

**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, 2015

**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, 13.08.2015

.....

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 a Janu Lukášovi za pomoc se statistickým vyhodnocením dat. 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 trpělivost.

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.

Vzorky byly odebrány ze 4 lokalit v České republice, ve třech odběrech v průběhu vegetační sezony. Endofyty byly izolovány z kořene, stonku a listu. Houby asociované se skvrnami byly izolovány ze stonku a listu.

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.

Nejčastějšími endofyty byly *Clonostachys rosea* f. *rosea*, *Cladosporium cladosporioides*, *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus*, *Alternaria alternata* a *Acremonium strictum* typ 1. Nejčastějšími houbami asociovanými se skvrnami byly *Acremonium strictum* typ 1, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Acremonium strictum* typ 2 a *Clonostachys rosea* f. *rosea*. Na množství druhů a vzorků kolonizovaných houbami měl největší vliv měsíc odběru, dále se významně lišil kořen od nadzemní části rostliny.

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.

Samples were collected from 4 sites in Czech republic, in three samplings during the vegetation season. Endophytes were isolated from root, stem and leaf. Fungi associated with spots were isolated from stem and leaf.

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.

The most common endophytes were *Clonostachys rosea* f. *rosea*, *Cladosporium cladosporioides*, *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus*, *Alternaria alternata* a *Acremonium strictum* typ 1. The most common fungi associated with spots were *Acremonium strictum* typ 1, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Acremonium strictum* typ 2 a *Clonostachys rosea* f. *rosea*. On number of species and number of specimens colonized by fungi had the greatest influence month of collection, the root differed from the above ground part of plant significantly.

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.....	7
2. Literární přehled.....	8
2.1 Šťovík krmný.....	8
2.2 Využití šťovíku v energetice a pícninářství.....	9
2.3 Škůdci a choroby šťovíku krmného.....	11
2.4 Interakce mandelinky ředkvičkové a hub na šťovíku.....	12
2.5 Houby šťovíku.....	13
2.6 Seznam použitých zkratk.....	18
3. Materiál metody.....	19
3.1 Lokality.....	19
3.2 Odběry.....	22
3.3 Sterilizace a izolace vzorků.....	24
3.4 Určování izolovaných hub.....	25
3.5 Infekční pokus.....	26
3.6 Analýza dat.....	27
4. Výsledky.....	28
4.1 Houby šťovíku krmného.....	28
4.2 Rozdíly ve skladbě endofytické mykobioty a mykobioty asociované se skvrnami.....	30
4.2.1 Skladba endofytické mykobioty.....	30
4.2.2 Skladba mykobioty asociované se skvrnami.....	36
4.2.3 Rozdíly mezi endofytickou mykobiotou a mykobiotou asociovanou se skvrnami.....	41
4.3 Infekční pokus.....	44
4.4 <i>Phomopsis</i> sp. ....	46
5. Diskuze.....	47
5.1 Metodika.....	47
5.2 Antifungální účinky šťovíku.....	49
5.3 Druhová skladba mykobioty šťovíku krmného.....	50
5.4 Infekční pokus.....	56
5.5 <i>Phomopsis</i> sp. ....	57
6. Závěr.....	58
7. Literatura.....	59

# 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 ne odborném 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? Způsobuje *Phomopsis* sp. skvrnitosti stonku či listu u šťovíku?
- 4) Má na složení mykobioty šťovíku vliv nadmořská výška, v níž jsou rostliny pěstovány? Mění se mykobiota v průběhu sezony? Liší se mykobiota jednotlivých částí rostliny? Liší se mykobiota zdravých rostlin a mykobiota asociovaná se skvrnami?

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<sub>x</sub> 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).

Požerek 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	<i>Rumex</i> sp.	Ellis et Ellis, 1997
<i>Crocicreas cyathoideum</i> var. <i>cacaliae</i>	Helotiales	Saprofyt	stonek	<i>R. acetosa</i>	Ellis et Ellis, 1997
<i>Belonidium sulphureum</i> (v literárním pramenu pod jménem <i>Dasyscyphus sulphureus</i> )	Helotiales	Saprofyt	stonek	<i>Rumex</i> sp.	Ellis et Ellis, 1997
<i>Dendryphiella vinosa</i>	Pleosporales	Saprofyt	stonek	<i>Rumex</i> sp.	Ellis et Ellis, 1997
<i>Diaporthe pardalota</i>	Diaporthales	Saprofyt	stonek	<i>Rumex</i> sp.	Ellis et Ellis, 1997
<i>Erysiphe polygoni</i>	Erysiphales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Hymenoscyphus consobrinus</i> (v literárním pramenu pod jménem <i>Helotium consobrinum</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	<i>Rumex</i> sp.	Ellis et Ellis, 1997
<i>Keissleriella gallica</i>	Pleosporales	Saprofyt	stonek	<i>R. acetosa</i>	Ellis et Ellis, 1997
<i>Paraleptosphaeria makrospora</i> (v literárním pramenu pod jménem <i>Leptosphaeria makrospora</i> )	Pleosporales	Saprofyt	stonek	<i>Rumex</i> sp.	Ellis et Ellis, 1997
<i>Leptosphaeria ogilviensis</i>	Pleosporales	Saprofyt	stonek	<i>Rumex</i> sp.	Ellis et Ellis, 1997
<i>Leveillula</i> sp.	Erysiphales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Pyrenopeziza polygoni</i> (v literárním pramenu pod jménem <i>Mollisia polygoni</i> )	Helotiales	Saprofyt	stonek	<i>R. acetosella</i>	Ellis et Ellis, 1997
<i>Ovularia canegricola</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>Phoma acetosellae</i> (v literárním pramenu pod jménem <i>Phyllosticta 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. acetosella</i> , <i>R. hydrolapathum</i>	Ellis et Ellis, 1997; Brandenburger, 1985
<i>Ramularia rubella</i>	Capnodiales	Patogen	listy	<i>R. acetosa</i> , <i>R. conglomeratus</i> , <i>R. crispus</i> , <i>R. 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>Helicobasidium purpureum</i> (v literárním pramenu pod jménem <i>Rhizoctonia crocorum</i> )	Cantharellales	Patogen	kořeny	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Botryotinia fuckeliana</i> (v literárním pramenu pod jménem <i>Sclerotinia fuckeliana</i> )	Helotiales	Saprofyt	stonek	<i>Rumex</i> sp.	Ellis et Ellis, 1997
<i>Septoria rumicis</i>	Capnodiales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Sphaeropsis</i> sp.	Botryosphaerales	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	<i>Rumex</i> sp.	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>Physoderma</i> sp. (v literárním pramenu pod jménem <i>Urophlyctis</i> sp.)	Blastocladales	Patogen	květy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Microbotryum goeppertianum</i> (v literárním pramenu pod jménem <i>Ustilago goeppertiana</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>Microbotryum parlatoarei</i> (v literárním pramenu pod jménem <i>Ustilago parlatoarei</i> )	Ustilaginales	Patogen	listy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Microbotryum stygium</i> (v literárním pramenu pod jménem <i>Ustilago stygia</i> )	Ustilaginales	Patogen	květy	<i>Rumex</i> spp.	Brandenburger, 1985
<i>Microbotryum warmingii</i> (v literárním pramenu pod jménem <i>Ustilago 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 vyrosté 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*), 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 *internal transcribed spacer*, mezerník mezi sekvencí malé a velké ribozomální podjednotky
- cf.      latinsky *confer*, určení druhu je nejisté, jedná se o druh podobný uvedenému druhu
- f.      latinsky *forma*, forma druhu
- var.      latinsky *varietas*, varieta druhu
- f. sp.      latinsky *forma specialis*, obvykle označení pro druh parazita specializovaný na určitého hostitele
- sp.      latinsky *species*, 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' 649 - 665 m n.m.) a Štipoklasy (okres Klatovy; GPS: N 49°24.86097', E 13°32.01385' a asi 621 - 652 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 - 381 m n.m.) a Kněžice (okres Nymburk; GPS: N 50°15.51555', E 15°18.64093' a asi 228 - 229 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**

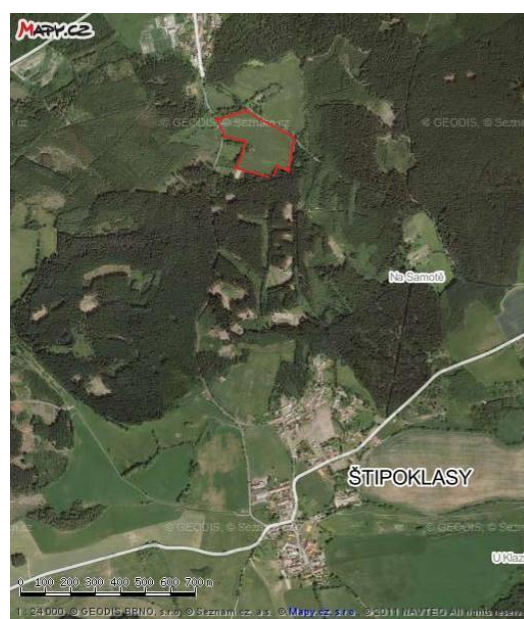
Lokalita	Půdní reakce	Půdní reakce	Sušina	Obsah přijatelných živin mg/kg půdy v sušině			
	pH/KCl	pH/H <sub>2</sub> O	%	P	K	Ca	Mg
Pohoří	4,40	5,42	97,95	105	192	1054	108
Štipoklasy	5,70	6,52	98,13	224	805	1823	198
Lubník	5,77	6,80	97,96	53,2	117	2566	160
Kněžice	6,14	7,18	96,09	46,8	402	5637	348

**Tab. 3: Výsledky agrochemického rozboru půd**

Lokalita	Cox	Humus	Nt	Potřeba vápnění
	% 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](http://www.gozgastro.cz), 2013).



Obr. 4 a 5: Poloha lokalit: červeně je vyznačena lokalita se šťovíkem, na obr. 4 – u obce Pohorí, na obr. 5 – u obce Štipoklasy. (mapa – [www.seznam.cz](http://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](http://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
<b>Lubník</b>	0	0	20	20	20	20	40	40
<b>Kněžice</b>	6	14	20	20	20	20	46	54
<b>Štipoklasy</b>	2	18	20	20	20	0	42	38
<b>Pohoří</b>	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 (5 mg/l). Vzorky byly inkubovány při 25°C 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 amlifikována 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  $\mu$ l.**

Reagencie	Objem v $\mu$ l
H <sub>2</sub> O pro PCR	19,1
PCR pufr (10x)	2,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5
Primer ITS1 (100 $\mu$ M)	0,25
Primer ITS4 (100 $\mu$ M)	0,25
Směs dNTP (25 mM)	0,2
Taq DNA polymeráza (5 U/ $\mu$ 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 – 25<sup>0</sup>C den a 16<sup>0</sup>C noc; světelný režim: 14h den/10h noc; 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 10<sup>4</sup> 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

Primární tabulky a graf porovnávající endofyty a houby asociované se skvrnami byly vytvořeny v programu Excel.

Byly provedeny dvě hlavní analýzy dat. Pro porovnání počtu druhů a počtu vzorků kolonizovaných houbou na jednotlivých snímcích (charakterizovaných lokalitou, měsícem odběru a rostlinným orgánem, z něhož byly odebírány vzorky) byl použit model GLZ s Poissonovým ln rozdělením. Pomocí této analýzy bylo vyhodnoceno, zda měla na počet druhů/kolonizovaných vzorků vliv lokalita, měsíc odběru nebo rostlinný orgán, z nějž byly odebrány vzorky. Tyto analýzy byly provedeny v programu Statistica 12.

