, na nichž bylo 3600 segmentů.

Vzorky se skvrnitostmi byly odebírány dle možností – výskytu skvrn. Při posledním odběru už nebylo možné na dvou lokalitách (Pohoří a Štipoklasy) odebrat listy se skvrnitostí, protože takto poškozené rostliny zasychaly dříve než ty zdravé. Zaschlé listy nebyly odebírány. Při prvním odběru ještě nebyly skvrnitosti úplně rozvinuté, takže nebyl odebrán celý počet 20 vzorků.

Celkem bylo odebráno 171 stonků a 169 listů se skvrnitostmi. V tabulce č. 4 je přehled odebraných vzorků. Celkem bylo založeno 340 primárních misek se 1700 segmenty ze skvrn (855 segmentů skvrn stonku a 845 listu).

Tab. 4: Přehled odebraných vzorků.

odběr	1.		2.		3.		Celkem	
	stonek	list	stonek	list	stonek	list	stonek	list
Lubník	0	0	20	20	20	20	40	40
Kněžice	6	14	20	20	20	20	46	54
Štipoklasy	2	18	20	20	20	0	42	38
Pohoří	3	17	20	20	20	0	43	37



Obr. 8: Skvrnitost listu (foto Hana Jand'ourková)



Obr. 9: Skvrnitost stonku (foto Hana Jand'ourková)

3.3 Sterilizace a izolace vzorků

Endofyty byly izolovány z kořene, stonku i listu zdravých rostlin, každá tato část byla povrchově sterilizována 15 s v 70% ethanolu, 1 min. v 100% NaClO (obsah volného chloru 11%; od firmy Penta) a 15 s v 70% ethanolu. Následně byly vzorky sterilně rozřezány na segmenty o velikosti cca 0,5 x 0,5 cm (x 0,5 cm v případě stonku a kořene) a umístěny po pěti na Petriho misky o průměru 9 cm s 2% sladinovým agarem (2% MA; agar od firmy Dr. Kulich Pharma s.r.o., Hradec Králové; sladinový extrakt od firmy Hefe Schweiz AG pod obchodním názvem DiaMalt) a chloramphenicolem (5mg/l). Vzorky byly inkubovány při 25⁰C a světelném režimu 12h světlo/12h tma.

Houby asociované se skvrnitostmi byly izolovány z napadených listů a stonků, každá tato část byla sterilizována 15 s v 70% ethanolu, 30 s v 100% NaClO a 15 s v 70% ethanolu. Další postup byl stejný jako u vzorků ze zdravých rostlin.

3.4 Určování izolovaných hub

Narostlé kolonie ze vzorků kořenů, stonků a listů byly nejprve rozřazeny do morfotypů dle morfologických znaků makroskopických i mikroskopických. Pak byly sporulující houby určovány podle makroskopických i mikroskopických znaků. Z morfotypů byl vybrán vždy jeden reprezentativní izolát, z něž byla izolována DNA a z ní byl osekvenován úsek ITS, tak bylo určení hub ověřeno i molekulárně-geneticky.

DNA byla izolována komerční sadou Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc.), s využitím přístrojů Vortex – Genie 2 (MoBio Laboratories, Inc.), Dry Block Heating Thermostat (Bio TDB-100, Biosan) a centrifugy Mikro 200 (Hettich Zentrifugen). Obsah DNA byl pak ověřen gelovou elektroforézou (gel pro elektroforézu – 1% agaróza, SeaKem LE Agarose, Cambrex). Z ribozomální DNA pak byla amplifikována oblast ITS (ITS1-ITS2) s využitím primerů ITS1 a ITS4. Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce č. 5.

Tab. 5: Složení reakční směsi pro PCR, celkový objem 25 μ l.

Reagencie	Objem v μ l
H ₂ O pro PCR	19,1
PCR pufr (10x)	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	1,5
Primer ITS1 (100 μ M)	0,25
Primer ITS4 (100 μ M)	0,25
Směs dNTP (25 mM)	0,2
Taq DNA polymeráza (5 U/ μ l)	0,2
DNA	1

Tab. 6: Sekvence použitých primerů.

ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Amplifikace samotná pak byla provedena v termocykleru Gradient Cycler (PTC-200 Peltier Thermal Cycler). Pro přečištění získaných vzorků byly použity sady QIAquick Gel Extraction Kit firmy Qiagen a QIAquick PCR Purification Kit, dle doporučeného postupu. Gel pro přečištění byl 1,5% agaróza.

Sekvenaci provedla laboratoř sekvenace DNA Přírodovědecké fakulty UK v Praze. Získané sekvence byly porovnány s databází GenBank s využitím algoritmu BLAST.

3.5 Infekční pokus

Z hub asociovaných se skvrnitostmi byly vybrány druhy potenciálně patogenní (tedy ty druhy, o nichž je známo, že mohou u různých druhů rostlin způsobovat choroby) pro infekční pokusy. V nesterilních laboratorních podmínkách (směs nesterilní půdy 1:1 – substrát pro pokojové rostliny a rašelina od firmy Agro; květináče; komora s řízenou teplotou – 25⁰C den a 16⁰C noc; světelný režim: 14h den/10noc; zálivka dle potřeby) byly vypěstovány rostliny šťovíku ze semen. Ty byly postříkem infikovány roztokem spor a rozdrčeného mycelia vybraných hub, od každého druhu houby tři životaschopné kmeny, koncentrace v roztoku byla asi 10⁴ spor/ml. Celkový objem roztoku asi 50 ml od každého kmenu, do každého roztoku byla jako smáčedlo přidána jedna kapka Tween 20. Každým kmenem byly infikovány 4 rostliny, u jednoho listu každé rostliny byla jemně skalpelem narušena povrchová vrstva, což simulovalo běžné mechanické poškození a vstupní bránu pro infekce. Jako kontrola byly ponechány ve stejných podmínkách 4 rostliny bez infekce, dále 4 rostliny postříkané vodou a 4 rostliny s jedním listem poškozeným a postříkané vodou. Po postříku byly rostliny na dva dny zakryty igelitovými sáčky, dokud roztok dostatečně nezaschl. Následně byly rostliny tři týdny inkubovány a vždy po týdnu kontrolovány na výskyt skvrnitostí.



Obr. 10: Rostliny šťovíku po postříku roztokem spor překryté igelitovými sáčky (foto Hana Jand'ourková).

3.6 Analýza dat

Pro porovnání četnosti jednotlivých druhů jsem použila počet rostlinných orgánů, tedy vzorků, kolonizovaných danou houbou. Po vydělení tohoto čísla celkovým počtem odebraných vzorků rostlinných orgánů jsem dostala relativní četnost tohoto druhu. Pro větší názornost jsem ji pak prostým vynásobením 100 převedla na procenta. Je nutno uvést, že z jednoho vzorku může vyrůst více různých hub, takže součet procent četnosti nám nedá 100. Navíc mnoho vzorků zůstalo sterilních, takže není možno prostým součtem dojít k počtu 100%.

Jak bylo uvedeno výše v metodice, jeden vzorek rostlinného orgánu byl vždy rozřezán na pět částí, v několika tabulkách je uvedena četnost hub i vzhledem k počtu kolonizovaných segmentů. Relativní četnost kolonizovaných segmentů byla vypočítána podle stejného postupu jako u vzorků.

Při tvorbě grafů se srovnáním četností jsem použila opět relativní četnost druhů vztaženou k počtu odebraných vzorků rostlinných orgánů v daném odběru.

4. VÝSLEDKY

4.1 Houby št'ovíku krmného

Izolované houby z části určené morfologicky a z části molekulárně jsou uvedeny v tabulkách č. 7 a 8. Několik morfotypů se nepodařilo určit (v kultuře zůstaly sterilní) ani s použitím databáze GenBank, kde byla daná sekvence identifikována pouze jako Uncultured fungus. Tyto morfotypy jsou označeny jako *Mycelium sterilium* a římskou číslicí. Taxonomické zařazení je podle MycoBank a Index Fungorum.

Tab. 7: Endofytické houby izolované ze zdravých rostlin.

Taxon	Čeleď	Řád	Třída	Oddělení
<i>Rhizopus arrhizus</i> var. <i>arrhizus</i>	Rhizopodaceae	Mucorales	Incertae sedis	Zygomycota
<i>Botrytis cinerea</i>	Sclerotiniaceae	Helotiales	Leotiomycetes	Ascomycota
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	Eurotiomycetes	
<i>Aspergillus versicolor</i>				
<i>Penicillium</i> sp. (snad <i>brasiliense</i>)				
<i>Penicillium</i> sp. 2				
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Davidiellaceae	Capnodiales	Dothideomycetes	
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Dothioraceae	Dothideales		
<i>Epicoccum nigrum</i>	Pleosporaceae	Pleosporales		
<i>Alternaria alternata</i>				
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>rosea</i>	Bionectriaceae	Hypocreales	Sordariomycetes	
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i>				
<i>Fusarium proliferatum</i>	Nectriaceae			
<i>Fusarium oxysporum</i>	Incertae sedis			
<i>Acremonium strictum</i> typ 1				
<i>Acremonium strictum</i> typ 2				
<i>Acremonium</i> sp.				
<i>Acremonium</i> - like	Plectosphaerellaceae	Incertae sedis		
<i>Verticillium dahliae</i>				
<i>Mycelium sterilium</i> I	Incertae sedis	Incertae sedis	Incertae sedis	Incertae sedis
<i>Mycelium sterilium</i> III				
<i>Mycelium sterilium</i> V				
<i>Mycelium sterilium</i> VI				
<i>Mycelium sterilium</i> VII				

Tab. 8: Houby izolované ze skvrnitostí.

Taxon	Čeleď	Řád	Třída	Oddělení
<i>Rhizopus arrhizus</i> var. <i>arrhizus</i>	Rhizopodaceae	Mucorales	Incertae sedis	Zygomycota
<i>Botrytis cinerea</i>	Sclerotiniaceae	Helotiales	Leotiomycetes	Ascomycota
<i>Aspergillus versicolor</i>	Trichocomaceae	Eurotiales	Eurotiomycetes	
<i>Aspergillus</i> sp. 1				
<i>Aspergillus</i> sp. 2				
<i>Penicillium</i> sp. 2				
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Davidiellaceae	Capnodiales	Dothideomycetes	
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Dothioraceae	Dothideales		
<i>Epicoccum nigrum</i>	Pleosporaceae	Pleosporales		
<i>Alternaria alternata</i>				
<i>Phomopsis</i> sp.	Diaporthaceae	Diaporthales	Sordariomycetes	
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>rosea</i>	Bionectriaceae	Hypocreales		
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i>				
<i>Fusarium proliferatum</i>	Nectriaceae			
<i>Fusarium oxysporum</i>				
<i>Fusarium</i> sp.				
<i>Acrostalagmus luteoalbus</i>	Hypocreaceae			
<i>Acremonium strictum</i> typ 1	Incertae sedis			
<i>Acremonium strictum</i> typ 2				
<i>Acremonium</i> sp.				
<i>Acremonium</i> - like				
<i>Verticillium dahliae</i>	Plectosphaerellaceae		Incertae sedis	
<i>Mycelium sterilium</i> I	Incertae sedis	Incertae sedis	Incertae sedis	Incertae sedis
<i>Mycelium sterilium</i> II				
<i>Mycelium sterilium</i> III				
<i>Mycelium sterilium</i> IV				
<i>Mycelium sterilium</i> V				
<i>Mycelium sterilium</i> VI				
<i>Mycelium sterilium</i> VII				

4.2 Endofytické houby šťovíku krmného

V tabulce č. 9 je soupis izolovaných hub s počty, v jakých se vyskytovaly na rostlinném orgánu – vzorku rostliny (celkový počet 720) a na jednotlivých segmentech na Petriho miskách (celkový počet 3600). Z jednoho rostlinného orgánu samozřejmě často vyrostlo několik různých druhů hub. Mnoho segmentů zůstalo sterilních nebo z nich vyrostly kvasinky, které však nebyly určovány a byl zaznamenán jen jejich výskyt, stejně jako byl zaznamenán počet sterilních segmentů. Není uveden celkový počet a procento kolonizovaných rostlinných orgánů, protože prostý součet procent by byl vyšší než 100. Zatím nejsou rozlišeny jednotlivé orgány rostliny a četnost hub se týká celkové mykobioty zdravé rostliny.

