



METODIKA BIOLOGICKÉ OCHRANY

ROSTLIN S VYUŽITÍM HUB RODU

CLONOSTACHYS



Šumperk 2014



AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o.



OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.



FYTOVITA, spol. s r. o.



Česká zemědělská univerzita v Praze

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

METODIKA BIOLOGICKÉ OCHRANY

ROSTLIN S VYUŽITÍM HUB RODU

CLONOSTACHYS

2014



MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Metodika biologické ochrany rostlin s využitím hub rodu *Clonostachys*

Dedikace: Certifikovaná metodika vznikla za podpory MZe jako součást řešení projektu NAZV QI111C039 „Praktické využití, vývoj a výroba nového biologického přípravku na ochranu rostlin“.

Autorský kolektiv a podíl práce jednotlivých autorů na tvorbě metodiky:

Mgr. Eliška Ondráčková, zástupce autorského kolektivu (AGRITEC): 35 %

RNDr. Michal Ondřej, CSc. (AGRITEC): 25 %

Ing. Zdeněk Both, Ph.D. (OSEVA V a V): 14 %

RNDr. Miloslav Nesrsta (FYTOVITA): 12 %

doc. Ing. Evžen Prokinová, CSc. (ČZU): 14 %

Oponentní posudky vypracovali:

RNDr. Jan Juroch (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský; Oddělení metod integrované ochrany rostlin)

RNDr. Jan Nedělník, Ph.D. (Výzkumný ústav pícninářský, spol. s r. o. Troubsko)

Vydal: AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s. r. o., Zemědělská 16, 787 01 Šumperk

1. vydání, 2014

© AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o., Šumperk; OSEVA vývoj a výzkum s.r.o., Zubří; FYTOVITA, spol. s r. o., Ostrožská Lhota; Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha

ISBN 978-80-87360-32-3

OBSAH

1	CÍL METODIKY	5
2	VLASTNÍ POPIS METODIKY.....	5
2.1	Úvodní část.....	5
2.2	Využití hub rodu <i>Clonostachys</i> k redukci půdních fytopatogenních hub a jejich komercializace.....	5
2.3	Charakteristika druhu <i>Clonostachys rosea</i>	6
2.4	Výběr vhodných kmenů/izolátů <i>Clonostachys rosea</i> k výrobě biologického přípravku.....	8
2.4.1	Mykoparazitická účinnost izolátů/kmenů <i>Clonostachys rosea</i>	8
2.4.2	Citlivost kmenů/izolátů <i>Clonostachys rosea</i> k fungicidním přípravkům	9
2.5	Účinnost hub <i>Clonostachys rosea</i> v polních podmínkách.....	11
2.5.1	Vliv ošetření <i>C. rosea</i> na luskoviny	11
2.5.2	Vliv ošetření <i>C. rosea</i> na obilniny.....	12
2.5.3	Vliv ošetření <i>C. rosea</i> na travní porosty.....	14
2.5.4	Vliv ošetření <i>C. rosea</i> na zeleninu (brambory, česnek aj.).....	14
2.6	Biologický přípravek na bázi hub <i>Clonostachys rosea</i>	16
2.6.1	Výroba	16
2.6.2	Aplikace biologického přípravku	17
2.6.2.1	Moření osiva	17
2.6.2.2	Moření sadby česneku	18
2.6.2.3	Moření sadby brambor.....	18
2.6.2.4	Doporučená aplikace na travní porost	19
2.6.2.5	Doporučená aplikace do půdy a do substrátů	19
2.6.3	Životaschopnost konidií <i>C. rosea</i> v přípravku	19
3	NOVOST POSTUPŮ	20
4	POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	21
5	EKONOMICKÉ ASPEKTY	21
6	SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	22
7	SEZNAM VÝSLEDKŮ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY VYDÁNÍ METODIKY.....	22

1 CÍL METODIKY

Cílem metodiky jsou informace o možnostech biologické ochrany rostlin s využitím hub rodu *Clonostachys* proti půdním fytopatogenním houbám a využití této metody pro pěstitelskou praxi.