Kromě toho byla provedena analýza v programu CANOCO 5. Zde byly provedeny analýzy DCA, PCA, a RDA pro zjištění vztahu jednotlivých druhů endofytů a hub asociovaných se skvrnitostmi s již zmíněnými faktory prostředí. Na základě výsledků jednotlivých analýz byla jako technika s největší výpovědní hodnotou pro naše účely vybrána analýza PCA s proměnnými prostředí.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 Houby šťovíku 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>	Diaporthaceae	Diaporthales	Sordariomycetes				
<i>Phomopsis</i> sp.							
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>rosea</i>							
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i>							
<i>Fusarium proliferatum</i>							
<i>Fusarium oxysporum</i>							
<i>Fusarium</i> sp.							
<i>Acrostalagmus luteoalbus</i>							
<i>Acremonium strictum</i> typ 1							
<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 Rozdíly ve skladbě endofytické mykobioty a mykobioty asociované se skvrnami

### 4.2.1 Skladba endofytické mykobioty

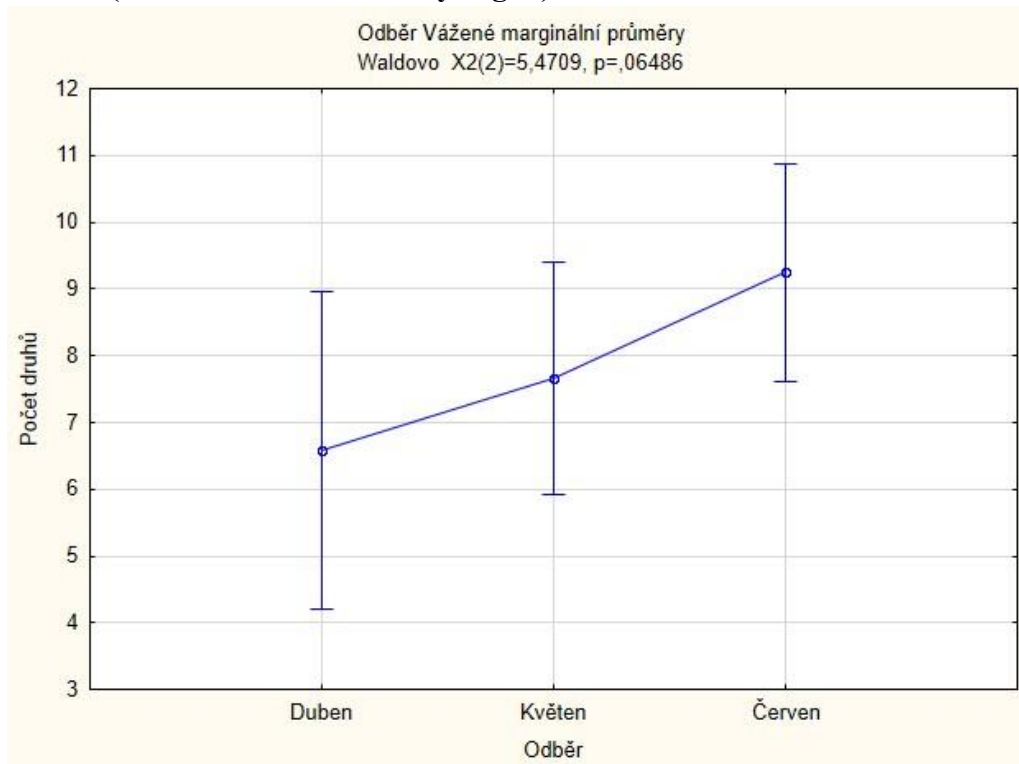
Pomocí Poissonova ln rozdělení (GLZ model) bylo zkoumáno, zda závisí počet zjištěných druhů endofytických hub a počet vzorků kolonizovaných houbami na lokalitě, rostlinném orgánu nebo na měsíci v němž byly vzorky odebrány. Při sledování současného vlivu všech tří faktorů se neprokázala žádná závislost počtu zjištěných druhů ani kolonizovaných vzorků na lokalitě (tab. 11), naopak se prokázala závislost na měsíci (graf 1 a 2, tab. 9) a na rostlinném orgánu (graf 3 a 4, tab. 10), z něžž byly vzorky odebrány. Počet druhů postupně narůstal v průběhu sezony, kdežto počet kolonizovaných vzorků výrazně vzrostl až při třetím odběru. Kořen byl jak druhově bohatší tak i více kolonizován houbami než nadzemní část rostliny (stonek a list).

Ještě nutno podotknout, že jeden vzorek může být kolonizován více houbami, proto celkový počet vzorků může být menší než součet kolonizovaných vzorků.

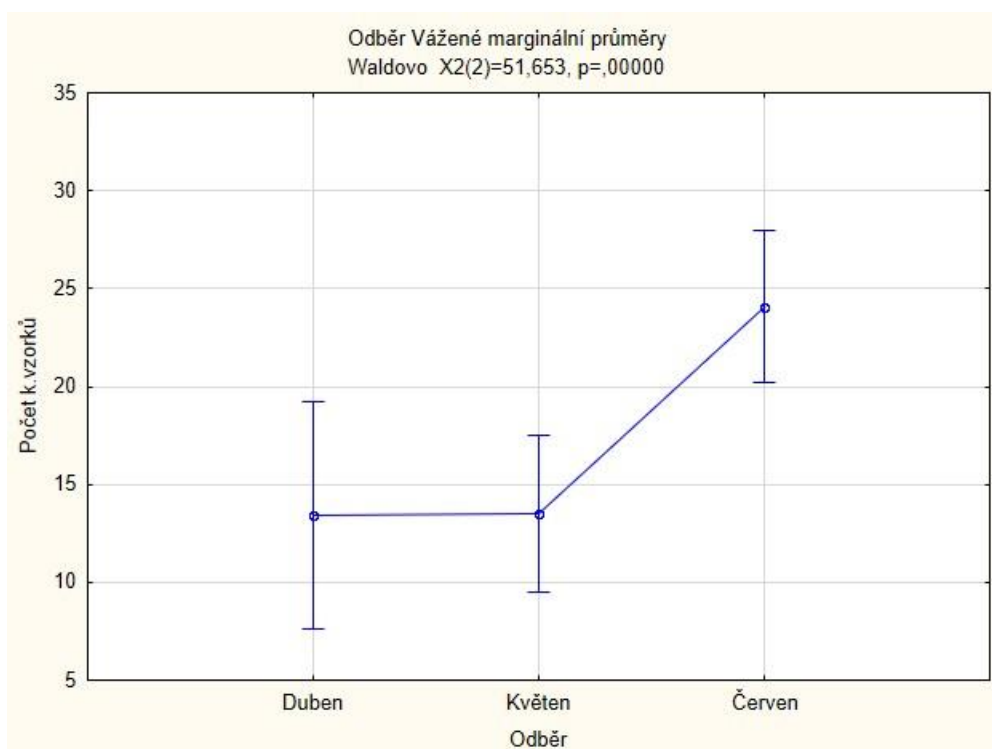
**Tab. 9: Četnost jednotlivých druhů endofytických hub v jednotlivých odběrech v průběhu sezony. Jednotka – počet kolonizovaných vzorků.**

Houba	1.odběr	2. odběr	3. odběr
<i>Acremonium</i> - like	6	9	12
<i>Acremonium</i> sp.	0	8	3
<i>Acremonium strictum</i> typ 1	17	12	17
<i>Acremonium strictum</i> typ 2	0	1	21
<i>Alternaria alternata</i>	9	1	37
<i>Aspergillus fumigatus</i>	10	3	17
<i>Aspergillus versicolor</i>	10	2	13
<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	4	0
<i>Botrytis cinerea</i>	0	0	2
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	18	20	34
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i>	0	12	4
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>rosea</i>	14	23	59
<i>Epicoccum nigrum</i>	22	11	9
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	2	0
<i>Fusarium proliferatum</i>	2	3	0
<i>Mycelium steriliun</i> I	0	7	5
<i>Mycelium steriliun</i> III	0	8	19
<i>Mycelium steriliun</i> V	1	0	0
<i>Mycelium steriliun</i> VI	8	1	0
<i>Mycelium steriliun</i> VII	0	3	0
<i>Penicillium</i> cf. <i>brasiliense</i>	30	6	6
<i>Penicillium</i> sp. 2	3	0	0
<i>Rhizopus arrhizus</i> var. <i>arrhizus</i>	9	24	23
<i>Verticillium dahliae</i>	2	3	7
<b>Prostý součet počtu kolonizovaných vzorků</b>	<b>162</b>	<b>163</b>	<b>288</b>
<b>Celkem morfortypů hub</b>	<b>16</b>	<b>21</b>	<b>17</b>
<b>Celkem zkoumaných vzorků</b>	<b>240</b>	<b>240</b>	<b>240</b>

**Graf 1: Srovnání velikosti diverzity v závislosti na měsíci odběru podle počtu zjištěných druhů endofytických hub. Porovnání pomocí modelu GLZ při současném sledování všech faktorů (lokalita/sezona/rostlinný orgán).**



**Graf 2: Porovnání počtu vzorků kolonizovaných endofyty podle měsíce odběru. Porovnání pomocí modelu GLZ při současném sledování všech faktorů (lokalita/sezona/rostlinný orgán). Jednotka – počet kolonizovaných vzorků.**

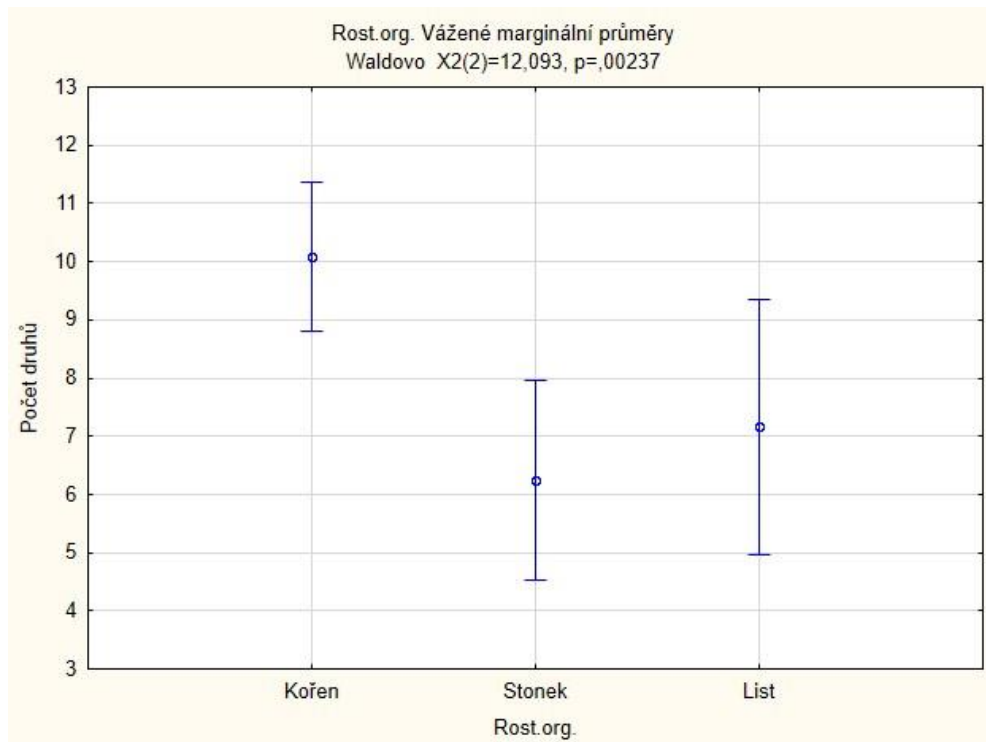


**Tab. 10: Četnost jednotlivých druhů endofytických hub na kořenu, stonku a listu. Jednotka – počet kolonizovaných vzorků.**