Vůbec nejčastější endofytickou houbou izolovanou ze šťovíku krmného byla *Clonostachys rosea* f. *rosea*, vyskytovala se na více než 13% rostlinných orgánů a 8,5% segmentů rostlin. Druhé nejčastější bylo *Cladosporium cladosporioides* (10% a 6,7%). Žádná z dalších hub nepřesáhla 10% kolonizovaných rostlinných orgánů a 5% kolonizovaných segmentů. Zato mnoho hub bylo na méně než 1% rostlinných orgánů (tedy na méně než 5 různých vzorcích) - *Fusarium proliferatum*, *Aureobasidium pullulans*, *Fusarium oxysporum*, *Mycelium sterillum* VII, *Penicillium* sp. 2, *Botrytis cinerea*, *Mycelium sterillum* V.

Ve výsledcích je také uvedeno *Acremonium strictum* typ 1 a typ 2, při morfologickém určení byl tento druh rozčleněn do dvou skupin mírně se lišících ve vzhledu kolonie na misce i ve velikosti konidií, které byly u typu 1 menší. Při molekulární analýze byly tyto dva typy sloučeny v jeden druh, já jsem se však ve většině případů, pro uvedené drobné morfologické rozdíly, rozhodla zachovat dělení do dvou typů

Tab. 9: Druhy endofytických hub izolovaných ze zdravých rostlin šťovíku. Počty hub vztahované k počtu rostlinných orgánů a segmentů, z nichž byly izolovány.

Endofyty	Počet kolonizovaných:		% kolonizovaných	
	rost. orgánů	segmentů	rost. orgánů	segmentů
<i>Clonostachys rosea f. rosea</i>	96	309	13,33%	8,58%
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	72	242	10,00%	6,72%
<i>Rhizopus arrhizus var. arrhizus</i>	56	142	7,78%	3,94%
<i>Alternaria alternata</i>	47	169	6,53%	4,69%
<i>Acremonium strictum</i> typ 1	46	163	6,39%	4,53%
<i>Penicillium</i> sp. (snad <i>brasiliense</i>)	42	102	5,83%	2,83%
<i>Epicoccum nigrum</i>	42	108	5,83%	3,00%
<i>Aspergillus fumigatus</i>	30	89	4,17%	2,47%
<i>Mycelium sterilius</i> III	27	64	3,75%	1,78%
<i>Acremonium</i> - like	27	78	3,75%	2,17%
<i>Aspergillus versicolor</i>	25	75	3,47%	2,08%
<i>Acremonium strictum</i> typ 2	22	77	3,06%	2,14%
<i>Clonostachys rosea f. catenulata</i>	16	47	2,22%	1,31%
<i>Verticillium dahliae</i>	12	37	1,67%	1,03%
<i>Mycelium sterilius</i> I	12	30	1,67%	0,83%
<i>Acremonium</i> sp.	11	23	1,53%	0,64%
<i>Mycelium sterilius</i> VI	9	34	1,25%	0,94%
<i>Fusarium proliferatum</i>	5	21	0,69%	0,58%
<i>Aureobasidium pullulans</i>	4	5	0,56%	0,14%
<i>Fusarium oxysporum</i>	3	13	0,42%	0,36%
<i>Mycelium sterilius</i> VII	3	9	0,42%	0,25%
<i>Penicillium</i> sp. 2	3	15	0,42%	0,42%
<i>Botrytis cinerea</i>	2	2	0,28%	0,06%
<i>Mycelium sterilius</i> V	1	5	0,14%	0,14%
Celkem kolonizováno	---	1859	---	51,64%
Celkový počet rost.org./segmentů	720	3600	100,00%	100,00%

4.3 Mykobiota asociovaná se skvrnitostmi šťovíku krmného

Celkem bylo odebráno 340 vzorků rostlin se skvrnitostmi (169 listů, 171 stonků). V tabulce č. 10 je přehled výsledků opět vztažený k počtu rostlinných orgánů, z nichž byly houby izolovány a k počtu segmentů (tedy vlastně jednotlivých skvrn). Opět nejsou rozlišeny orgány rostliny, ale jedná se o celkovou mykobiotu skvrnitostí.

Z výsledků je vidět, že druhové složení se příliš neliší od endofytické mykobioty. Ve skvnách bylo vůbec nejčastějším druhem *Acremonium strictum* typ 1, které se vyskytovalo na více než 18% vzorků (respektive téměř 14% všech odebraných segmentů, tedy skvrn). Dalšími četnými druhy jsou *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Acremonium strictum* typ 2 a konečně *Clonostachys rosea* f. *rosea*. Proti endofytům je zde velké množství málo početných druhů tedy těch, které se vyskytly na méně než 1% listů/stonků.

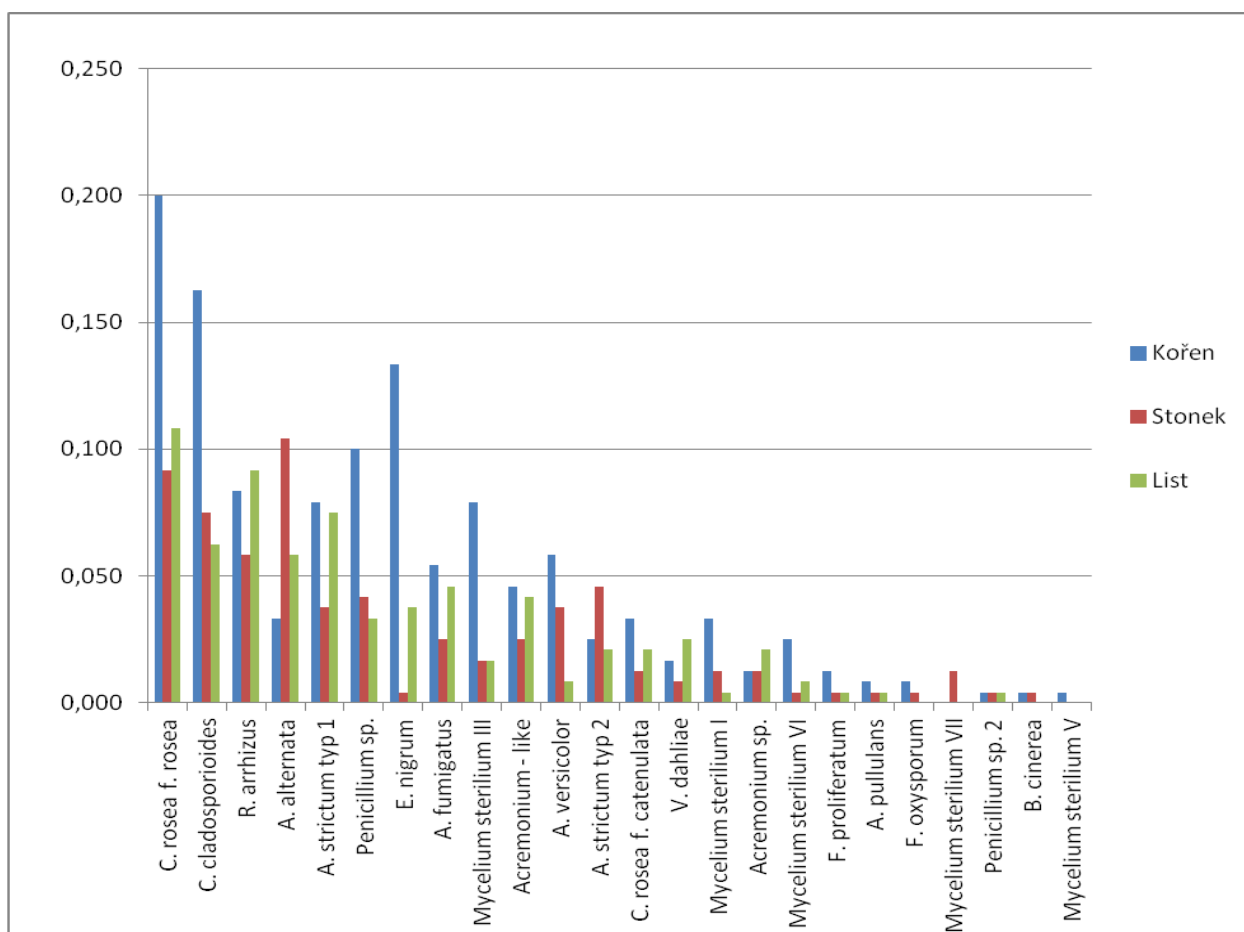
Tab. 10: Druhy hub izolovaných ze skvrnitostí šťovíku. Počty hub vztažené k počtu rostlinných orgánů a segmentů, z nichž byly izolovány.

Houby asociované se skvrnitostmi	Počet kolonizovaných:		% kolonizovaných	
	rost. orgánů	segmentů	rost. orgánů	segmentů
<i>Acremonium strictum</i> typ 1	63	236	18,53%	13,88%
<i>Aureobasidium pullulans</i>	48	120	14,12%	7,06%
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	46	113	13,53%	6,65%
<i>Acremonium strictum</i> typ 2	30	92	8,82%	5,41%
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>rosea</i>	25	102	7,35%	6,00%
<i>Fusarium proliferatum</i>	24	85	7,06%	5,00%
<i>Botrytis cinerea</i>	23	80	6,76%	4,71%
<i>Alternaria alternata</i>	21	84	6,18%	4,94%
<i>Mycelium sterilius</i> I	19	61	5,59%	3,59%
<i>Mycelium sterilius</i> III	18	65	5,29%	3,82%
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i>	10	25	2,94%	1,47%
<i>Mycelium sterilius</i> V	8	30	2,35%	1,76%
<i>Mycelium sterilius</i> VI	5	10	1,47%	0,59%
<i>Mycelium sterilius</i> VII	5	13	1,47%	0,76%
<i>Acremonium</i> -like	4	12	1,18%	0,71%
<i>Mycelium sterilius</i> II	3	7	0,88%	0,41%
<i>Fusarium oxysporum</i>	3	15	0,88%	0,88%
<i>Mycelium sterilius</i> IV	3	10	0,88%	0,59%
<i>Aspergillus</i> sp. 2	3	6	0,88%	0,35%
<i>Acrostalagmus luteoalbus</i>	3	7	0,88%	0,41%
<i>Penicillium</i> sp. 2	3	4	0,88%	0,24%
<i>Fusarium</i> sp. 2	3	10	0,88%	0,59%
<i>Acremonium</i> sp.	2	5	0,59%	0,29%
<i>Aspergillus versicolor</i>	2	7	0,59%	0,41%
<i>Phomopsis</i> sp.	2	9	0,59%	0,53%
<i>Aspergillus</i> sp. 1	2	4	0,59%	0,24%
<i>Rhizopus arrhizus</i> var. <i>arrhizus</i>	2	6	0,59%	0,35%
<i>Epicoccum nigrum</i>	2	2	0,59%	0,12%
<i>Verticillium dahliae</i>	1	5	0,29%	0,29%
Celkem kolonizováno	---	1225	---	72,06%
Celkový počet rost.org./segmentů	340	1700	100,00%	100,00%

4.4 Rozdíly ve složení mykobioty mezi rostlinnými orgány

Druhové složení endofytické mykobioty zdravých rostlin se mezi jednotlivými částmi rostliny příliš nelišilo, ale výrazně se lišilo v četnosti těchto druhů. Kořen šťovíku byl výrazně více kolonizován než nadzemní části, segmentů kolonizovaných nějakým druhem houby bylo téměř dvakrát více než u stonku a listu. Tento rozdíl je patrný i u některých čtenějších druhů jako jsou: *C. rosea f. rosea*, *C. cladosporioides*, *A. strictum* typ 1, *Penicillium* sp., *E. nigrum* nebo *Mycelium steriliun* III, jichž bylo izolováno několikanásobně víc z kořene než ze stonku nebo listu. *A. alternata* a *A. strictum* typu 2 pak byly nejčtenější na stonku. *R. arrhizus* byl nejčtenější na listu, relativní četnost tohoto druhu na listu však jen mírně přesáhla četnost na kořeni.