2 VLASTNÍ POPIS METODIKY

2.1 Úvodní část

Ze směrnice Evropského parlamentu a Rady 2009/128/EC vyplývá povinnost pro všechny členské státy EU využívat v pěstitelské praxi obecné zásady integrované ochrany rostlin. Vyžaduje se přednostní používání nechemické ochrany. Chemická ochrana nemá snižovat výskyt necílových a užitečných organismů, k nimž se řadí i půdní mikroorganismy. Fungicidní přípravky nesnižují půdní zamořenost trvalými zárodky fytopatogenních hub, ale eliminují užitečnou půdní mykofloru. Důsledkem je ztráta supresivity půd a následně zvýšená citlivost pěstovaných plodin ke kořenovým a krčkovým chorobám. Aplikace užitečných mykoparazitických hub *Clonostachys* do půdy vede jednak k přímé degradaci propagul fytopatogenních hub v půdě a jednak k vytvoření rovnováhy mezi půdními mikroorganismy.

2.2 Využití hub rodu *Clonostachys* k redukci půdních fytopatogenních hub a jejich komercializace

V půdě se nachází množství antagonistických hub podílejících se na snižování výskytu a škodlivosti fytopatogenní mykoflory. Jedná se často o saprotrofní houby rozkládající v půdě zbytky organické hmoty a uvolňující tak potřebné živiny pro růst rostlin. Jsou významnou složkou půdní mikrobiologické rovnováhy.

Z užitečných mikroskopických hub se na supresivitě půdy nejčastěji podílejí mykoparazitické houby rodu *Trichoderma* a *Clonostachys* a řada dalších antagonistických mikroorganismů.

V biologické ochraně proti fytopatogenním druhům hub se z antagonistických hub využívají nejčastěji houby rodu *Trichoderma* a *Clonostachys* nebo druhy *Talaromyces flavus*, *Pythium oligandrum* aj. Podstatou antagonistické účinnosti jsou jejich mykoparazitické, kompetitivní nebo antibiotické vlastnosti.

Druhy *Clonostachys rosea* f. *rosea* a *C. rosea* f. *catenulata* patří mezi mykoparazitické půdní houby, které jsou účinné proti širokému spektru fytopatogenních hub. V půdě rozkládají sklerocia, mikrosklerocia, chlamydospory a oospory hub (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Bipolaris sorokiniana*, *Colletotrichum* spp. aj.), a to i při nižších půdních teplotách. Houby rodu *Clonostachys* jsou kompatibilní s houbami rodu *Trichoderma*, nicméně jejich využití k výrobě biologických přípravků není časté. Způsob mykoparazitické degradace fytopatogenních hub v půdě je důsledkem produkce lytických enzymů rozpouštějících buněčné stěny jejich mycelia a klidových struktur.

V seznamu biologicky aktivních hub v Příloze I Směrnice Rady o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh č. 91/414/EEC je uvedena houba *Clonostachys rosea* f. *catenulata* (dříve *Clonostachys catenulata* nebo *Gliocladium catenulatum*) v kategorii fungicidních látek. Celosvětově se na bázi hub *Clonostachys* vyrábí 6 přípravků od 5 výrobců, z nichž jeden je vyráběn i v ČR. Na bázi houby rodu *Clonostachys* je v ČR dostupný přípravek Gliorex, který navíc obsahuje i houbu *Trichoderma asperellum*. Přípravek je registrován jako pomocný rostlinný přípravek.

2.3 Charakteristika druhu *Clonostachys rosea*

Houby rodu *Clonostachys* Corda 1839 byly dříve řazeny do rodu *Gliocladium* Corda 1840. Mykoparazitický druh *Clonostachys rosea* (Link) Schroers, Samuels, Seifert et W. Gams 1999 s teleomorfním stádiem *Bionectria ochroleuca* (Schwein.) Schroers et Samuels 1999, se vyskytuje ve dvou formách – *Clonostachys rosea* f. *rosea* Schroers, Samuels, Seifert et Gams 1999 (dále CRR) a *Clonostachys rosea* f. *catenulata* (J. C. Gilman et E. V. Abbott) Schroers 2001 (dále CRC).