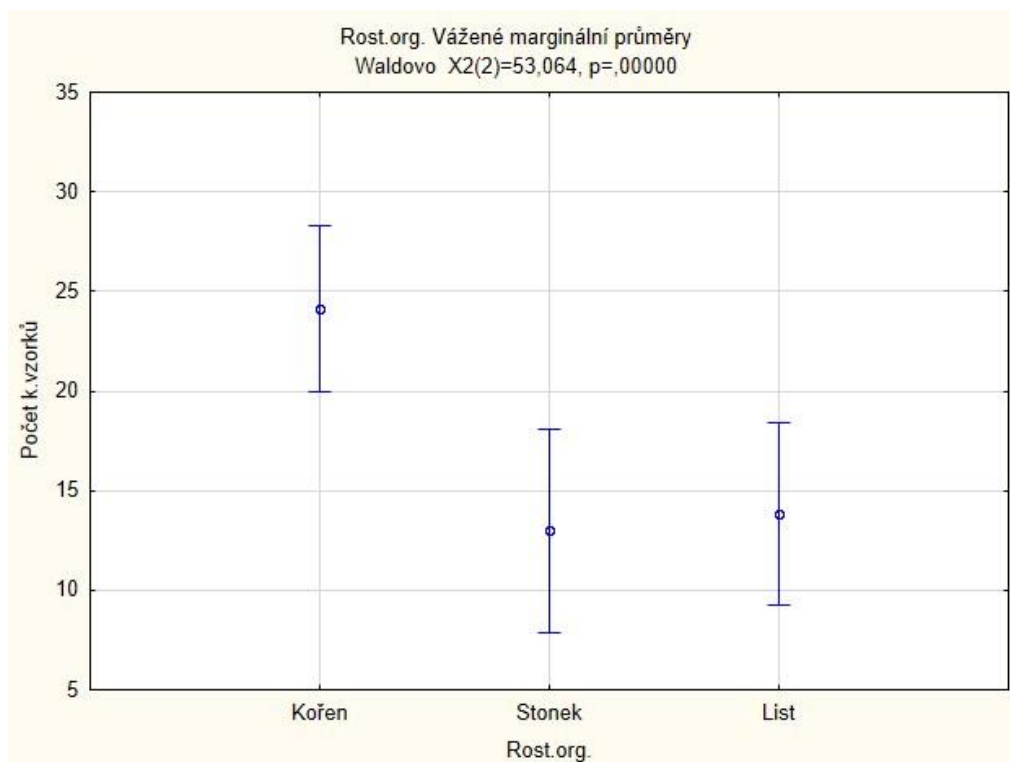
Houba	Kořen	Stonek	List
<i>Acremonium</i> - like	11	6	10
<i>Acremonium</i> sp.	3	3	5
<i>Acremonium strictum</i> typ 1	19	9	18
<i>Acremonium strictum</i> typ 2	6	11	5
<i>Alternaria alternata</i>	8	25	14
<i>Aspergillus fumigatus</i>	13	6	11
<i>Aspergillus versicolor</i>	14	9	2
<i>Aureobasidium pullulans</i>	2	1	1
<i>Botrytis cinerea</i>	1	1	0
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	39	18	15
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i>	8	3	5
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>rosea</i>	48	22	26
<i>Epicoccum nigrum</i>	32	1	9
<i>Fusarium oxysporum</i>	2	1	0
<i>Fusarium proliferatum</i>	3	1	1
<i>Mycelium steriliu</i> I	8	3	1
<i>Mycelium steriliu</i> III	19	4	4
<i>Mycelium steriliu</i> V	1	0	0
<i>Mycelium steriliu</i> VI	6	1	2
<i>Mycelium steriliu</i> VII	0	3	0
<i>Penicillium</i> cf. <i>brasiliense</i>	24	10	8
<i>Penicillium</i> sp. 2	1	1	1
<i>Rhizopus arrhizus</i> var. <i>arrhizus</i>	20	14	22
<i>Verticillium dahliae</i>	4	2	6
<b>Prostý součet počtu kolonizovaných vzorků</b>	292	155	166
<b>Celkem morfortypů hub</b>	23	23	20
<b>Celkem zkoumaných vzorků</b>	240	240	240



**Graf 3: Srovnání velikosti diverzity v závislosti na rostlinném orgánu podle počtu zjištěných druhů endofytických hub. Porovnání pomocí modelu GLZ při současném sledování všech faktorů (lokality/sezona/rostlinný orgán).**



**Graf 4: Porovnání počtu vzorků kolonizovaných endofytickou houbou u kořene, stonku a listu. Porovnání pomocí modelu GLZ při současném sledování všech faktorů (lokality/sezona/rostlinný orgán). Jednotka – počet kolonizovaných vzorků.**



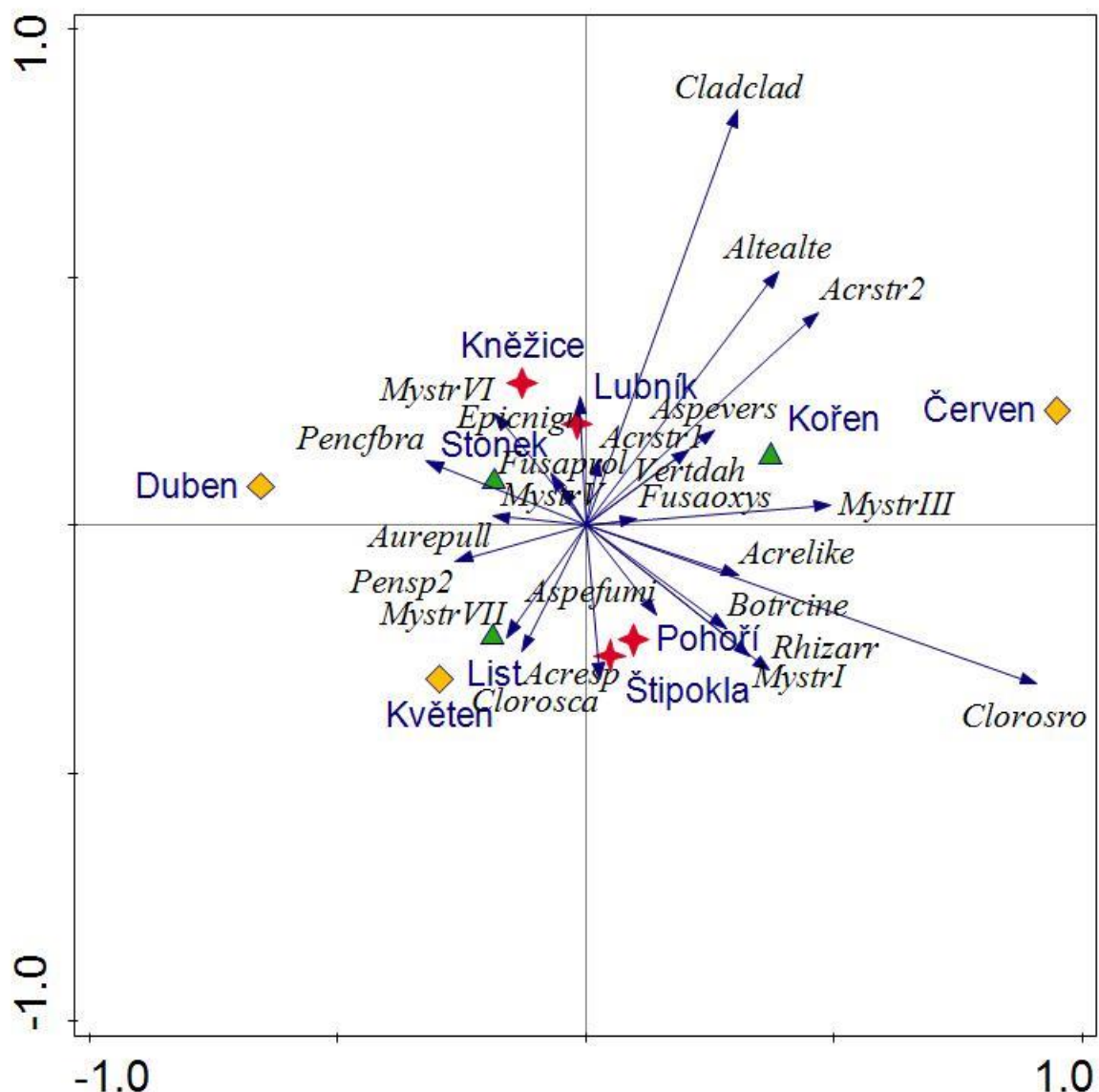
**Tab. 11: Četnost jednotlivých druhů endofytických hub na různých lokalitách. Jednotka – počet kolonizovaných vzorků.**

Houba	Lubník	Kněžice	Štipoklasy	Pohoří
<i>Acremonium</i> - like	11	3	8	5
<i>Acremonium</i> sp.	1	4	4	2
<i>Acremonium strictum</i> typ 1	11	14	12	9
<i>Acremonium strictum</i> typ 2	8	8	4	2
<i>Alternaria alternata</i>	20	12	3	12
<i>Aspergillus fumigatus</i>	9	1	13	7
<i>Aspergillus versicolor</i>	6	9	4	6
<i>Aureobasidium pullulans</i>	0	0	0	4
<i>Botrytis cinerea</i>	1	0	1	0
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	15	25	18	14
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i>	4	8	3	1
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>rosea</i>	22	18	28	28
<i>Epicoccum nigrum</i>	15	10	7	10
<i>Fusarium oxysporum</i>	0	1	2	0
<i>Fusarium proliferatum</i>	1	2	2	0
<i>Mycelium sterilius</i> I	4	2	4	2
<i>Mycelium sterilius</i> III	9	6	8	4
<i>Mycelium sterilius</i> V	0	0	1	0
<i>Mycelium sterilius</i> VI	5	3	0	1
<i>Mycelium sterilius</i> VII	1	1	0	1
<i>Penicillium</i> cf. <i>brasiliense</i>	21	7	8	6
<i>Penicillium</i> sp. 2	1	0	1	1
<i>Rhizopus arrhizus</i> var. <i>arrhizus</i>	13	9	16	18
<i>Verticillium dahliae</i>	5	2	5	0
<b>Prostý součet počtu kolonizovaných vzorků</b>	<b>183</b>	<b>145</b>	<b>152</b>	<b>133</b>
<b>Celkem morfortypů hub</b>	<b>21</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>19</b>
<b>Celkem zkoumaných vzorků</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>180</b>	<b>180</b>

Nejčastějšími endofyty byly druhy *Clonostachys rosea* f. *rosea*, *Cladosporium cladosporioides*, *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus*, *Alternaria alternata* a *Acremonium strictum* typ 1. V prvním odběru byl nejpočetnějším druhem taxon *Penicillium* cf. *brasiliense*, ve druhém, *R. arrhizus* var. *arrhizus* a ve třetím *C. rosea* f. *rosea*. Na kořeni a listu byl nejpočetnější druh *C. rosea* f. *rosea*, na stonku *A. alternata*. V Lubníku, Štipoklasech a Pohoří byl celkově nejpočetnějším druhem taxon *C. rosea* f. *rosea*, jen v Kněžicích byl druh *Cladosporium cladosporioides* častější.