Graf 1: Srovnání relativní četnosti jednotlivých druhů endofytů v kořeni, stonku a listu.



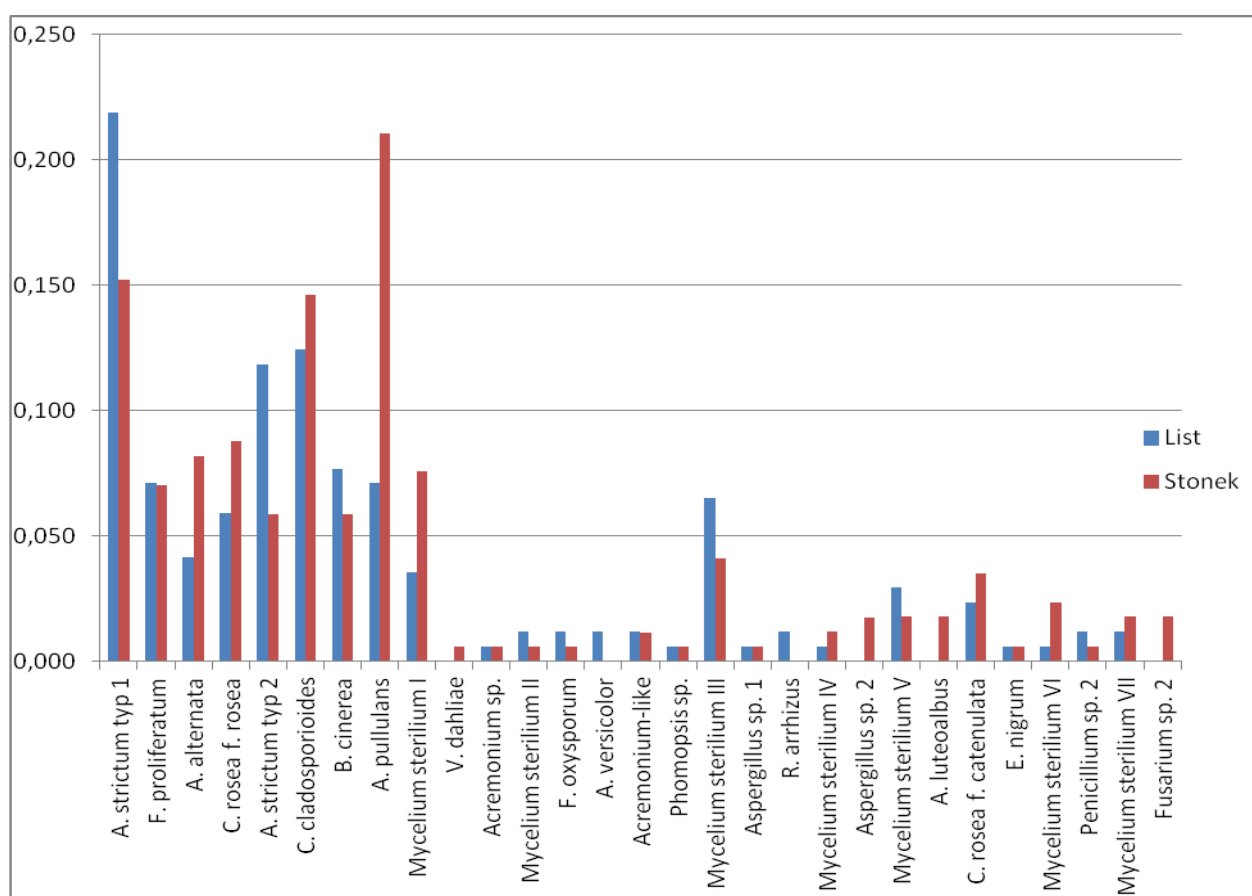
Tab. 11: Srovnání relativní četnosti a počtu kmenů izolovaných z rostlinných orgánů jednotlivých druhů endofytů v kořeni, stonku a listu.

	kořen		stonek		list	
	počet kmenů	rel. četnost	počet kmenů	rel. četnost	počet kmenů	rel. četnost
<i>C. rosea f. rosea</i>	48	0,200	22	0,092	26	0,108
<i>C. cladosporioides</i>	39	0,163	18	0,075	15	0,063
<i>R. arrhizus</i>	20	0,083	14	0,058	22	0,092
<i>A. alternata</i>	8	0,033	25	0,104	14	0,058
<i>A. strictum</i> typ 1	19	0,079	9	0,038	18	0,075
<i>Penicillium</i> sp.	24	0,100	10	0,042	8	0,033
<i>E. nigrum</i>	32	0,133	1	0,004	9	0,038
<i>A. fumigatus</i>	13	0,054	6	0,025	11	0,046
<i>Mycelium steriliu</i> III	19	0,079	4	0,017	4	0,017
<i>Acremonium</i> - like	11	0,046	6	0,025	10	0,042
<i>A. versicolor</i>	14	0,058	9	0,038	2	0,008
<i>A. strictum</i> typ 2	6	0,025	11	0,046	5	0,021
<i>C. rosea f. catenulata</i>	8	0,033	3	0,013	5	0,021
<i>V. dahliae</i>	4	0,017	2	0,008	6	0,025
<i>Mycelium steriliu</i> I	8	0,033	3	0,013	1	0,004
<i>Acremonium</i> sp.	3	0,013	3	0,013	5	0,021
<i>Mycelium steriliu</i> VI	6	0,025	1	0,004	2	0,008
<i>F. proliferatum</i>	3	0,013	1	0,004	1	0,004
<i>A. pullulans</i>	2	0,008	1	0,004	1	0,004
<i>F. oxysporum</i>	2	0,008	1	0,004	0	0,000
<i>Mycelium steriliu</i> VII	0	0,000	3	0,013	0	0,000
<i>Penicillium</i> sp. 2	1	0,004	1	0,004	1	0,004
<i>B. cinerea</i>	1	0,004	1	0,004	0	0,000
<i>Mycelium steriliu</i> V	1	0,004	0	0,000	0	0,000
Celkem odebraných vzorků rostlin	240		240		240	

U hub izolovaných ze skvrn se také příliš nelišilo druhové složení mezi listem a stonkem, u několika druhů byl však výrazný rozdíl v četnosti.

A. strictum typ 1 i 2 se výrazně více vyskytovalo na listech a stejně tak *Mycelium steriliium* III, kdežto *A. alternata*, *C. rosea* f. *rosea*, *A. pullulans* a *Mycelium steriliium* I byly četnější na stonku. Několik málo četných druhů se vyskytovalo jen na jednom orgánu, ale jednalo se o houby, které byly izolovány max. ve třech případech. Pouze na stonku se vyskytly houby: *Fusarium* sp. 2, *A. luteoalbus*, *Aspergillus* sp. 2 a *V. dahliae*. Pouze z listu byly izolovány houby *A. versicolor* a *R. arrhizus*.

Graf 2: Srovnání relativní četnosti druhů hub ze skvrn na stonku a listu.



Tab. 12: Srovnání relativní četnosti a počtu kmenů (izolovaných z rostlinného orgánu) jednotlivých druhů izolovaných ze skvrn na stonku a listu.

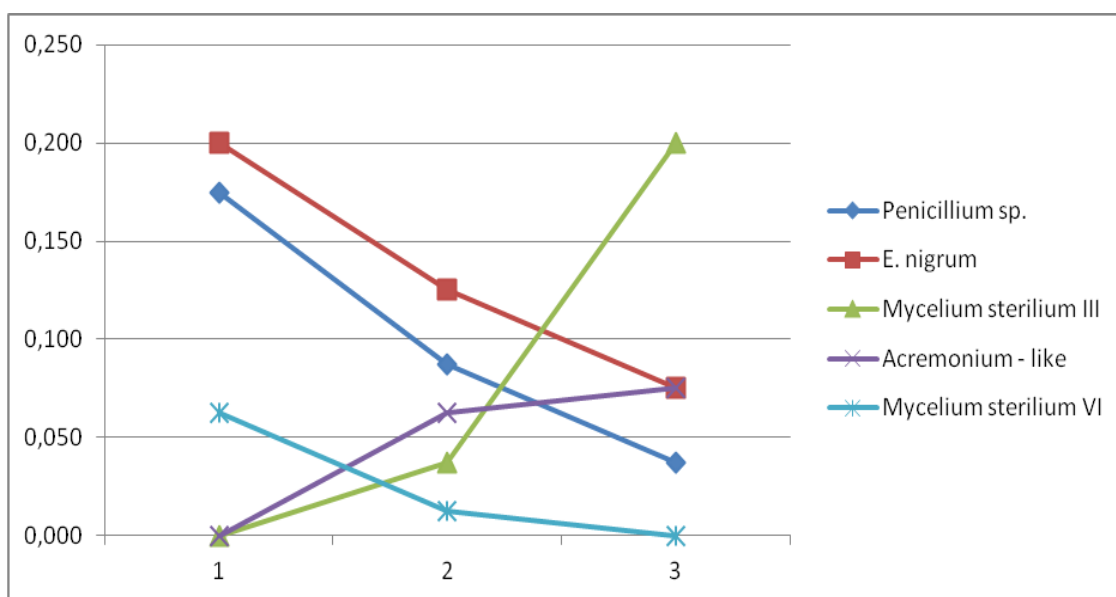
	List		Stonek	
	počet kmenů	rel. četnost	počet kmenů	rel. četnost
<i>A. strictum</i> typ 1	37	0,219	26	0,152
<i>F. proliferatum</i>	12	0,071	12	0,070
<i>A. alternata</i>	7	0,041	14	0,082
<i>C. rosea</i> f. <i>rosea</i>	10	0,059	15	0,088
<i>A. strictum</i> typ 2	20	0,118	10	0,058
<i>C. cladosporioides</i>	21	0,124	25	0,146
<i>B. cinerea</i>	13	0,077	10	0,058
<i>A. pullulans</i>	12	0,071	36	0,211
<i>Mycelium sterili</i> um I	6	0,036	13	0,076
<i>V. dahliae</i>	0	0,000	1	0,006
<i>Acremonium</i> sp.	1	0,006	1	0,006
<i>Mycelium sterili</i> um II	2	0,012	1	0,006
<i>F. oxysporum</i>	2	0,012	1	0,006
<i>A. versicolor</i>	2	0,012	0	0,000
<i>Acremonium</i> -like	2	0,012	2	0,012
<i>Phomopsis</i> sp.	1	0,006	1	0,006
<i>Mycelium sterili</i> um III	11	0,065	7	0,041
<i>Aspergillus</i> sp. 1	1	0,006	1	0,006
<i>R. arrhizus</i>	2	0,012	0	0,000
<i>Mycelium sterili</i> um IV	1	0,006	2	0,012
<i>Aspergillus</i> sp. 2	0	0,000	3	0,018
<i>Mycelium sterili</i> um V	5	0,030	3	0,018
<i>A. luteoalbus</i>	0	0,000	3	0,018
<i>C. rosea</i> f. <i>catenulata</i>	4	0,024	6	0,035
<i>E. nigrum</i>	1	0,006	1	0,006
<i>Mycelium sterili</i> um VI	1	0,006	4	0,023
<i>Penicillium</i> sp. 2	2	0,012	1	0,006
<i>Mycelium sterili</i> um VII	2	0,012	3	0,018
<i>Fusarium</i> sp. 2	0	0,000	3	0,018
Celkem odebraných vzorků rostlin	169		171	