CRR tvoří na živných agarových půdách kolonie zbarvené bíle, narůžověle, lososově až oranžově. CRC tvoří kolonie zbarvené zpočátku bíle a později žlutozeleně, olivově zeleně nebo zelenomodře. V kultuře vytváří na rozdíl od CRR



Obrázek 1 Kmeny *Clonostachys rosea*

více bělavého vzdušného mycelia s pozdějším nástupem sporulace. Na Czapek-Dox agarové živné půdě dosahují kolonie po 10 dnech kultivace při 23±2 °C

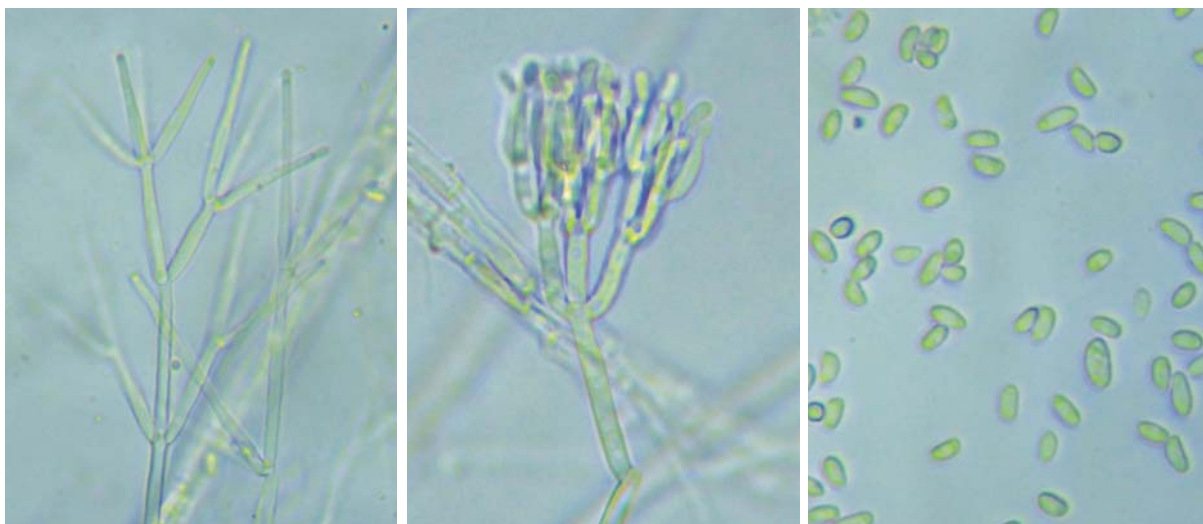
velikosti 30–55 mm. Obě formy *C. rosea* tvoří dva typy konidioforů – verticiliosní a penicilátní. Rozměry konidioforů a konidií jsou u obou forem shodné. Konidiofory měří 50–200 μm , konidie jsou hyalinní, krátce cylindrické nebo oválné o velikosti $(3)5\text{--}7(8,5) \times 3\text{--}4(5) \mu\text{m}$.

Obě formy druhu *C. rosea* jsou běžně se vyskytující půdní houby s celosvětovým rozšířením. Nejčastěji se vyskytují v orných půdách a v travních porostech. Podílejí se na rozkladu zbytků organické hmoty v půdě a mykoparaziticky degradují široké spektrum půdních fytopatogenních hub. CRR se vyskytuje častěji po pěstování luskovin a vyšší výskyt CRC je uváděn po pěstování obilnin.

Optimální teplota pro růst je v rozmezí 20–25 °C s teplotním minimem 4–8 °C.

Obě formy *C. rosea* jsou v literárních zdrojích označovány jako velmi destruktivní mykoparazitické houby, rozkládající mycelium hub *Ceratocystis*, *Trichothecium*, *Thamnidium*, *Botrytis*, *Verticillium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Pythium*, *Thielaviopsis*, *Aureobasidium*, *Aphanomyces*, *Bipolaris*, *Fusarium* aj.