Provedena byla také analýza PCA s vlivy prostředí v programu CANOCO 5 (graf 5). Zde můžeme sledovat určitou asociaci některých druhů s výše položenými lokalitami (Pohoří, Štipoklasy) oproti jiným asociovaným s níže položenými lokalitami (Lubník, Kněžice). Výraznější je pak asociace některých druhů s rostlinnými orgány (kořen, stonek, list) a měsícem odběru (duben, květen, červen). Provedeny byly i další analýzy v programu CANOCO (DCA, RDA), které však neposkytly lepší hodnocení výsledků.

**Graf 5: Vliv faktorů prostředí (lokality, měsíc odběru, rostlinný orgán) na výskyt endofytů (analýza PCA).**



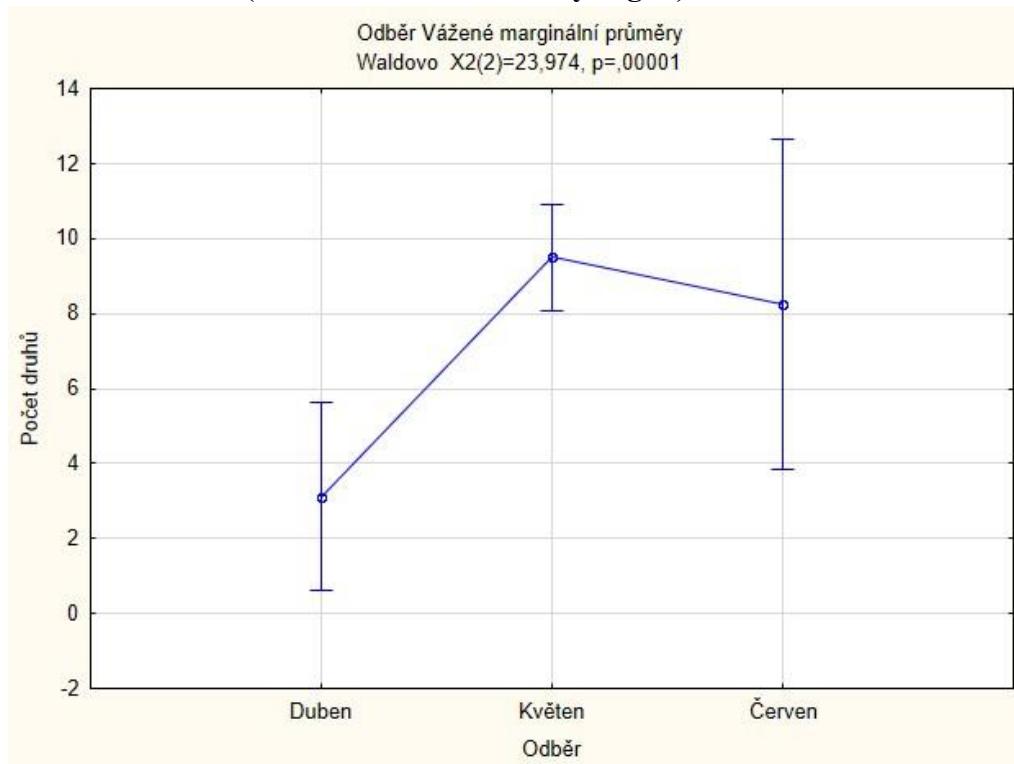
## 4.2.2 Skladba mykobioty asociované se skvrnami

Stejně jako endofytická mykobiota byla pomocí Poissonova ln rozdělení zkoumána i mykobiota asociovaná se skvrnami. Ani zde se neprokázal vliv lokality na počet druhů a kolonizovaných vzorků (tab. 14), ani rozdíl mezi rostlinnými orgány (tab. 13), protože vzorky ze skvrnitostí nebyly odebírány z kořene, ale jen z nadzemní části rostliny. Výraznější rozdíl lze sledovat pouze u vlivu sezony na jednotlivé odběry (tab. 12), kde dubnové odběry byly výrazně méně druhově bohaté (graf 6) a i počet kolonizovaných vzorků byl menší (graf 7).

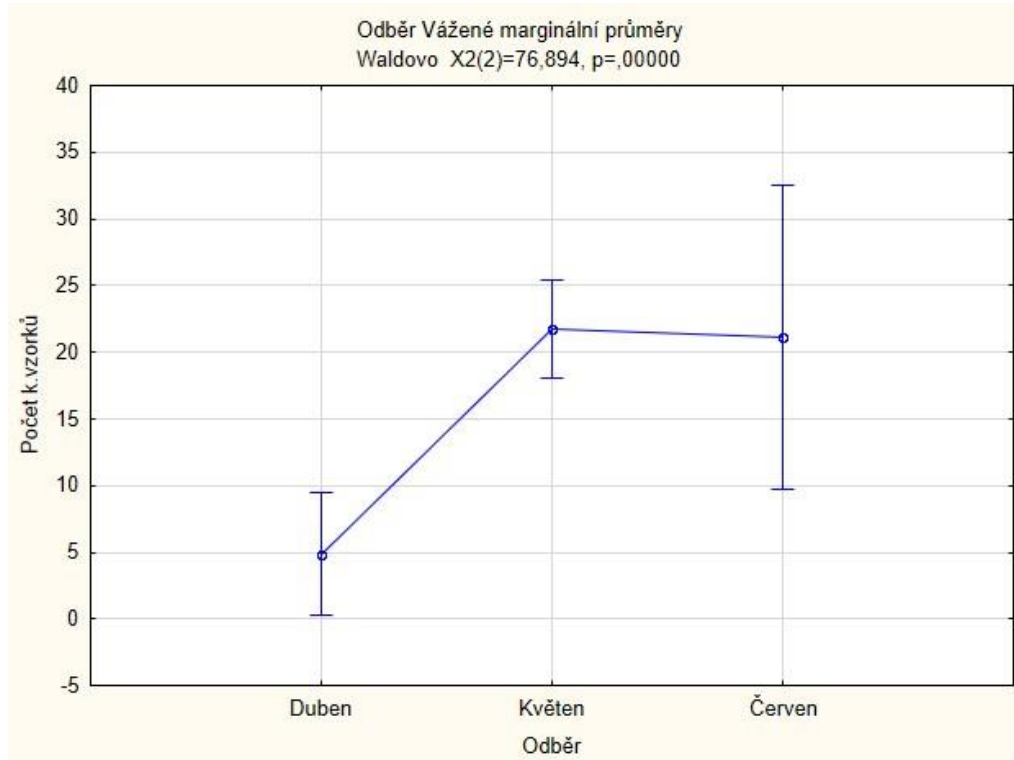
**Tab. 12: Četnost jednotlivých druhů hub asociovaných se skvrnami v jednotlivých odběrech v průběhu sezony. Jednotka – počet kolonizovaných vzorků.**

Houba	1. odběr	2. odběr	3. odběr
<i>Acremonium strictum</i> typ 1	11	31	21
<i>Acremonium</i> sp.	0	2	0
<i>Acremonium strictum</i> typ 2	0	12	18
<i>Acremonium</i> -like	1	2	1
<i>Acrostalagmus luteoalbus</i>	0	3	0
<i>Alternaria alternata</i>	0	1	20
<i>Aspergillus</i> sp. 1	1	1	0
<i>Aspergillus</i> sp. 2	0	0	2
<i>Aspergillus versicolor</i>	1	1	0
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	19	28
<i>Botrytis cinerea</i>	0	15	8
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	4	24	18
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i>	3	5	2
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>rosea</i>	1	19	5
<i>Epicoccum nigrum</i>	0	1	1
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	0	2
<i>Fusarium proliferatum</i>	3	4	17
<i>Fusarium</i> sp. 2	1	1	1
<i>Mycelium sterilius</i> I	0	9	10
<i>Mycelium sterilius</i> II	1	2	0
<i>Mycelium sterilius</i> III	3	9	6
<i>Mycelium sterilius</i> IV	0	0	3
<i>Mycelium sterilius</i> V	3	3	2
<i>Mycelium sterilius</i> VI	1	4	0
<i>Mycelium sterilius</i> VII	3	0	2
<i>Penicillium</i> sp. 2	0	2	1
<i>Phomopsis</i> sp.- <i>Diaporthe eres</i>	0	2	0
<i>Rhizopus arrhizus</i> var. <i>arrhizus</i>	0	2	0
<i>Verticillium dahliae</i>	0	0	1
<b>Prostý součet počtu kolonizovaných vzorků</b>	<b>39</b>	<b>174</b>	<b>169</b>
<b>Celkem morfotypů hub</b>	<b>16</b>	<b>24</b>	<b>21</b>
<b>Celkem zkoumaných vzorků</b>	<b>60</b>	<b>160</b>	<b>120</b>

**Graf 6: Srovnání velikosti diverzity v závislosti na měsíci odběru podle počtu zjištěných druhů hub asociovaných se skvrnami. Porovnání pomocí modelu GLZ při současném sledování všech faktorů (lokality/sezona/rostlinný orgán).**



**Graf 7: Porovnání počtu vzorků kolonizovaných houbami asociovanými se skvrnami podle měsíce odběru. Porovnání pomocí modelu GLZ při současném sledování všech faktorů (lokality/sezona/rostlinný orgán). Jednotka – počet kolonizovaných vzorků.**



**Tab. 13: Četnost jednotlivých druhů hub asociovaných se skvrnami na stonku a listu. Jednotka – počet kolonizovaných vzorků.**

Houba	List	Stonek
<i>Acremonium strictum</i> typ 1	37	26
<i>Acremonium</i> sp.	1	1
<i>Acremonium strictum</i> typ 2	20	10
<i>Acremonium</i> -like	2	2
<i>Acrostalagmus luteoalbus</i>	0	3
<i>Alternaria alternata</i>	7	14
<i>Aspergillus</i> sp. 1	1	1
<i>Aspergillus</i> sp. 2	0	2
<i>Aspergillus versicolor</i>	2	0
<i>Aureobasidium pullulans</i>	12	36
<i>Botrytis cinerea</i>	13	10
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	21	25
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i>	4	6
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>rosea</i>	10	15
<i>Epicoccum nigrum</i>	1	1
<i>Fusarium oxysporum</i>	2	1
<i>Fusarium proliferatum</i>	12	12
<i>Fusarium</i> sp. 2	0	3
<i>Mycelium sterilius</i> I	6	13
<i>Mycelium sterilius</i> II	2	1
<i>Mycelium sterilius</i> III	11	7
<i>Mycelium sterilius</i> IV	1	2
<i>Mycelium sterilius</i> V	5	3
<i>Mycelium sterilius</i> VI	1	4
<i>Mycelium sterilius</i> VII	2	3
<i>Penicillium</i> sp. 2	2	1
<i>Phomopsis</i> sp.- <i>Diaporthe eres</i>	1	1
<i>Rhizopus arrhizus</i> var. <i>arrhizus</i>	2	0
<i>Verticillium dahliae</i>	0	1
<b>Prostý součet počtu kolonizovaných vzorků</b>	<b>178</b>	<b>204</b>
<b>Celkem morfortypů hub</b>	<b>25</b>	<b>27</b>
<b>Celkem zkoumaných vzorků</b>	<b>169</b>	<b>171</b>