4.5 Změny mykobioty v průběhu sezony

U některých druhů hub byl zaznamenán vývoj v četnosti během sezony. Porovnány byly změny v mykobiotě jednotlivých rostlinných orgánů, vztažené k jejich relativní četnosti v daném odběru. Zahrnuty byly pouze houby, které byly čtenější (celkově se vyskytovaly alespoň v 1% případů), protože u velmi málo početných druhů by nemělo porovnání vypovídací hodnotu. V grafech jsou pak znázorněny druhy, u nichž byly zaznamenány významné změny v četnosti během sezony.

Penicillium sp., *Epicoccum nigrum* a *Mycelium steriliu* VI kupodivu v endofytické mykobiotě kořene během sezony ubývaly, výrazně však přibývalo *Mycelium steriliu* III a také *Acremonium* – like.

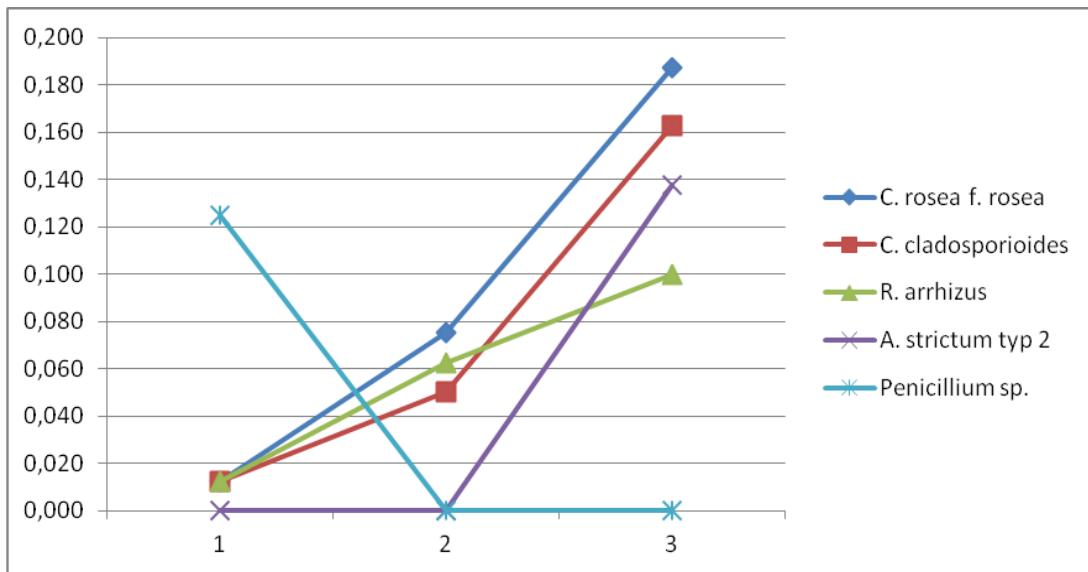
Graf 3: Vývoj endofytických hub během sezony (relativní četnost) v kořeni.



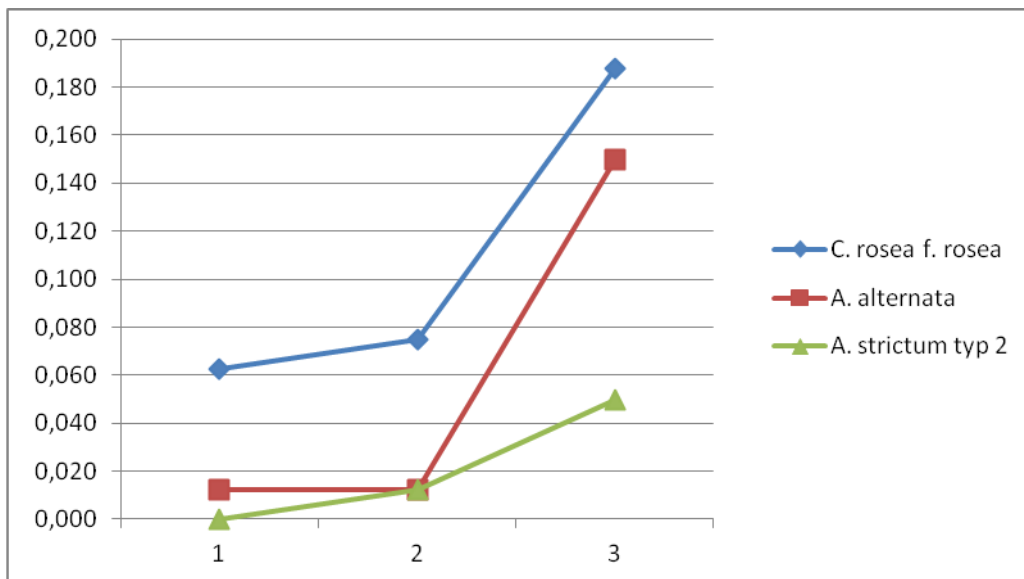
V endofytické mykobiotě stonku ubývalo pouze *Penicillium* sp., ostatní houby, u nichž byl sledován vývoj, přibývaly, jednalo se o: *Clonostachys rosea* f. *rosea*, *Cladosporium cladosporioides*, *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* a *Acremonium strictum* typ 2.

A. strictum typu 2, *C. rosea* f. *rosea* a *Alternaria alternata* přibývaly v endofytické mykobiotě zdravých listů.

Graf 4: Vývoj endofytických hub během sezony (relativní četnost) ve stonku

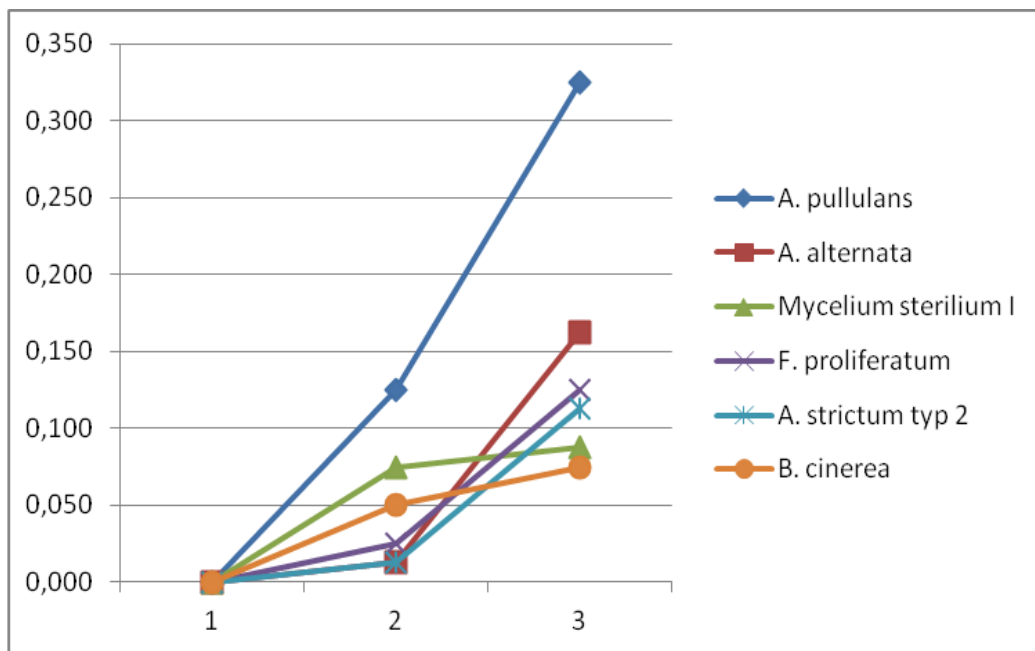


Graf 5: Vývoj endofytických hub během sezony (relativní četnost) v listu.

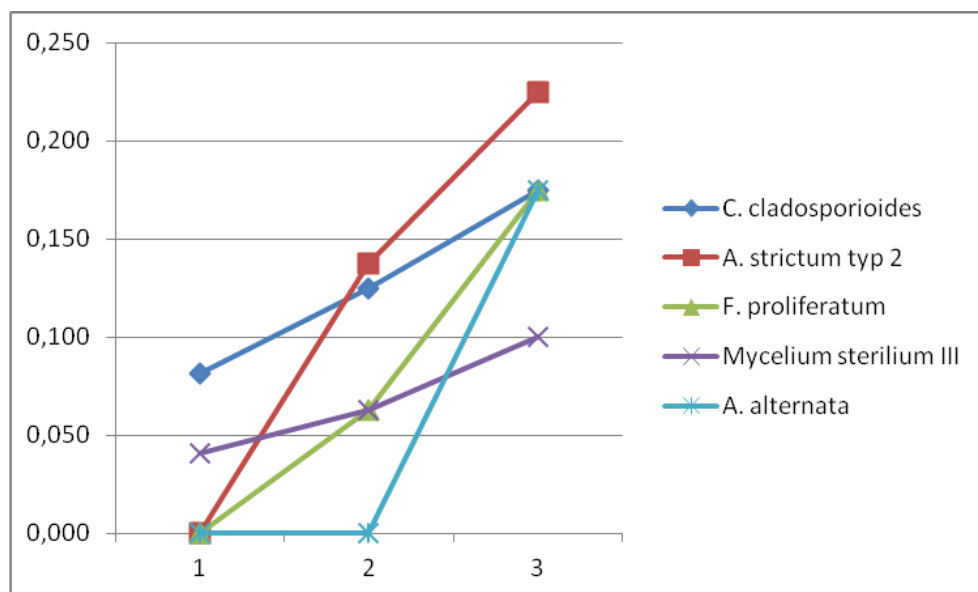


Z mykobioty skvrnitostí stonku výrazně přibývalo 6 druhů hub: *Aureobasidium pullulans*, *A. alternata*, *Fusarium proliferatum*, *A. strictum* typ 2, *Mycelium steriliium* I a *Botrytis cinerea*. Ve skvrnitostech listů pak přibývaly: *C. cladosporioides*, *A. strictum* typ 2, *F. proliferatum*, *Mycelium steriliium* III a *Alternaria alternata*.