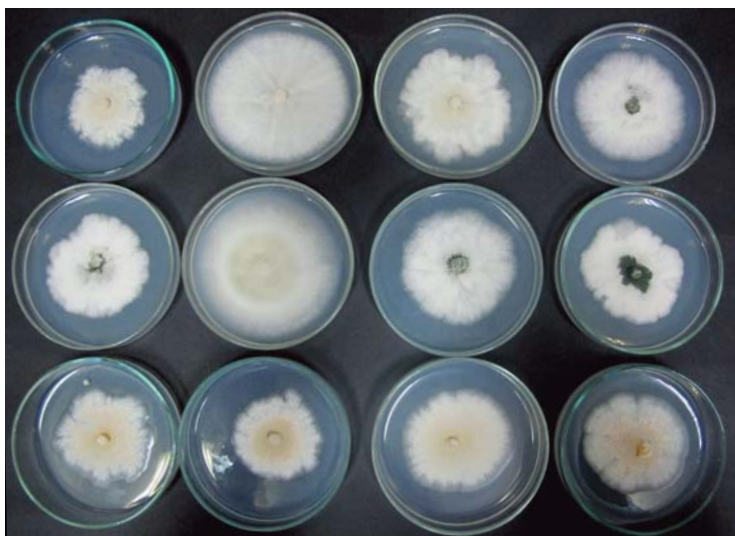
Mykoparaziticky účinné kmeny *C. rosea* produkují několik specifických extracelulárních enzymů (beta-N-acetylhexosaminidáza, chitináza, β -1,4-chitobiosidáza, glucan β -1,3-glucosidáza a proteáza) rozpouštějících buněčné stěny fytopatogenních hub.



Obrázek 2 *Clonostachys rosea* – vlevo mycelium a konidiofory verticiliosního typu, uprostřed penicilátního typu a vpravo konidie

2.4 Výběr vhodných kmenů/izolátů *Clonostachys rosea* k výrobě biologického přípravku

K výrobě komerčních biologických přípravků k ochraně rostlin proti půdním fytopatogenním houbám jsou nejvhodnější kmeny *C. rosea* s vysokou mykoparazitickou účinností, vysokou intenzitou sporulace a se schopností deaktivovat fungistatickou účinnost metabolitů půdních fytopatogenních hub, jako jsou např. sesquiterpeny, trichotheceny, rhizosolaniol, furanoid, kyselina šťavelová aj.



Obrázek 3 Kmeny *Clonostachys rosea* po 14 dnech kultivace na Czapek-Dox agaru

Při vyhledávání vhodných izolátů bylo v letech 2011–2014 v rámci projektu MZe QI111C039 zhodnoceno na mykoparazitickou účinnost celkem 64 vlastních izolátů obou forem *C. rosea*, 9 izolátů ze sbírky hub CCF Praha a 1 izolát ze sbírky mikroorganismů CCM Brno. Kmeny CRR a CRC se od sebe odlišovaly vzhledem a zbarvením kolonií, dynamikou růstu (Obr. 3), intenzitou sporulace a mykoparazitickou aktivitou. Odlišení kmenů bylo možné i na základě metody PCR. Z celkového počtu izolátů bylo pro další testování vybráno 5 izolátů CRR a 3 izoláty CRC.

2.4.1 Mykoparazitická účinnost izolátů/kmenů *Clonostachys rosea*

Mykoparazitická účinnost izolátů/kmenů *Clonostachys rosea* proti vybranému souboru fytopatogenních hub byla zjišťována na Czapek-Dox agarových plotnách v Petriho miskách. K testům byly použity 3 metody: metoda dvojných kultur (obě houby, mykoparazitická a fytopatogenní, byly naočkovány na misce proti sobě), bariérový test (uprostřed Petriho misky bylo naočkováno 5 terčků mykoparazitické houby a na okraji misky jeden terčík fytopatogenní houby) a směsný test (kultury mykoparazitické i fytopatogenní houby byly homogenizovány a na Petriho misku byla očkovaná jejich směs).

U dvojných kultur a bariérového testu se hodnotila rychlost degradace fytopatogenní houby (Obr. 4) a u směšného testu inhibice růstu fytopatogenní houby.