**Tab. 14: Četnost jednotlivých druhů hub asociovaných se skvrnami na různých lokalitách. Jednotka – počet kolonizovaných vzorků.**

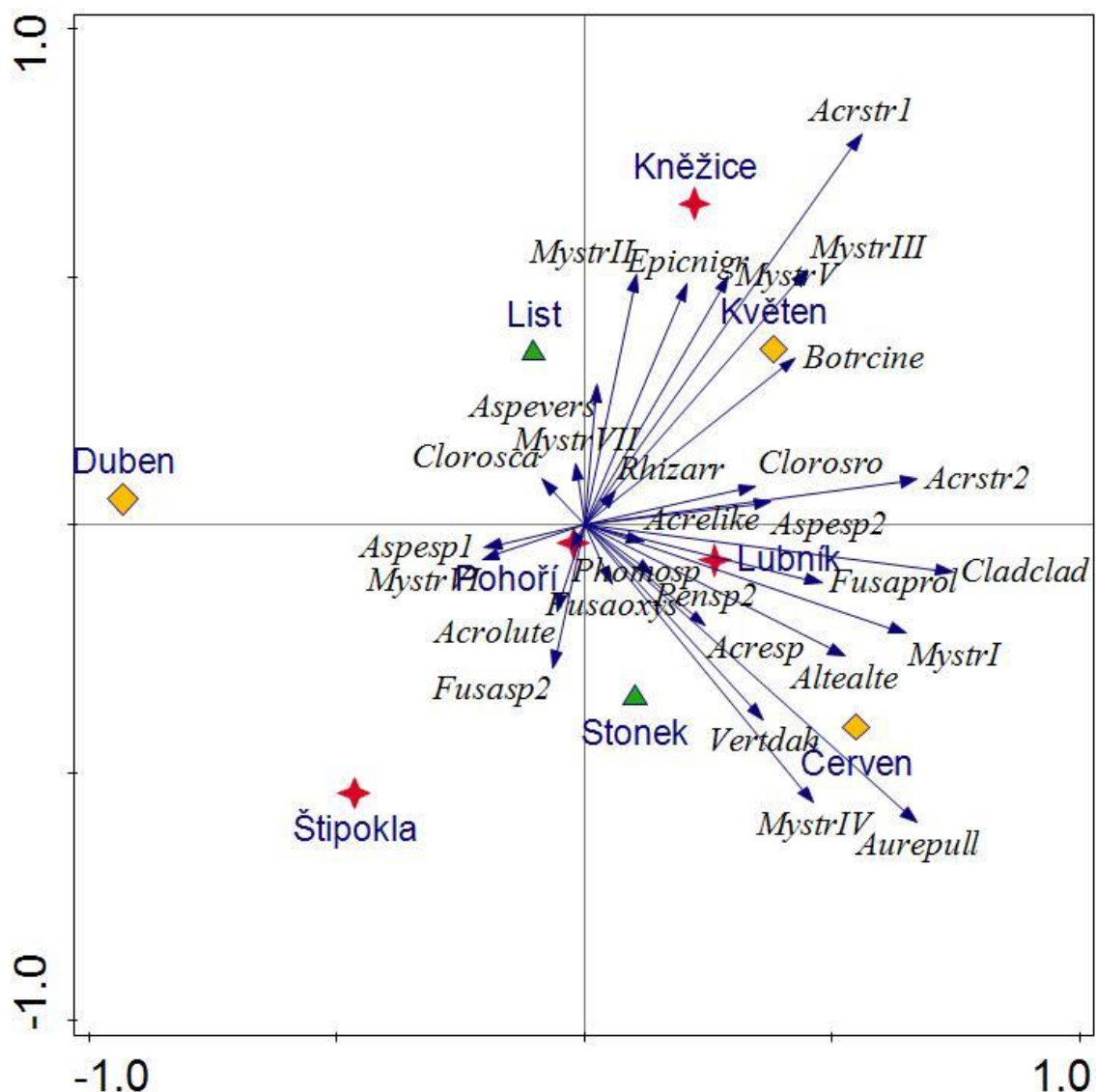
Houba	Lubník	Kněžice	Štipoklasy	Pohoří
<i>Acremonium strictum</i> typ 1	18	26	5	14
<i>Acremonium</i> sp.	1	0	1	0
<i>Acremonium strictum</i> typ 2	12	8	2	8
<i>Acremonium</i> -like	0	1	2	1
<i>Acrostalagmus luteoalbus</i>	1	0	2	0
<i>Alternaria alternata</i>	5	7	0	9
<i>Aspergillus</i> sp. 1	0	0	1	1
<i>Aspergillus</i> sp. 2	1	1	0	0
<i>Aspergillus versicolor</i>	0	0	1	1
<i>Aureobasidium pullulans</i>	17	4	16	11
<i>Botrytis cinerea</i>	4	5	2	12
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	16	13	7	10
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i>	1	5	4	0
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>rosea</i>	5	12	8	0
<i>Epicoccum nigrum</i>	1	1	0	0
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	0	2	0
<i>Fusarium proliferatum</i>	3	13	1	7
<i>Fusarium</i> sp. 2	0	0	1	2
<i>Mycelium sterilius</i> I	5	8	2	4
<i>Mycelium sterilius</i> II	0	1	0	2
<i>Mycelium sterilius</i> III	5	7	2	4
<i>Mycelium sterilius</i> IV	0	1	1	1
<i>Mycelium sterilius</i> V	1	3	2	2
<i>Mycelium sterilius</i> VI	0	0	5	0
<i>Mycelium sterilius</i> VII	0	5	0	0
<i>Penicillium</i> sp. 2	0	1	2	0
<i>Phomopsis</i> sp.- <i>Diaporthe eres</i>	0	0	2	0
<i>Rhizopus arrhizus</i> var. <i>arrhizus</i>	1	1	0	0
<i>Verticillium dahliae</i>	0	0	0	1
<b>Prostý součet počtu kolonizovaných vzorků</b>	<b>98</b>	<b>123</b>	<b>71</b>	<b>90</b>
<b>Celkem morfortypů hub</b>	<b>18</b>	<b>20</b>	<b>22</b>	<b>17</b>
<b>Celkem zkoumaných vzorků</b>	<b>80</b>	<b>100</b>	<b>80</b>	<b>80</b>

Nejčastějšími druhy hub asociovaných se skvrnami byly taxony: *Acremonium strictum* typ 1, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Acremonium strictum* typ 2 a *Clonostachys rosea* f. *rosea*. V prvním i druhém odběru byl nejčastějším druhem taxon *Acremonium strictum* typ 1, ve třetím odběru již byl častější druh *Aureobasidium pullulans*. Na listu bylo nejčetnější *A. strictum* typ 1, na stonku *A. pullulans*. Taxon *A. strictum* typ 1 byl

nejčastějším druhem na všech lokalitách kromě Štipoklas, kde byla častější houba *A. pullulans*.

Také u hub asociovaných se skvrnami byla provedena analýza PCA s faktory prostředí (lokalita, měsíc odběru, rostlinný orgán). Zde je patrný rozdíl i mezi lokalitami položenými v nížině (Lubník, Kněžice), který u endofytů nebyl patrný. Je také viditelný rozdíl mezi jednotlivými měsíci odběru (graf 8).

**Graf 8: Vliv faktorů prostředí (lokalita, měsíc odběru, rostlinný orgán) na výskyt jednotlivých druhů hub asociovaných se skvrnami (analýza PCA).**