Graf 6: Vývoj hub ze skvrnitostí během sezony (relativní četnost) ve stonku



Graf 7: Vývoj hub ze skvrnitostí během sezony (relativní četnost) v listu



4.6 Srovnání druhového složení a četnosti jednotlivých druhů endofytické mykobioty a hub asociovaných se skvrnitostmi

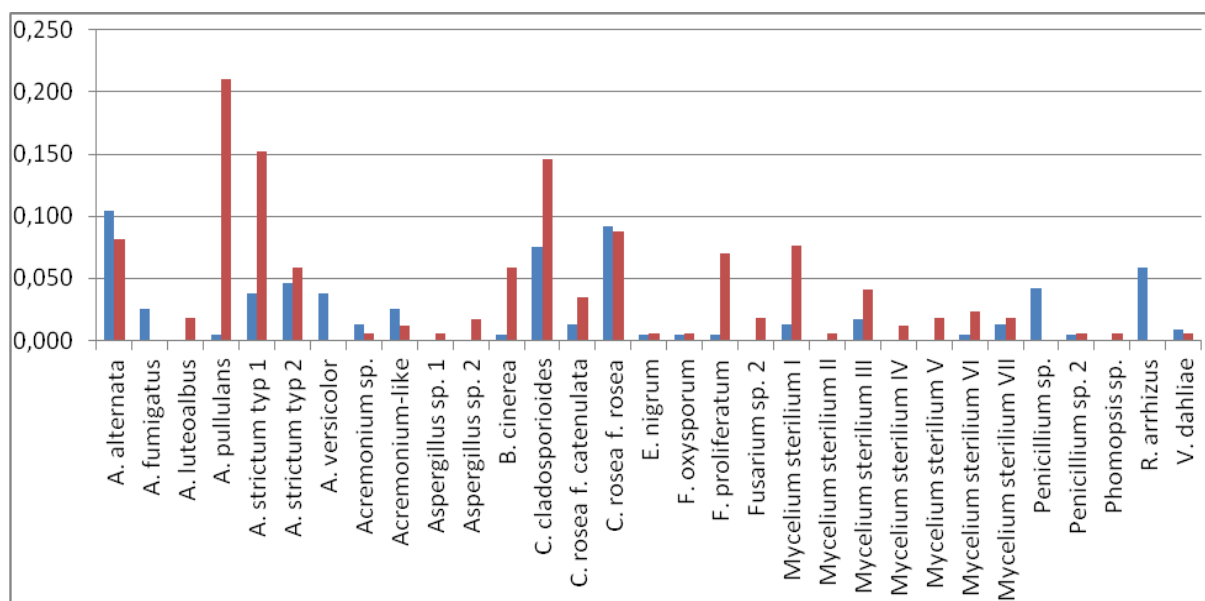
Srovnáním celkové mykobioty rostlin pozorujeme, že některé druhy se vyskytovaly jen se skvrnitostmi a dva druhy jen mezi endofyty. Pouze endofytické byly houby *A. fumigatus* a *Penicillium* sp. Pouze ve skvrnitostech se pak vyskytovali *A. luteoalbus*, *Aspergillus* sp. 1 a 2, *Fusarium* sp. 2, *Mycelium sterilius* II a IV a *Phomopsis* sp.

Při srovnání mykobioty zdravých stonků a stonků se skvrnami vyplývá, že se její složení výrazně liší a liší se i četnost druhů. Celkem 12 druhů se vyskytovalo jen v jednom typu mykobioty. Navíc *A. pullulans*, které bylo vůbec nejčetnějším druhem ve skvrnitostech bylo jen málo zastoupeno v mykobiotě zdravých rostlin.

Podobně tomu bylo i na listech, zde se 11 druhů vyskytlo pouze v jednom typu mykobioty listů. 3 druhy izolované ze šťovíku se pak na listech nevyskytovaly vůbec. *A. strictum* typ 1 i 2 a *A. pullulans* byly výrazně čtější ve skvrnitostech, *R. arrhizus* a *C. rosea* f. *rosea* zase na zdravých rostlinách.

Graf 8: Srovnání mykobioty stonků zdravých rostlin a skvrnitostí (relativní četnost)

Modře – endofyty, červeně - skvrnitosti.



Tab. 13: Srovnání mykobioty stonků zdravých rostlin a skvrnitostí, houby řazeny podle relativní četnosti.

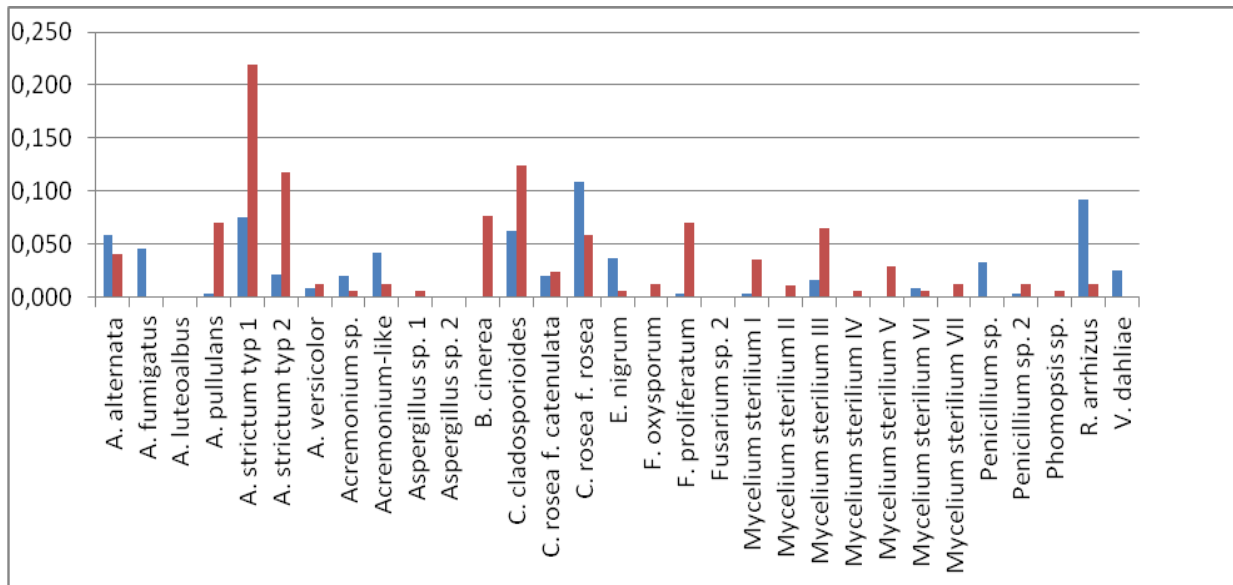
Endofyty	stonek - rel. četnost	Skvrnitosti	stonek - rel. četnost
<i>A. alternata</i>	0,104	<i>A. pullulans</i>	0,211
<i>C. rosea f. rosea</i>	0,092	<i>A. strictum</i> typ 1	0,152
<i>C. cladosporioides</i>	0,075	<i>C. cladosporioides</i>	0,146
<i>R. arrhizus</i>	0,058	<i>C. rosea f. rosea</i>	0,088
<i>A. strictum</i> typ 2	0,046	<i>A. alternata</i>	0,082
<i>Penicillium</i> sp.	0,042	<i>Mycelium steriliium</i> I	0,076
<i>A. strictum</i> typ 1	0,038	<i>F. proliferatum</i>	0,070
<i>A. versicolor</i>	0,038	<i>A. strictum</i> typ 2	0,058
<i>A. fumigatus</i>	0,025	<i>B. cinerea</i>	0,058
<i>Acremonium</i> - like	0,025	<i>Mycelium steriliium</i> III	0,041
<i>Mycelium steriliium</i> III	0,017	<i>C. rosea f. catenulata</i>	0,035
<i>C. rosea f. catenulata</i>	0,013	<i>Mycelium steriliium</i> VI	0,023
<i>Mycelium steriliium</i> I	0,013	<i>Mycelium steriliium</i> V	0,018
<i>Acremonium</i> sp.	0,013	<i>A. luteoalbus</i>	0,018
<i>Mycelium steriliium</i> VII	0,013	<i>Mycelium steriliium</i> VII	0,018
<i>V. dahliae</i>	0,008	<i>Fusarium</i> sp. 2	0,018
<i>E. nigrum</i>	0,004	<i>Aspergillus</i> sp. 2	0,018
<i>Mycelium steriliium</i> VI	0,004	<i>Mycelium steriliium</i> IV	0,012
<i>F. proliferatum</i>	0,004	<i>Acremonium</i> -like	0,012
<i>A. pullulans</i>	0,004	<i>Acremonium</i> sp.	0,006
<i>F. oxysporum</i>	0,004	<i>Mycelium steriliium</i> II	0,006
<i>Penicillium</i> sp. 2	0,004	<i>F. oxysporum</i>	0,006
<i>B. cinerea</i>	0,004	<i>Phomopsis</i> sp.	0,006
<i>Mycelium steriliium</i> V	0,000	<i>Aspergillus</i> sp. 1	0,006
		<i>E. nigrum</i>	0,006
		<i>Penicillium</i> sp. 2	0,006
		<i>V. dahliae</i>	0,006
		<i>A. versicolor</i>	0,000
		<i>R. arrhizus</i>	0,000

Tab. 14: Srovnání mykobioty listů zdravých rostlin a skvrnitostí, houby řazeny podle relativní četnosti.

Endofyty	listy - rel.četnost	Skvrnitosti	listy - rel.četnost
<i>C. rosea f. rosea</i>	0,108	<i>A. strictum</i> typ 1	0,219
<i>R. arrhizus</i>	0,092	<i>C. cladosporioides</i>	0,124
<i>A. strictum</i> typ 1	0,075	<i>A. strictum</i> typ 2	0,118
<i>C. cladosporioides</i>	0,063	<i>B. cinerea</i>	0,077
<i>A. alternata</i>	0,058	<i>F. proliferatum</i>	0,071
<i>A. fumigatus</i>	0,046	<i>A. pullulans</i>	0,071
<i>Acremonium</i> - like	0,042	<i>Mycelium steriliium</i> III	0,065
<i>E. nigrum</i>	0,038	<i>C. rosea f. rosea</i>	0,059
<i>Penicillium</i> sp.	0,033	<i>A. alternata</i>	0,041
<i>V. dahliae</i>	0,025	<i>Mycelium steriliium</i> I	0,036
<i>A. strictum</i> typ 2	0,021	<i>Mycelium steriliium</i> V	0,030
<i>C. rosea f. catenulata</i>	0,021	<i>C. rosea f. catenulata</i>	0,024
<i>Acremonium</i> sp.	0,021	<i>F. oxysporum</i>	0,012
<i>Mycelium steriliium</i> III	0,017	<i>A. versicolor</i>	0,012
<i>A. versicolor</i>	0,008	<i>Acremonium</i> -like	0,012
<i>Mycelium steriliium</i> VI	0,008	<i>R. arrhizus</i>	0,012
<i>Mycelium steriliium</i> I	0,004	<i>Penicillium</i> sp. 2	0,012
<i>F. proliferatum</i>	0,004	<i>Mycelium steriliium</i> VII	0,012
<i>A. pullulans</i>	0,004	<i>Mycelium steriliium</i> II	0,012
<i>Penicillium</i> sp. 2	0,004	<i>Phomopsis</i> sp.	0,006
<i>F. oxysporum</i>	0,000	<i>Aspergillus</i> sp. 1	0,006
<i>Mycelium steriliium</i> VII	0,000	<i>Mycelium steriliium</i> IV	0,006
<i>B. cinerea</i>	0,000	<i>E. nigrum</i>	0,006
<i>Mycelium steriliium</i> V	0,000	<i>Mycelium steriliium</i> VI	0,006
		<i>Acremonium</i> sp.	0,006
		<i>V. dahliae</i>	0,000
		<i>Aspergillus</i> sp. 2	0,000
		<i>A. luteoalbus</i>	0,000
		<i>Fusarium</i> sp. 2	0,000

Graf 9: Srovnání mykobioty listů zdravých rostlin a skvrnitostí (relativní četnost)

Modře – endofyty, červeně - skvrnitosti.