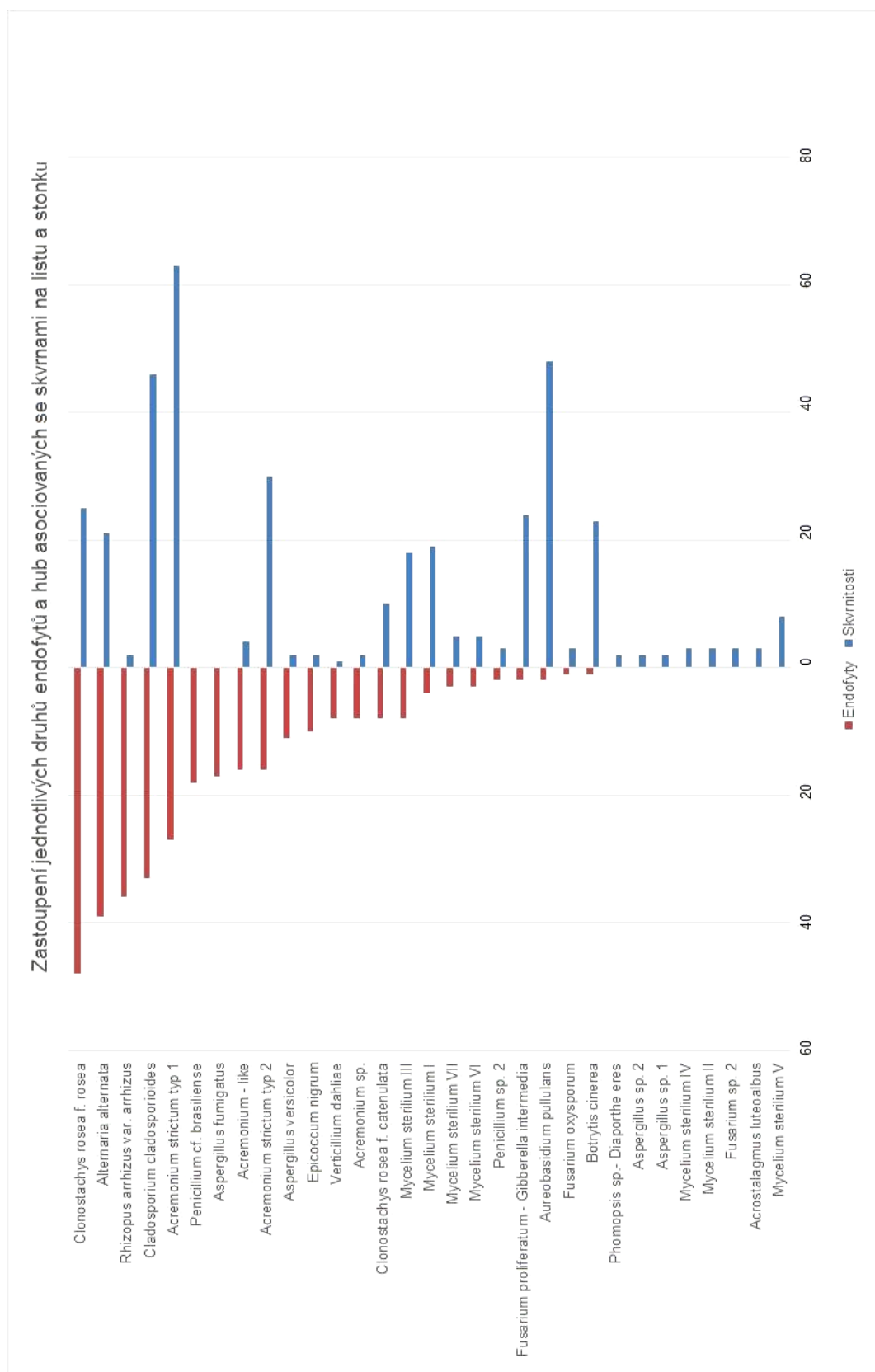




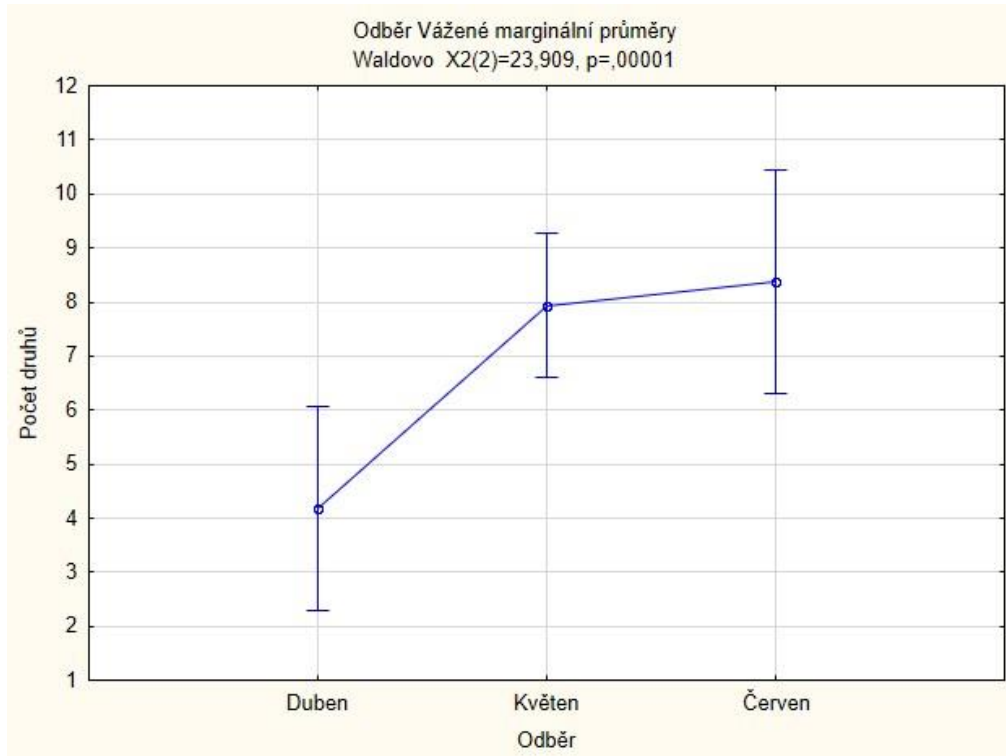
### **4.2.3 Rozdíly mezi endofytickou mykobiotou a mykobiotou asociovanou se skvrnami**

Bylo srovnáváno také složení endofytické mykobioty (vybrán pouze stonek a list) a mykobioty asociované se skvrnami. Ty se lišily zejména v druhové skladbě a v zastoupení jednotlivých druhů (graf 9). Pomocí Poissonova ln rozdělení (model GLZ) byl zkoumán také současný vliv všech faktorů prostředí na počet kolonizovaných vzorků a počet druhů u endofytů a hub asociovaných se skvrnami. I zde byl sledován pouze vliv měsíce odběru (grafy 10 a 11). Počet druhů i kolonizovaných vzorků postupně rostl v každém odběru. Mezi rostlinnými orgány (stonek, list) a lokalitami nebyl zjištěn významný rozdíl.

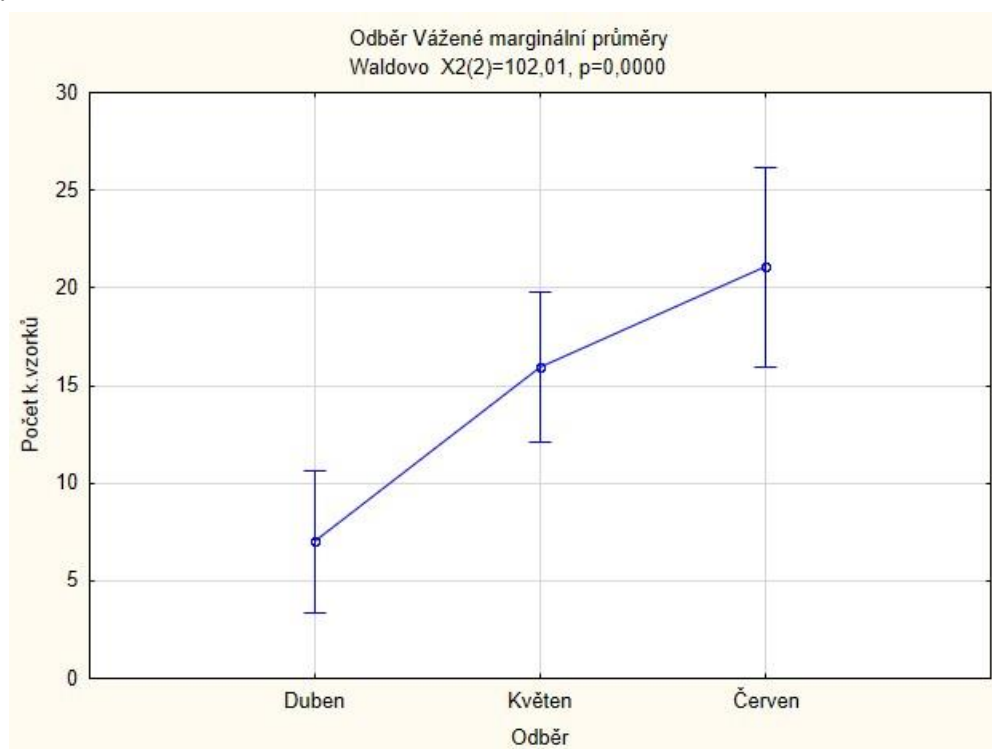
**Graf 9: Zastoupení jednotlivých druhů u endofytů a hub asociovaných se skvrnami (list a stonku). Jednotka – počet kolonizovaných vzorků.**



**Graf 10: Srovnání velikosti diverzity v závislosti na měsíci odběru podle počtu zjištěných druhů endofytů a hub asociovaných se skvrnami. Porovnání pomocí modelu GLZ při současném sledování všech faktorů (lokality/sezona/rostlinný orgán).**



**Graf 11: Porovnání počtu vzorků kolonizovaných endofyty a houbami asociovanými se skvrnami v průběhu sezony. Porovnání pomocí modelu GLZ při současném sledování všech faktorů (lokality/sezona/rostlinný orgán). Jednotka – počet kolonizovaných vzorků.**



## 4.3 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).

## 4.4 *Phomopsis* sp.

Houba izolovaná jako *Phomopsis* sp. byla pomocí sekvenování (a databáze GenBank) přiřazena k teleomorfě *Diaporthe eres*. Podle mikro- a makroskopických znaků bylo možno určit pouze anamorfní rod.

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 Štípoklas v druhém odběru. Oba kmeny byly použity při infekčním pokusu (viz. kapitola 4.3).

## 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%). Ale i u sporulujících morfotypů byl problém s kontaminantami, zřejmě přítomnými od začátku, které se nedaly odfiltrovat. Tyto morfotypy byly proto morfologicky určeny co nejdříve, než pod vlivem kontaminant (hlavně *Clonostachys rosea*) degenerovaly.

Sekvenace 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. U několika morfotypů se sekvenace nezdařila z již zmiňovaných důvodů.



## 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*.

V České republice byl studován vliv šťovíku krmného na růst některých půdních patogenních druhů hub a bylo prokázáno, že extrakt ze šťovíku omezoval růst těchto hub (Heděnc et al., 2014).

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

Nejpočetnějšími druhy mezi endofyty byly *Clonostachys rosea* f. *rosea*, *Cladosporium cladosporioides*, *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus*, *Alternaria alternata* a *Acremonium strictum* typ 1. *Clonostachys rosea* f. *rosea* byla nejpočetnější v červnovém odběru, kolonizovala více kořen než nadzemní části rostliny a byla mírně početnější na výše položených lokalitách v Pohoří a Štipoklasech. Tento druh se vyskytoval také ve skvrnách, zde ale nepatřil mezi nejpočetnější druhy. Více se vyskytoval ve skvrnách na stonku než v listu a byl početnější v květnovém odběru než v červnu. Je tedy zřejmé, že *Clonostachys rosea* f. *rosea* nebude původcem skvrn na šťovíku, možná je spíše opačná souvislost, a sice že tato houba je do určité míry schopná patogeny vytlačovat. *Cladosporium cladosporioides* druhý nejpočetnější druh mezi endofyty byl zároveň třetím nejpočetnějším druhem izolovaným ze skvrn. *C. cladosporioides* bylo jako endofyt nejpočetnější na kořeni, ve skvrnách bylo početnější na stonku než na listu. Můžeme zde sledovat určitou asociaci k níže položeným lokalitám v Kněžicích a Lubníku. Mezi endofyty také lze sledovat postupný nárůst v početnosti během sezony, ve skvrnách bylo velmi málo početné v prvním odběru a pak už se drželo na téměř stejné hodnotě. *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* bylo početnější v Pohoří a Štipoklasech, na kořeni a listu a v odběrech v květnu a červnu. Ze skvrn byl izolován pouze ze 2 vzorků, což mne vede k domněnce, že šlo pouze o náhodu a ve skutečnosti se jedná u šťovíku o čistě endofytickou houbu. *Alternaria alternata* se jako endofyt vyskytovala nejvíce v Lubníku, nejméně ve Štipoklasech, nejvíce na stonku a výrazně nejpočetnější byla až ve třetím odběru. Ve skvrnách se nevyskytovala pouze ve Štipoklasech, častější byla na stonku a až v červnovém odběru, toto rozložení tedy odpovídá tomu mezi endofyty. *Acremonium strictum* typ 1 se jak jako endofyt tak ve skvrnách bylo nejpočetnější v Kněžicích, méně častá na stonku. Ve skvrnách se vyskytovala nejvíce v květnu, ale jako endofyt byla v květnu naopak početná nejméně.

Nejvíce početnými druhy hub asociovaných se skvrnami byly *Acremonium strictum* typ 1, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Acremonium strictum* typ 2 a *Clonostachys rosea* f. *rosea*. Druh *Aureobasidium pullulans* byl jako endofyt izolován jen ze 4 vzorků a jde tedy spíše o houbu asociovanou se skvrnami. Nejméně se vyskytoval v Kněžicích, ale v Lubníku byl srovnatelně početný jako ve výše položených lokalitách, takže mu zřejmě nevadí nižší poloha a s tím spojené podnebí. Četnost jeho výskytu postupně narůstala v průběhu sezony a četnější byl na stonku než listu. Druh *Acremonium strictum* typ 2 se vyskytoval častěji se stárnutím rostlinného orgánu, nejčastější byl v Lubníku, ve

skvrnách byl častější na listu, ale jako endofyt ve stonku. Ostatní nejčastější druhy asociované se skvrnami byly zhodnoceny už výše.

Druh *Acremonium strictum* byl 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 pováženu, 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*. Kromě *A. strictum* se zde vyskytoval i druh *Acremonium* sp. a skupina *Acremonium* – like, které by také mohly být patogeny ať už šťovíku nebo jiných zemědělských plodin.

Druh *Acrostalagmus luteoalbus*, který se nacházel pouze ve skvrnách, má také fungistatickou schopnost. Tato schopnost byla pozorována u kmene izolovaného z brambor. *A. luteoalbus* působil fungistaticky mimo jiné na patogeny jako *Fusarium sulphureum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria solani* a *A. brassicicola* (He et al., 2010). Je tedy otázkou, jestli je *A. luteoalbus* původcem skvrnitostí šťovíku nebo pouze parazitem hub asociovaných se skvrnami.