4.7 Srovnání mykobioty lokalit

Druhové složení lokalit se také příliš nelišilo, několik málo druhů se však vyskytlo jen na jedné lokalitě. Z endofytů šlo o *A. pullulans* a *Mycelium steriliium* V. Kdežto u skvrnitostí šlo o *V. dahliae*, *Phomopsis* sp., *Mycelium steriliium* VI a VII.

A. pullulans i *Mycelium steriliium* V se však běžně vyskytovaly na všech lokalitách mezi skvrnitostmi. Podobně tomu bylo i u skvrnitostí, pouze *Phomopsis* sp. byla nalezena pouze na lokalitě u Štipoklas.

Ostatní druhy endofytické i ze skvrnitostí se nalézaly minimálně na dvou lokalitách, obvykle však na všech. Pokud na nějaké lokalitě určitý druh chyběl, obvykle se jednalo o málo početný druh, který byl i na ostatních lokalitách izolován jednou nebo dvakrát. Žádné statisticky významné rozdíly mezi mykobiotou lokalit, ale nebyly zaznamenány.

Přestože se tedy lokality lišily jak v kvalitě porostu, tak v podmínkách pro růst šťovíku, nebyl výrazný rozdíl ve složení mykobioty.

4.8 Infekční pokus

Z hub izolovaných ze skvrnitostí byly vybrány sporující potenciálně patogenní druhy. Přestože *Fusarium proliferatum* bylo poměrně častým druhem, v kultuře neochotně sporulovaly jen dva kmeny, ostatní zůstávaly sterilní. Z pokusů tedy byly vyloučeny všechny špatně rostoucí a sporující kultury, aby byl vyloučen falešně negativní výsledek. Z tohoto důvodu bylo vyloučeno i *Acremonium strictum*, známý patogen, způsobující různá poškození širokého spektra rostlin. *A. strictum* však kultuře sporulovalo jen krátce po izolaci z rostliny a pak zřejmě velmi rychle degenerovalo a zůstávalo sterilní. Pro infekční pokus tak byly použity druhy *Phomopsis* sp., *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cladosporioides*. Od každého tohoto druhu byly vybrány tři vitální kmeny, od *Phomopsis* sp. byly vybrány dva – jeden ze stonku a jeden z listu, třetí pocházel z předchozích pokusných odběrů ve VÚRV v Ruzyni.

Rostliny byly vždy po týdnu zkontrolovány, zda se na nich neobjevily skvrny. Ale ani po skončení pozorování se neobjevily známky skvrnitostí ani jiných nekrotických změn.



Obr.11: Rostliny těsně po aplikaci roztoku spor. Obr. 12: Rostliny po jednom týdnu.

Foto Hana Jand'ourková.



Obr. 13: Rostliny po dvou týdnech od aplikace (foto Hana Jand'ourková).



Obr. 14: Detail listů, tři týdny od aplikace (foto Hana Jand'ourková).

4.9 *Phomopsis* sp.

Houba izolovaná jako *Phomopsis* sp. byla pomocí sekvenování (a databáze GenBank) přiřazena k teleomorfě *Diaporthe eres*.

Houba *Phomopsis* sp. však nebyla nijak početným druhem, mezi endofyty se nevyskytla ani jednou a ze skvrn byla izolována jen dvakrát. Jedenkrát byla izolována z listu (ze všech pěti segmentů) a jedenkrát ze stonku (ze čtyř segmentů), v obou případech se jednalo o pole u Štípklas v druhém odběru. Oba kmeny byly použity při infekčním pokusu (viz. kapitola 4.8).

5. DISKUZE

5.1 Metodika

Izolováno bylo poměrně málo druhů, což je ale pravděpodobně způsobeno samotným šťovíkem, protože šťovíky i mnohé jiné rostliny čeledi Polygonaceae mají antibakteriální a antimykotické účinky (Hussain et al., 2010) a i v předchozích studiích endofytů šťovíků byla zjištěna poměrně malá druhová diverzita (Wearn et al., 2012). Metoda sterilizace vzorků byla důkladně vyzkoušena rok před odběry rostlin pro diplomovou práci. Vyzkoušeno bylo celkem 10 různých variant sterilizace, z nichž většina byla příliš slabá (nízká koncentrace NaClO) a ve vzorcích pak rostly pouze epifytické kontaminanty typu *Penicillium* a *Aspergillus*. Nepomohlo ani zvýšení koncentrace ethanolu, kdy naopak vzorky zůstaly úplně sterilní nebo vyrostly pouze bakterie. Pomohlo až zvýšení koncentrace chlornanu sodného. Vzhledem k tomu, že současně probíhalo testování sterilizace i u dalších dvou rostlin (čirok, ozdobnice), je možno srovnání – u těchto dvou rostlin nebylo zapotřebí tak vysoké koncentrace chlornanu a ze zkušebních vzorků vyrůstalo až dvakrát tolik hub než ze vzorků šťovíku. Rozdíl tedy musí být již v samotné rostlině šťovíku.

Metodickým problémem v průběhu práce byl poměrně vysoký počet sterilních morfotypů (zůstaly sterilní po celou dobu od izolace), mnohé také rostly velice pomalu (po dvou měsících nebyl průměr kolonie ani 1,5 cm). Tyto morfotypy pak byly vysoce náchylné ke kontaminaci rychle rostoucími houbami zejména pak *Clonostachys rosea*. Z tohoto důvodu se nepodařilo u dvou morfotypů označených jako *Mycelium sterilium* izolovat dostatečné množství čisté DNA pro sekvenaci. Zbylé morfotypy označené jako *Mycelium sterilium* se nepodařilo v databázi GenBank ztotožnit s určeným druhem houby, nejbližší byly vzorky označené Uncultured fungus nebo Sterile endophyte, zřejmě se tedy jedná o špatně kultivovatelné a v kultuře těžko sporující houby. Tyto morfotypy však nebyly příliš četné (max. 2,5%).

Sekvence ITS úseku, byla dostatečně úspěšná u nejvíce četných druhů. U některých však stačila pouze na určení do rodu, což ale může být způsobeno nejen nedostatečnou variabilitou úseku ITS, ale i nedostatky v samotné databázi GenBank, protože se často jedná o skupiny hub obtížně určitelné do druhu (např. *Acremonium*). V několika případech byla sekvence se stejnou podporou ztotožněna se dvěma druhy jednoho rodu a nebylo tedy možno rozhodnout, o který se jedná.

5.2 Antifungální účinky šťovíku

Jak už bylo zmiňováno šťovíky a příbuzné rody čeledi Polygonaceae mají antibakteriální a antifungální účinky.

Antifungální účinky byly potvrzeny u druhu *Rumex crispus*, jehož extrakt byl proti *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* účinnější než některé fungicidy. Tento roztok byl testován na mladých rostlinkách ječmene společně s roztokem z *Achyranthes japonica*, ale účinek *R. crispus* na *E. graminis* byl větší (Kim et al., 2004). Tyto účinky *R. crispus* byly podrobněji zkoumány. Z *R. crispus* byly izolovány tři látky: chrysophanol, parietin a nepodin, všechny tři vykazovaly antifungální účinky. Účinky těchto látek byly testovány nejen na *Erysiphe graminis* (syn. *Blumeria graminis*), ale i na pěti dalších patogenních houbách: *Magnaporthe grisea*, *Corticium sasaki*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora infestans* a *Puccinia recondita*. Parietin měl největší antifungální účinek, i když z testovaných hub extrakty z *R. crispus* výrazně potlačovaly pouze *M. grisea* a *E. graminis*. Tato studie je o to zajímavější, že produkce nepodinu byla prokázána také u *R. patientia*, z něhož byl vyšlechtěn šťovík krmný (Choi et al., 2004). Jsou známy i účinky *R. vesicarius* na růst a sporulaci patogenních hub *Drechslera biseptata* a *Fusarium solani* (Abu-Taleb et al., 2011). Antifungální aktivita byla prokázána i u dalších druhů šťovíku. Zkoumány byly extrakty z kořene a listu. Extrakt z *Rumex hastatus* měl inhibující účinek na *Helminthosporium maydis* a *Aspergillus niger*, menší účinky pak na houby *Fusarium solani*, *Aspergillus flavus* a *Alternaria solani*. Inhibující účinek na *F. solani* však vykazoval *Rumex dentatus*, který ale na *H. maydis*, *A. niger*, *A. flavus* a *A. solani* měl méně výrazný účinek. Extrakt z *Rumex nepalensis* nejvíce působil na *A. niger*, méně pak na *A. flavus* a *A. solani*, neúčinkoval na *F. solani* a *H. maydis* (Hussain et al., 2010). Schopnost potlačovat růst různých hub tak nemůžeme paušalizovat na celý rod *Rumex*.

Pokud uvážíme tyto prokázané antifungální účinky u různých druhů šťovíku, je méně překvapivá poměrně malá rozmanitost druhů hub izolovaných ze šťovíku krmného. V případných dalších studiích by bylo zajímavé zjistit, zda šťovík krmný obsahuje stejně jako *R. patientia* látku s antifungálním účinkem nepodin a zda neobsahuje ještě některé další antifungální a antibakteriální látky, které by mohly být využity v ochraně rostlin.

5.3 Druhová skladba mykobioty šťovíku krmného

Antifungální účinky šťovíku, pokud bychom je měli za prokázané, by mohly ovlivňovat i druhovou skladbu mykobioty šťovíku.