Houba *Alternaria alternata* byla celkem četná mezi endofyty i houbami ze skvrn. Při infekčním pokusu se však nepotvrdila její patogenita pro šťovík krmný. Byla sledována patogenita druhu *A. alternata* pro *Rumex vesicarius* v Indii (Sankar et al., 2012). Na rodičovských druzích šťovíku krmného dosud není známa. *A. alternata* je jinak častým patogenem rostlin způsobujícím skvrny a jiná onemocnění rostlin. Ze zemědělských plodin napadá např. pšenici (Broggi et al., 2007), slunečnici (Wang et al., 2014), jabloně (Hartveld, et al., 2014), produkuje také významné mykotoxiny toxické pro savce (Magan et al., 1984). Pokud by byl šťovík pěstován jako krmivo pro dobytek, mohly by mu tyto mykotoxiny způsobovat při krmení zejména nebo výhradně šťovíkem obtíže. Nicméně je známá i jako endofyt a dokonce extrakty z ní mohou působit fungistaticky (Fernandes et al., 2009).

*Aspergillus fumigatus* je ubikvitně rozšířeným saprofytem, ale i významným patogenem imunosuprimovaných pacientů (Tekaiia et Latgé, 2005), byl však už také izolován jako endofyt např. na *Juniperus communis* (Kusari et al., 2009). Na šťovíku krmném se vyskytoval

pouze jako endofyt, ve skvrnách nalezen nebyl. *Aspergillus versicolor* je také široce rozšířen, je znám i jako endofyt (např. kávy (Sette et al., 2006)), ale také je rozšířen uvnitř budov a může způsobovat dýchací obtíže (Hodgson et al., 1998). Na šťovíku krmném se nacházel jak mezi endofyty tak ve skvrnách. Vzhledem k širokému rozšíření těchto druhů bych tomu nepřikládala velký význam.

Antifungální účinky a využití v biologické ochraně je dobře známo také u houby *Aureobasidium pullulans*. Na jablkách je prokázána její účinnost proti *Botrytis 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).

Houba *Botrytis cinerea* byla ve dvou případech izolována jako endofyt, ale hlavně byla významně zastoupena mezi houbami asociovanými se skvrnami. Při infekčním pokusu se nepotvrdila patogenita pro šťovík krmný. *Botrytis cinerea* je patogenem mnoha kulturních plodin např. jahod, kde může napadat a uchovávat se jak na listech, tak na plodech. Může způsobovat významné ztráty na sklizni (Sutton et Peng, 1993). Proto bych nedoporučovala pěstování neošetřeného šťovíku vedle polí jahod a jiného ovoce, které může *Botrytis* poškozovat. Šťovík krmný může zůstat na poli mnoho let po sobě (jako vytrvalá rostlina) a množství infekčních spor, houby *B. cinerea* v okolí takového pole by se tak mohlo výrazně kumulovat.

Druh *Cladosporium cladosporioides* je široce rozšířený patogen i endofyt rostlin. Z rostlin, které jsou pěstovány i v ČR, se vyskytuje například na pšenici (Jacyno et al., 1993). Na šťovíku se vyskytovalo na všech lokalitách jak jako endofyt, tak ve skvrnách. V infekčním pokusu se jeho patogenita nepotvrdila. *C. cladosporioides* je ale tak rozšířený, že nelze odvozovat nějaké důsledky pro okolní zemědělské plodiny.

Zajímavá je poměrně velká četnost houby *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 vůči *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 *Fusarium* sp. 2. 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 antagonista se *C. rosea* osvědčila také proti *Botrytis cinerea* 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  $\beta$ -1,3-glukanázy. Vytvářela také struktury podobné apresoriím a její hyfy se ovíjely okolo hyf patogena (*Pythium*) (Chatterton et Punja, 2009). Velký výskyt druhu *C. rosea* si lze vysvětlit tak, že mu vyhovuje šťovík krmný jako hostitel z hlediska chemismu a bylo by zajímavé prozkoumat, zda *C. rosea* nepomáhá šťovík chránit před vážnějšími houbovými chorobami.

Druh *Epicoccum nigrum*, kromě toho že je patogenní, je využitelný i v biologické ochraně rostlin. Například suspenze *E. nigrum* samostatně nebo společně s chemickými fungicidy pomáhá kontrolovat výskyt houby *Monilinia* sp. způsobující hnědou hnilobu broskví (Larena et al., 2005). Je také významným endofytem např. cukrové třtiny (Fávaro et al., 2012). Ze skvrn byl na šťovíku izolován jen ve 2 případech, kdežto mezi endofyty byl dosti početný. Zřejmě se tedy nejedná o patogena šťovíku krmného.

*Fusarium oxysporum* je široce rozšířený endofyt a půdní saprofyt, popsány jsou také formae speciales patogenů rostlin (Gordon et Martyn, 1997). Ze skvrn i ze zdravých rostlin bylo izolováno jen v několika případech a jeho význam pro pěstování šťovíku krmného je tedy malý. *F. proliferatum* bylo v několika případech izolováno jako endofyt, častější však bylo mezi houbami izolovanými ze skvrn. *F. proliferatum* je jinak známé jako patogen rostlin, který také produkuje mykotoxiny nebezpečné pro zvířata i lidi. Z u nás pěstovaných plodin napadá například kukuřici, která se často pěstuje právě tak jako šťovík krmný jako krmná i energetická plodina (Logrieco et al., 1995). Pokud by byl šťovík sklizen pro krmné účely, měl by se proto raději kontrolovat výskyt skvrn na listech, které by mohly být způsobeny touto toxinogenní houbou. Měla by být také zvažována vhodnost pěstování kukuřice v blízkosti polí šťovíku nebo na polích, kde byl pěstován, aby nedošlo k přenosu *F. proliferatum* na

kukuřici. *Fusarium* sp. 2 bylo izolováno jen ze skvrn u 3 rostlin, takže jeho význam pro pěstování šťovíku krmného bude zřejmě minimální.

Ze šťovíku byly izolovány dva druhy rodu *Penicillium*. První druh byl molekulární analýzou zařazen někam do okruhu druhu *P. brasiliense* (zde tedy jako *Penicillium* cf. *brasiliense*). *Penicillium* cf. *brasiliense* bylo izolováno jen ze zdravých rostlin. O ekologii druhu *P. brasiliense* není jinak nic známo. Druhý druh *Penicillium* sp. byl izolován jak ze skvrn, tak ze zdravých rostlin, ale byl jen velmi málo četný.

*Phomopsis* sp. byla nalezena pouze ve skvrnách. Blíže je rozebrána v samostatné kapitole 5.5.

*Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* (syn. *Rhizopus oryzae*) byl poměrně četný na zdravých rostlinách šťovíku, ze skvrn byl izolován jen ze dvou rostlin. Jinak může *R. arrhizus* způsobovat onemocnění slunečnice, kde hnije celé květenství (Shtienberg, 1997). Šťovíku tedy nezpůsobuje žádné takové závažné onemocnění, uvažovat by se dalo pouze o šťovíku jako rezervoáru této houby. Možné ale je, že se zde jedná o nepatogenní kmen.

*Verticillium dahliae* způsobuje vadnutí a další závažné choroby u řady zemědělských plodin, např. kvěťáku, brambor, salátu, jahod, rajčat aj. (Bhat et Subbarao, 1999). Jako endofyt nebyl tento druh zřejmě ještě zkoumán, většina studií se zaměřuje právě na zkoumání jeho patogenicity a vývoj obrany proti němu. Pravděpodobně ale nebude původcem skvrnitostí šťovíku, protože ze skvrn byl izolován pouze v jednom případě. Mezi endofyty byl častější, ale nikoli velmi četný. Může se zde také jednat o latentního patogena.

Jak u endofytů, tak u hub asociovaných se skvrnami narůstal počet druhů i kolonizovaných vzorků v průběhu sezony. U skvrn byl zřejmý rozdíl hlavně vůči dubnu, kdy byl jen malý výskyt skvrn, druhová pestrost izolovaných hub byla malá a kolonizovaných vzorků bylo také výrazně méně než v dalších dvou odběrech. Je tedy zřejmé, že k vývoji skvrnitostí dochází skokově zhruba na přelomu dubna a května (nebo v odpovídající části vegetační sezony podle aktuálních podnebních podmínek). Mezi stonkem a listem nebyl zvláštní rozdíl ani v počtu izolovaných druhů ani v počtu kolonizovaných vzorků. Rozdíly byly jen v preferencích jednotlivých druhů. Většina druhů (až na velmi málo početné druhy) se však vyskytovala jak na stonku, tak na listu. Co se týče lokalit, nebyl mezi nimi podobně jako mezi rostlinnými orgány velký rozdíl. Můžeme říci, že o málo více druhů a kolonizovaných vzorků se vyskytovalo v nejnižší položené lokalitě v Kněžicích a nejméně zase ve Štipoklasech, ale tento rozdíl nebyl dostatečně signifikantní, hlavní rozdíl tak opět tkví v zastoupení jednotlivých druhů hub.

Co se týče endofytů počet druhů narůstal v sezoně postupně, ale počet kolonizovaných vzorků byl výrazně vyšší v červnu než v ostatních dvou měsících. To je zřejmě způsobeno tím, že endofytické druhy postupně v průběhu celé sezony kolonizují rostlinu a zároveň ji postupně prorůstají, takže ke konci sezony je už téměř celá kolonizována endofyty. Můžeme zde také sledovat výrazně větší kolonizaci kořene oproti nadzemním částem rostliny, což se dalo předpokládat, vzhledem k tomu, že kořen šťovíku zůstává v zemi po mnoho let, kdežto nadzemní část každý rok odumírá a je sklizena a odstraněna z pole. Kromě velmi málo početných druhů se všechny houby vyskytovaly na všech částech rostliny, ale některé druhy byly čtenější na daném rostlinném orgánu a můžeme tedy říci, že ho preferují. Nicméně vliv části rostliny na skladbu druhů na rostlině nebyl zdaleka tak velký jako u průběhu sezony, kde můžeme sledovat druhy početné na začátku sezony, které jsou pak buď vytlačeny jinými houbami, nebo přirozeně odumírají a druhy které rostlinu pomalu kolonizují až k vrcholu sezony v červnu. Vyskytly se i druhy početnější uprostřed sezony, což se dá vysvětlit tak, že jde o druhy ne dostatečně agresivní, které sice rostlinu kolonizují postupně od dubna, ale v polovině sezony jsou zatlačeny do pozadí druhy agresivnějšími. Několik druhů také preferovalo spíše výše položené lokality Pohoří a Štipoklasy jako třeba *Clonostachys rosea* f. *rosea* nebo *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus*, jiné zase spíš výše položené lokality Lubník a Kněžice jako třeba *Epicoccum nigrum* nebo *Cladosporium cladosporioides*. Většina druhů (opět až na velmi málo početné druhy) byla rozšířena ubikvitně.

Jak bylo zmíněno na začátku této kapitoly tři z pěti nejpočetnějších druhů endofytů patřily zároveň k nejpočetnějším druhům hub asociovaných se skvrnami. Nicméně se zde vyskytovaly druhy specifické pouze pro endofytickou mykobiotu a to *Penicillium* cf. *brasiliense* a *Aspergillus fumigatus* a druhy vyskytující se pouze ve skvrnách: *Acrostalagmus luteoalbus*, *Fusarium* sp. 2, *Mycelium sterilium* II a *Mycelium sterilium* IV, *Aspergillus* sp. 1 a 2 a *Phomopsis* sp. Pokud jde o pouze endofytické druhy, ty patřily mezi čtenější druhy, ale pokud jde o druhy vyskytující se pouze ve skvrnách, ty byly velmi málo čtené. *Mycelium sterilium* V se vyskytovalo ve skvrnách, ale jako endofyt bylo izolováno pouze z kořene.

## 5.4 Infekční pokus

V infekčním pokusu se nepotvrdil předpoklad, že by některá ze zkoumaných hub způsobovala skvrny na stonku či listech šťovíku krmného. Ani po třech týdnech od inokulace kmeny druhů *Phomopsis* sp., *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* a *Cladosporium cladosporioides* se neobjevily známky onemocnění rostlin. To mohlo být způsobeno buď tím, že dané druhy nebo kmeny opravdu nejsou pro šťovík patogenní nebo tím, že kmeny byly oslabeny pěstováním v laboratorních podmínkách, způsobem inokulace na rostliny, nepříznivými podmínkami v komoře, kde pokus probíhal, nebo rostliny samé nebyly v období vnímavém pro nákazu. Z těchto důvodů nemůžeme mít za jednoznačně prokázané, že tyto druhy hub nezpůsobují skvrny na šťovíku. Tyto skvrny mohly být dále způsobeny dalšími druhy patogenních hub, které jsou blíže rozebrány v kapitole 5.3, jen jejich kmeny neměly potřebnou kvalitu pro inokulaci na rostliny (nesporulovaly, velmi pomalý růst).



## 5.5 *Phomopsis* sp.

Nepodařilo se potvrdit, že houba *Phomopsis* sp. (určená jako *Diaporthe eres*) je významným patogenem šťovíku krmného. Druh *Phomopsis* sp. (*Diaporthe eres*) se vyskytoval pouze na dvou rostlinách ze všech čtyř lokalit pouze ve Štipoklasech. Původní předpoklad, že je významným patogenem šťovíku krmného způsobujícím listovou skvrnitost, se tedy nepotvrdil. Tento předpoklad byl založen na předchozí izolaci tohoto taxonu z listů šťovíku krmného pěstovaného na pokusném poli ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Praze – Ruzyni. *Phomopsis* sp. je tedy schopna na šťovíku vegetovat a zřejmě i způsobovat za určitých okolností skvrny (což se ale v infekčním pokusu nepodařilo potvrdit), ale není běžným patogenem šťovíku krmného. Vzhledem k tomu, že se vyskytuje jako patogen i endofyt i na jiných rostlinách, spíše je možné, že se na šťovík šíří z těchto rostlin za vhodných podmínek, pokud se vyskytují například v sousedství pole, ale není rozšířena velkoplošně. Druh *Diaporthe eres* (*Phomopsis* sp.) byl prokázán například jako patogen broskví a nektarinek v Řecku (Thomidis a Michailides, 2009), vyskytuje se také jako endofyt buku lesního (Sieber a Hugentobler, 1987). V Americe se vyskytuje také jako patogen ořešáku popelavého (Anagnostakis, 2007). Nicméně je možné, že nákaza *Phomopsis* sp. může být na šťovíku uchovávána a pomocí něj se šířit na další plodiny (za vhodných podmínek) a bylo by třeba tento problém déle sledovat, aby se, v případě pěstování šťovíku krmného na větší výměře než nyní, nestal šťovík šířitelem této nákazy např. na broskve. Za současných podmínek, však toto riziko zřejmě nehrozí.

Jako endofyt nebyl druh *Phomopsis* sp. izolován ani jednou. Což by podporovalo teorii, že není na šťovíku široce rozšířen.

## 6. ZÁVĚR

Šťovík krmný (*Rumex patientia* x *Rumex tianschanicus*) byl vyšlechtěn na Ukrajině jako krmná plodina pro skot. V České republice je pěstován zejména jako energetická plodina. V této diplomové práci byla zkoumána jeho mykobiota. Byly odebrány vzorky ze čtyř lokalit v České republice, dvě lokality byly ve vyšší nadmořské výšce a dvě v nížině. Odběry probíhaly v dubnu, květnu a červnu. Výskyt endofytických hub byl hodnocen v kořenu, stonku a listu, výskyt hub asociovaných se skvrnami byl zkoumán ve stonku a listu.

V rámci endofytické mykobioty byly nejčastěji zjištěny druhy *Clonostachys rosea* f. *rosea*, *Cladosporium cladosporioides*, *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus*, *Alternaria alternata* a *Acremonium strictum* typ 1. Nejčastějšími houbami asociovanými se skvrnami byly zaznamenány taxony *Acremonium strictum* typ 1, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Acremonium strictum* typ 2 a *Clonostachys rosea* f. *rosea*.

Druhové složení mykobioty skvrn a zdravých pletiv (endofytická mykobiota) se příliš nelišilo, rozdílly byly v četnosti výskytu některých druhů. Jako faktor nejvíce ovlivňující druhovou skladbu a kolonizaci rostlin houbami se ukázal měsíc odběru. Nejvíce byly rostliny kolonizovány na konci vegetace v červnovém odběru. U endofytů byl prokázán také významný rozdíl mezi kořenem a nadzemní částí rostliny, důvodem je zřejmě to, že šťovík krmný je rostlina víceletá a kořen tak zůstává v zemi po mnoho let. Z tohoto důvodu může být kořen kolonizován více než nadzemní část. U některých hub bylo prokázáno, že preferovaly spíše níže nebo výše položené lokality.

V infekčním pokusu se nepodařilo žádnou z izolovaných hub prokázat jako původce skvrnitostí šťovíku. Neprokázalo se ani větší rozšíření houby *Phomopsis* sp. (*Diaporthe eres*), která byla již dříve izolována ze skvrn na stoncích a listech ve VÚRV v Praze – Ruzyni.

## 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.
- Anagnostakis (2007): *Diaporthe eres* (*Phomopsis oblonga*) as a pathogen of butternut (*Juglans cinerea*) in Connecticut. Plant Disease, 91(9):1198.
- 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.
- Bhat R.G., Subbarao K.V. (1999): Host range in *Verticillium dahliae*. Phytopathology, 89(12):1218-1225.
- Brandenburger W. (1985): Parasitische Pilze an Gefässpflanzen in Europa. Stuttgart, 1248 p.
- Broggi L. E., González H. H. L., Resnik S. L., Pacin A. (2007): *Alternaria alternata* prevalence in cereal grains and soybean seeds from Entre Ríos, Argentina. Revista Iberoamericana de Micología 24:47-51.
- 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  $\beta$ -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.
- Fávaro L.C. de L., Sebastianes F.L. de S., Araújo W.L. (2012): *Epicoccum nigrum* P16, a sugarcane endophyte, produces antifungal compounds and induces root growth. *PLoS ONE* 7(6): e36826. doi:10.1371/journal.pone.0036826.
- Fernandes M.d.R.V., Silva T.A.C.e, Pfenning L.H., Costa-Neto C.M.d., Heinrich T.A., Alencar S.M.d., Lima M.A.d., Ikegaki M. (2009): Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(4).
- Fiala M. (2009): Mandelinka ředkvičková [online]. 08-08-2013. Dostupné na: [www.biolib.cz/cz/taxonimage/id81800/?taxonid=11796](http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id81800/?taxonid=11796)
- Gordon T.R., Martyn R.D. (1997): The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology*, 35:111-128.
- Goz Gastro s.r.o. (2008): Mapa ČR. 08-08-2013. <http://www.gozgastro.cz/cs/servis/ceska-republika/plzensky-kraj.html>
- Harteveld D.O.C., Akinsanmi O.A., Drenth A. (2014): Pathogenic variation of *Alternaria* species associated with leaf blotch and fruit spot of apple in Australia. *European Journal of Plant Pathology*, 139(4):789-799.

- 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.
- He S., Jin X., Wang S. (2010): Antagonistic activity of *Acrostalagmus luteo-albus* against plant pathogenic fungi. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2010 (3): 60-65.
- Heděnc P., Novotný D., Ust'ak S., Honzík R., Kovářová M., Šimáčková H., Frouz J. (2014): Allelopathic effect of new introduced biofuel crops on the soil biota: A comparative study. *European Journal of Soil Biology*, 63:14-20.
- Hodgson M.J., Morey P., Leung W.-Y., Morrow L., Miller D., Jarvis B., Robbins H., Halsey J., Storey E. (1998): Building – associated pulmonary disease from exposure to *Stachybotrys chartarum* and *Aspergillus versicolor*. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 40(3):241-249.
- 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.
- Jacyno J.M., Harwood J.S., Cutler H.G., Lee M.-K. (1993): Isocladosporin, a biologically active isomer of cladosporin from *Cladosporium cladosporioides*. *Journal of Natural Products*, 56(8):1397-1401.
- 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.
- Kusari S., Lamshöft M., Spiteller M. (2009): *Aspergillus fumigatus* Fresenius, an endophytic fungus from *Juniperus communis* L. Horstmann as a novel source of the anticancer pro-drug deoxypodophyllotoxin. *Journal of Applied Microbiology*, 107: 1019–1030.
- 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.
- Logrieco A., Moretti A., Ritieni A., Bottalico A., Corda P. (1995): Occurrence and toxigenicity of *Fusarium proliferatum* from preharvest maize ear rot, and associated mycotoxins, in Italy. *Plant Disease*, 79(7):727-731.
- Magan N., Cayley G. R., Lacey J. (1984): Effect of water activity and temperature on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in culture and on wheat grain. *Applied and Environmental Microbiology*, 5:1113-1117.
- 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.
- Sankar N.R., Devamma M.N., Giridhar D. (2012): First report of *Alternaria alternata* causing leaf spot on *Rumex vesicarius* in India. Australasian Plant Disease Notes, 7(1):17-18.

- 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.
- Sette L.D., Passarini M.R.Z., Delarmelina C., Salati F., Duarte M.C.T. (2006): Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(11):1185-1195.
- Shtienberg D. (1997): Rhizopus head rot of confectionery sunflower: effects on yield quantity and quality and implications for disease management. *Phytopathology*, 87(12):1226-1232.
- Sieber T., Hugentobler C. (1987): Endophytische Pilze in Blättern und Ästen gesunder und geschädigter Buchen (*Fagus sylvatica* L.). *European Journal of Forest Pathology*, 17(7):411-425.
- Silva L., Tavares J., Brasseur R. (1997): *Ramularia rubella* and *Uromyces rumicis* infecting *Rumex obtusifolius* in the Azores. *Acroana*, 8(3):375-381.
- Sutton J.C., Peng G. (1993): Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. *Disease Control and Pest Management*, 83(6):615-621.
- 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.
- Tekaia F., Latgé J.-P. (2005): *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Current Opinion in Microbiology*, 8:385-392.
- Thomidis T., Michailides T. J. (2009): Studies on *Diaporthe eres* as a new pathogen of peach trees in Greece. *Plant Disease*, 93(12):1293-1297.
- Ušťak S. (2012): Pěstování šťovíku krmného pro výrobu bioplynu. Praha, 32 p.
- Wang T., Zhao J., Sun P., Wu X. (2014): Characterization of *Alternaria* species associated with leaf blight of sunflower in China. *European Journal of Plant Pathology*, 140(2):301-315.



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 10.8.2014**

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

#### **Internetové databáze aktuální ke dni 8.8.2015**

[www.indexfungorum.org](http://www.indexfungorum.org)

[www.mapy.cz](http://www.mapy.cz)

[www.mycobank.org](http://www.mycobank.org)