Zajímavá je poměrně velká četnost *Clonostachys rosea* f. *rosea* (ale i *C. rosea* f. *catenulata*), která je využívána v biologické ochraně proti některým dalším houbám. *C. rosea* je totiž mykoparazitická houba náležející do řádu Hypocreales. Její teleomorfoou je *Bionectria ochroleuca* (podle MycoBank). Účinky *C. rosea* byly prokázány při ošetření semen obilovin, zde vykazovala téměř stejnou účinnost proti patogenu *Fusarium culmorum* jako chemické fungicidy (Jensen et al., 2000). Další druhy rodu *Fusarium* jsou také součástí takzvaného PRRC komplexu (pea root rot complex), který napadá hrášek (*Pisum sativum*), *C. rosea* dokázala úspěšně potlačovat tyto houby. PRRC je tvořen houbami *Alternaria alternata*, *Aphanomyces euteiches*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*, *F. solani* f. sp. *pisi*, *Mycosphaerella pinodes*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* a *Sclerotinia sclerotiorum*. Účinek *C. rosea* proti těmto houbám byl opět srovnatelný nebo větší než účinek chemických fungicidů (Xue, 2003). Také *C. rosea* f. *catenulata* má antagonistické účinky na *F. oxysporum* (f. sp. *radicis-cucumerinum*), které byly prokázány při inokulaci kořenů okurky (Chatterton et al., 2008). Ze šťovíku krmného však bylo izolováno několik druhů rodu *Fusarium* – *F. proliferatum*, *F. oxysporum* a jeden neurčený druh. Přesto by výskyt *C. rosea* mohl na ně mít vliv, protože v kultuře většina kmenů jen neochotně sporulovala. Kmeny tak mohly být oslabené vlivem delší doby společného růstu ve stejné části rostliny, dokonce i na stejné primární misce v kultuře, s *C. rosea*. Jako antagonistista se *C. rosea* osvědčila také proti *Botrytis cinerea* (teleomorfa: *Botryotinia fuckeliana*) při ošetření jahodníku (Cota et al., 2008). *B. cinerea* se celkem hojně vyskytovala také ve skvrnitostech na šťovíku krmném, na zdravých rostlinách však jen velmi málo, kdežto *C. rosea* byla na zdravých rostlinách vůbec nejčastějším endofytem. Je však otázka, jestli je zde skutečně spojitost a *C. rosea* může jako endofyt potlačovat výskyt *B. cinerea*. Mechanismus účinku proti houbovým patogenům rostlin byl částečně odhalen u *C. rosea* f. *catenulata*, u které byla prokázána produkce chitinázy a β -1,3-glukanázy. Vytvářela také struktury podobné apresoriím a její hyfy se ovíjely okolo hyf patogena (*Pythium*) (Chatterton et Punja, 2009).

Acremonium strictum bylo odhaleno jako mykoparazit patogenní houby *Helminthosporium solani* a v souvislosti s tím se začalo uvažovat o využití *A. strictum* v biologické ochraně brambor (Rivera-Varas et al., 2007). *A. strictum* dále inhibovalo růst také u *B. cinerea* (Ja et al., 2008). *A. strictum* je však i samo patogenní houbou. Široké spektrum příznaků bylo

pozorováno například na kukuřici (Tagne et al., 2002) a příbuzném čiroku (Bandyopadhyay et al., 1987). Vzhledem k tomu, že se v ČR pěstuje kukuřice na nezanedbatelné ploše polí, mohlo by být riskantní nejen využití *A. strictum* v biologické ochraně, ale je na pováženou, že ve šťovíku krmném bylo velice četné. Nebyla sice prokázána patogenita těchto kmenů, ale přesto by šťovík mohl být rezervoárem pro patogenní kmeny *A. strictum*.

Antifungální účinky a využití v biologické ochraně je dobře známo také u houby *Aureobasidium pullulans*. Na jablkách je prokázána jeho účinnost proti *B. cinerea* a *Penicillium expansum* (Ippolito et al., 2000). Účinek je však mnohem širší, funguje také proti *Penicillium digitatum* na grapefruitu, *Rhizopus stolonifer* a *Aspergillus niger* na hroznovém vínu a rajčatech a mnoha dalších rostlinách (Scheda et al., 1999).

Epicoccum nigrum, kromě toho že je patogenní, je využitelné i v biologické ochraně rostlin. Například roztok *E. nigrum* samostatně nebo společně s chemickými fungicidy pomáhá kontrolovat výskyt houby *Monilinia* sp. způsobující hnědou hnilobu broskví (Larena et al., 2005).

A. strictum, *A. pullulans*, *E. nigrum* a *C. rosea* by tedy ve spojitosti s antifungálními účinky látek obsažených ve šťovíku mohly ovlivňovat druhovou skladbu jeho mykobioty.

Další četnější druhy izolované ze šťovíku jsou buď běžnými endofyty, saprofyty nebo patogeny rostlin (Ellis et Ellis, 1997; Brandenburger, 1985). Výskyt některých (*Cladosporium*, *Alternaria* a *Penicillium*) souhlasí s tím, co izoloval z *R. acetosa* Wearn (Wearn et al., 2012).

Při srovnání endofytické mykobioty zdravých stonků a mykobioty skvrnitostí stonků vyplynulo, že 12 druhů hub se vyskytlo jen v jedné z variant. Jednalo se ale jen o méně četné druhy. Zajímavé je, že *A. pullulans*, houba velmi četná ve skvrnitostech stonku, se mezi endofyty vyskytovala jen málo. Mezi endofyty stonku pak byly nejčastější *A. alternata*, *C. rosea* f. *rosea* a *C. cladosporioides*, kdežto ve skvrnitostech bylo nejčastější *A. pullulans*, *A. strictum* typ 1 a *C. cladosporioides*. Kryje se tak pouze výskyt běžné endofytické houby *C. cladosporioides*. Mykobiota listů se také lišila, 11 druhů bylo buď na zdravých listech, nebo ve skvrnách. Spektrum nejčastějších druhů však bylo podobné, mezi endofyty byli nejčastější *C. rosea* f. *rosea*, *R. arrhizus*, *A. strictum* typ 1 a *C. cladosporioides* a mezi skvrnitostmi listu *A. strictum* typ 1 a 2, *C. cladosporioides* a *B. cinerea*. Liší se tedy četností *C. rosea* f. *rosea*, *R. arrhizus* a *B. cinerea*. Přičemž víme, že *B. cinerea* je patogenní a tak může mít souvislost se skvrnitostmi.

Ze srovnání četnosti jednotlivých druhů vidíme, že druhové zastoupení se mezi rostlinnými orgány příliš neliší, ale v několika případech se výrazně lišila četnost těchto druhů.

A. alternata byla četnější na stonku jak u endofytů, tak u hub ze skvrnitostí, kdežto *A. strictum* typu 1 bylo četnější na listech (ale u endofytů také na kořeni). Nemůžeme však na základě výsledků jednoduše říci, že dávají těmto orgánům přednost, protože kolonizovaly i ostatní orgány. Není také jasná spojitost mezi preferencí kořene a listu, protože kořen zůstává v půdě více let, kdežto listy šťovíku jsou poměrně krátkověké.

Můžeme ale vysvětlit, proč je kořen více kolonizován než nadzemní části. Kořen u šťovíku krmného zůstává v půdě po mnoho let, zatímco nadzemní části každý rok odumírají a také jsou sklizeny, pro krmné účely i několikrát ročně, pro energetické účely vždy na začátku července, hned po zaschnutí nadzemních částí. Houby tak mohou v kořeni přetrvávat mnoho let, kdežto nadzemní části musí být každý rok kolonizovány znovu.

U některých druhů hub můžeme sledovat vývoj v četnosti během sezony. Pouze několik druhů ubývalo: *E. nigrum*, *Mycelium steriliun* VI a *Penicillium* sp., ve všech případech se jednalo o druhy endofytické mykobioty kořene, *Penicillium* sp. navíc ubývalo i ve stonku. Tento jev bychom si mohli vysvětlit buď přibýváním jiných druhů hub, kompetičně úspěšnějších, nebo změnou okolních podmínek v průběhu sezony, případně kombinací těchto faktorů. V endofytické mykbiotě stonku i listu přibývali *C. rosea* f. *rosea* a *A. strictum* typ 2, v listu potom ještě *A. alternata* a ve stonku *R. arrhizus* a *C. cladosporioides*, v kořeni přibývalo *Acremonium* – like a *Mycelium steriliun* III. Ve skvrnitostech přibývaly *A. alternata*, *F. proliferatum* a *A. strictum* typ 2, ve stonku navíc *A. pullulans*, *B. cinerea* a *Mycelium steriliun* I, v listu *C. cladosporioides* a *Mycelium steriliun* III. Vidíme tedy, že *A. strictum* typ 2 přibývalo ve všech nadzemních orgánech ať již zdravých nebo se skvrnitostmi, stejně tak přibývala *A. alternata* v obou typech mykobioty listů. Vzrůstající četnost *F. proliferatum* a *B. cinerea* ve skvrnitostech by svědčila pro jejich asociaci se skvrnami, i když u *B. cinerea* se neprokázala schopnost tyto skvrny vytvářet. Ve zdravých listech a stoncích také narůstalo zastoupení houby *C. rosea* f. *rosea*, která by tak mohla chránit rostliny před patogeny, jak již bylo zmíněno v diskuzi výše. Většinou se četnost druhů hub v mykbiotě neměnila nebo se jednalo o málo četné druhy, kde nebylo možno statisticky průkazně dokázat změnu.

Mykobiota lokalit se nijak výrazně nelišila, což bychom mohli připsat tomu, že pokud bylo možno na daných lokalitách pěstovat šťovík krmný již sedm let s požadovanými výnosy biomasy, nebylo okolní prostředí limitujícím prvkem pro rostlinu ani pro její mykobiotu. Větší rozdíly v mykbiotě bychom patrně mohli sledovat při porovnání čerstvě vysetého porostu a porostu staršího, kde by také houby neměly možnost být uchovávány v přezimující části rostliny a pak se z ní případně šířit.

5.4 Vyhodnocení infekčního pokusu

V infekčním pokusu byly použity houby, které jsou známými patogeny různých rostlin – *Cladosporium cladosporioides*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* a *Phomopsis* sp. U žádného z testovaných kmenů se však neprokázala patogenita vůči rostlinám šťovíku. Žádná z uvedených hub však není známa jako patogen šťovíku, *Phomopsis durandiana* je pak pouze saprofytem *R. acetosa* a *R. obtusifolius* (Ellis et Ellis, 1997). *Cladosporium* a *Alternaria* byly izolovány jako endofyty z *R. acetosa* (Wearn et al., 2012). *Acremonium strictum* a *Fusarium* sporulovaly v kultuře neochotně a tak nebyly v infekčním pokusu použity. Ale ani jeden z těchto druhů není znám jako patogen šťovíku.

Asi nejznámějšími patogeny šťovíků jsou *Ramularia rubella*, *Venturia rumicis* a *Uromyces rumicis* (Hatcher et Paul, 2000; Silva et al., 1997; Hatcher et al., 1997; Hatcher et al., 1994).

U žádné z hub izolovaných ze skvrnitostí se tedy neprokázalo, že by šlo o původce listových nebo stonkových skvrnitostí šťovíku krmného.

5.5 *Phomopsis* sp.

Phomopsis sp. (teleomorfa *Diaporthe eres*), byla již při předchozích pokusných odběrech provedených Davidem Novotným ve VÚRV v Praze – Ruzyni izolována ze skvrn na šťovíku. *Phomopsis durandiana* je pak známa jen jako saprofyt stonků (Ellis et Ellis, 1997). V infekčním pokusu nebyla prokázána patogenita izolovaných kmenů. Takže můžeme předpokládat, že izolovaný druh není patogenem šťovíku krmného.

K *Diaporthe eres* Nitschke dle Index Fungorum náleží jako synonymum několik anamorf *Phomopsis*: *P. ambigua* Traverso, *P. conorum* (Sacc.) Died., *P. controversa* (Sacc.) Traverso, *P. oblonga* (Desm.) Traverso, *P. ophites* (Sacc.) Traverso, *P. velata* (Sacc.) Traverso. Ani po porovnání sekvencí ITS s databází GenBank nemohl být s určitostí přiřazen druh.

6. ZÁVĚR

V této diplomové práci byla studována endofytická mykobiota zdravých rostlin šťovíku krmného a mykobiota skvrnitostí nadzemní části rostlin. Houby byly izolovány klasickou kultivační metodou z kořene, stonku a listu zdravých rostlin a ze skvrn listu a stonku. Kultivované houby byly rozřazeny do morfotypů a ty pak byly morfologicky určovány. Z reprezentativních kmenů morfotypů byla izolována DNA a byl osekvenován ITS úsek. Sekvence byly srovnány s databází GenBank, byly tak určeny i některé sterilní morfotypy.

Celkem bylo na šťovíku krmném identifikováno 31 morfotypů hub. Druhové složení mykobioty zdravých rostlin a rostlin se skvrnitostmi se příliš nelišilo. Mezi endofyty byli nejčastější *Clonostachys rosea* f. *rosea*, *Cladosporium cladosporioides*, *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* a *Alternaria alternata*, ze zdravých rostlin bylo izolováno celkem 24 morfotypů. Ve skvrnách se pak nejčastěji vyskytovaly *A. strictum*, *Aureobasidium pulluans*, *C. cladosporioides*, *C. rosea* f. *rosea* a *Fusarium proliferatum*, celkem se zde vyskytovalo 29 morfotypů.

Kromě druhu *Phomopsis* sp. nebyl žádný morfotyp nalezen pouze na jedné lokalitě. *Phomopsis* sp., která byla izolována ze skvrn již při předchozích pokusech v Praze-Ruzyni, se vyskytovala pouze na poli u Štipoklas. V infekčním pokusu se ale neprokázal její patogenní charakter. *Alternaria alternata* se vyskytovala více na stonku a to jak u zdravých rostlin, tak u těch se skvrnitostmi. *Acremonium strictum* typu 1 bylo pak častější na listech. U několika druhů můžeme sledovat vývoj v četnosti během sezony, ostatní však byly zastoupeny celou sezónou zhruba stejně.

V infekčním pokusu provedeném se sporulujícími kmeny potenciálně patogenních druhů hub se neprokázalo, že by některý z nich způsoboval skvrnitosti. Žádná z izolovaných hub také není známa jako původce onemocnění rostlin šťovíku. Některé druhy jsou však patogeny jiných kulturních plodin.

7. LITERATURA

- Abu-Taleb A.M., El-Deeb K., Al-Otibi F.O. (2011): Assessment of antifungal activity of *Rumex vesicarius* L. and *Ziziphus spina-christi* (L.) Willd. extracts against two phytopathogenic fungi. African Journal of Microbiology Research, 5 (9):1001-1011.
- Bandyopadhyay R., Mughogho L.K., Satyanarayana M.V. (1987): Systemic Infection of *Sorghum* by *Acremonium strictum* and Its Transmission Through Seed. Plant Disease 71(7):647-650.
- Brandenburger W. (1985): Parasitische Pilze an Gefässpflanzen in Europa. Stuttgart, 1248 p.
- Carroll G.C. (1986): The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. – In: Fokkema N. J., Heuvel J. (eds.), Microbiology of phyllosphere. Cambridge, p. 205-222.
- Chatterton S., Jayaraman J., Punja Z.K. (2008): Colonization of cucumber plants by the biocontrol fungus *Clonostachys rosea* f. *catenulata*. Biological Control 46:267-278.
- Chatterton S., Punja Z.K. (2009): Chitinase and β -1,3-glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea* f. *catenulata* against fungal plant pathogens. Canadian Journal of Microbiology 55:356-367.
- Cheplick G.P., Clay K. (1988): Acquired chemical defences in grasses: the role of fungal endophytes. Oikos, 52(3):309-318.
- Choi G.J., Lee S.-W., Jang K.S., Kim J.-S., Cho K.Y., Kim J.-C. (2004): Effects of chrysophanol, parietin, and nepodin of *Rumex crispus* on barley and cucumber powdery mildews. Crop protection 23:1215-1221.
- Cota L.V., Maffia L.A., Mizubuti E.S.G., Macedo P.E.F., Antunes R.F. (2008): Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. Biological Control 46:515-522.
- Ellis M.B., Ellis J.P. (1997): Microfungi on land plants – An identification handbook. Slough, 868 p.

- Eriksen M., Bjureke K.E., Dhillion S.S. (2002): Mycorrhizal plants of traditionally managed boreal grasslands in Norway. *Mycorrhiza*, 12:117-123.
- Fiala M. (2009): Mandelinka ředkvičková [online]. 08-08-2013. Dostupné na: www.biolib.cz/cz/taxonimage/id81800/?taxonid=11796
- Goz Gastro s.r.o. (2008): Mapa ČR. 08-08-2013. <http://www.gozgastro.cz/cs/servis/ceska-republika/plzensky-kraj.html>
- Hatcher P.E. (1996): The effect of insect-fungus interactions on the autumn growth and overwintering of *Rumex crispus* and *R. obtusifolius* seedlings. *Journal of Ecology*, 84: 101-109.
- Hatcher P.E., Paul N.D. (2000): Beetle grazing reduces natural infection of *Rumex obtusifolius* by fungal pathogens. *New phytologist*, 146: 325-333.
- Hatcher P.E., Paul N.D., Ayres P.G., Whittaker J.B. (1994): The effect of an insect herbivore and a rust fungus individually, and combined in sequence, on the growth of two *Rumex* species. *New phytologist* 128:71-78.
- Hatcher P.E., Paul N.D., Ayres P.G., Whittaker J.B. (1997): Added soil nitrogen does not allow *Rumex obtusifolius* to escape the effects of insect-fungus interactions. *Journal of Applied Ecology* 34:88-100.
- Honsová H. (2012): Proti erozi i na energetické využití. *Biom.cz* [online]. 2012-11-27. <http://biom.cz/czp/odborne-clanky/proti-erozi-i-na-energeticke-vyuziti>. ISSN: 1801-2655.
- Hussain F., Ahmad B., Hameed I., Dastagir G., Sanaullah P., Azam S. (2010): Antibacterial, antifungal and insecticidal activities of some selected medicinal plants of Polygonaceae. *African Journal of Biotechnology* 9(31): 5032-5036.
- Hutla P., Jevič P., Mazancová J., Plíštil D. (2005): Emission from energy herbs combustion. *Research in Agricultural Engineering*, 51(1): 28-32.
- Ippolito A., Ghaouth A. El, Wilson C.L., Wisniewski M. (2000): Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Postharvest Biology and Technology* 19:265-272.

- Ja C.G., Kim J.-C., Jang K.S., Cho K.Y., Kim H.T. (2008): Mycoparasitism of *Acremonium strictum* BCP on *Botrytis cinerea*, the Gray Mold Pathogen. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18(1):167-170.
- Jensen B., Knudsen I.M.B., Jensen D.F. (2000): Biological seed treatment of cereals with fresh and long-term stored formulations of *Clonostachys rosea*: Biocontrol efficacy against *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology* 106:233-242.
- Kim J.-C., Choi G.J., Lee S.-W., Kim J.-S., Chung K.Y., Cho K.Y. (2004): Screening extracts of *Achyranthes japonica* and *Rumex crispus* for activity against various plant pathogenic fungi and control of powdery mildew. *Pest Management Science*, 60:803-808.
- Larena I., Torres R., Cal A. De, Linan M., Melgarejo P., Domenichini P., Bellini A., Mandrin J.F., Lichou J., Ochoa de Eribe X., Usall J. (2005): Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*. *Biological Control* 32:305-310.
- Martinková Z., Honěk A. (2004): *Gastrophysa viridula* (Coleoptera: Chrysomelidae) and biocontrol of *Rumex* – a review. *Plant, soil and environment*, 50(1): 1-9.
- Nielsen H.K. (2008): Sorrel and reed canary grass in southern Norway. *Aspects of applied biology – Biomass and energy crops*, 90:75-79.
- Omarova M.A., Artamonova N.A., Chasovitina G.M. (1998): Chemical composition of the hybrid *Rumex* K-1. *Chemistry of natural compounds*, 34(4): 426-428.
- Petrini O. (1986): Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. – In: Fokkema N. J., Heuvel J. (eds.), *Microbiology of phyllosphere*. Cambridge, p. 175-187.
- Petrini O. (1991): Fungal endophytes of tree leaves. – In: Andrews J. H., Hirano S. S. (eds.), *Microbial ecology of leaves*. New York, p. 179-197.
- Petrzik K. (2009): Occurrence of potato virus X on hybrid dock in Czech republic. *Acta virologica*, 53:49-52.

- Petříková V. (2003): Krmný (energetický) šťovík není nebezpečný plevel. Biom.cz [online]. 2012-11-27. <http://biom.cz/czp/odborne-clanky/krmny-energeticky-stovik-neni-nebezpecny-plevel>. ISSN: 1801-2655.
- Petříková V. (2012): Krmná plodina – Rumex OK 2. Biom.cz [online]. 2012-11-27. <http://biom.cz/czp/odborne-clanky/krmna-plodina-rumex-ok-2>. ISSN: 1801-2655.
- Petříková V. (2012): Současné uplatnění energie z fytomasy – z Rumexu OK 2. Biom.cz [online]. 2012-11-27. <http://biom.cz/czt/odborne-clanky/soucasne-uplatneni-energie-z-fytomasy-z-rumexu-ok-2>. ISSN: 1801-2655.
- Petříková V., Sladký V., Stražil Z., Šafařík M., Ust'ak S., Váňa J. (2006): Energetické plodiny. Praha, 127 p.
- Rivera-Varas V.V., Freeman T.A., Gudmestad N.C., Secor G.A. (2007): Mycoparasitism of *Helminthosporium solani* by *Acremonium strictum*. Biological Control 97(10):1331-1337.
- Schena L., Ippolito A., Zahavi T., Cohen L., Nigro F., Droby S. (1999): Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. Postharvest Biology and Technology 17:189-199.
- Silva L., Tavares J., Brasseur R. (1997): *Ramularia rubella* and *Uromyces rumicis* infecting *Rumex obtusifolius* in the Azores. Acoreana, 8(3):375-381.
- Tagne A., Neergaard E., Hansen H.J., The C. (2002): Studies of host-pathogen interaction between maize and *Acremonium strictum* from Cameroon. European Journal of Plant Pathology 108:93-102.
- Ust'ak S. (2012): Pěstování šťovíku krmného pro výrobu bioplynu. Praha, 32 p.
- Wearn J.A., Sutton B.C., Morley N.J., Gange A.C. (2012): Species and organ specificity of fungal endophytes in herbaceous grassland plants. Journal of ecology, 100:1085-1092.
- Xue A.G. (2003): Biological Control of Pathogens Causing Root Rot Complex in Field Pea Using *Clonostachys rosea* Strain ACM941. Biological Control 93(3):329-335

Zhuang P., Yang Q.W., Wang H.B., Shu W.S. (2007): Phytoextraction of heavy metals by eight plant species in the field. *Water, Air & Soil Pollution*, 184: 235-242.

Zhuang P., Ye Z.H., Lan C.Y., Xie Z.W., Shu W.S. (2005): Chemically assisted phytoextraction of heavy metal contaminated soils using three plant species. *Plant and Soil*, 276:153-162.

Internetové databáze aktuální ke dni 9.8.2013

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

www.indexfungorum.org

www.mapy.cz

www.mycobank.org