Jednotlivé kmeny/izoláty *C. rosea* se od sebe odlišovaly v rychlosti degradace fytopatogenních hub. Nejrychlejší mykoparazitickou aktivitou se vyznačovaly kmeny CRR – CCF 4182 a CRC – CCF 4184. Účinnost ve směšných testech byla nejlepší u kmenů CCF 4182, C-6, R-730 a R-71.



Obrázek 4 Přerůstání kolonie fytopatogenní houby *Rhizoctonia solani* (nahore) houbou *Clonostachys rosea* f. *rosea* CCF 4182 (dole) ve dvojně kultuře

Z fytopatogenních hub byly nejlépe a nejrychleji degradovány kolonie hub *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* a *Bipolaris sorokiniana*. Pomalu a obtížně byly degradovány kolonie hub rodu *Fusarium*, které na živné půdě Czapek-Dox tvoří červený pigment (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *Fusarium* sp.).

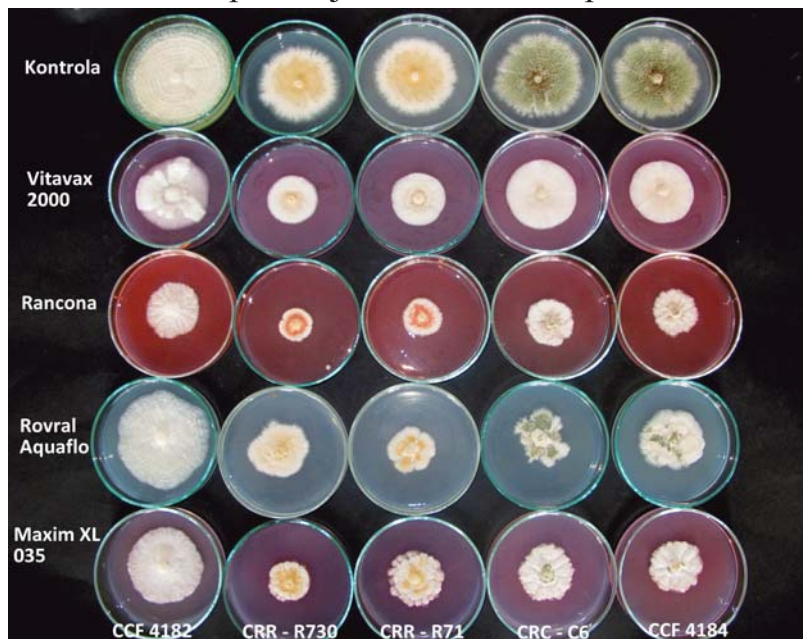
2.4.2 Citlivost kmenů/izolátů *Clonostachys rosea* k fungicidním přípravkům

Růst všech izolátů *C. rosea* byl silně inhibován nebo zcela zamezen fungicidními přípravky na bázi prochlorazu, azolů, benzimidazolů a thiofanát-methylu.

Dobrá snášenlivost byla zjištěna na fungicidní přípravky Rovral Aquaflo (iprodion), Amistar (azoxystrobin), Ortiva (azoxystrobin), Cruiser OSR (thiamethoxam + fludioxonil + mefenoxam), Vitavax 2000 (karboxin + thiram) a Maxim XL 035 (metalaxyl-M + fludioxonil). Růst všech testovaných kmenů na Czapek-Dox agarových plotnách s přidavkem výše uvedených fungicidních přípravků byl zpočátku zpomalen, ale po 14 dnech kultivace byl denní přírůstek kolonií srovnatelný s kontrolní variantou. Kmen CRR CCF 4182 byl nejméně citlivý k většině testovaných fungicidů.

Kmeny *C. rosea* byly schopné degradovat kolonii patogena (*Sclerotinia sclerotiorum*) i v přítomnosti fungicidů. U některých kmenů (CCF 4182 – CRR a CCF 4184 – CRC) došlo dokonce ke zvýšení mykoparazitické aktivity v přítomnosti fungicidu Sfera (cyprokonazol + trifloxystrobin).

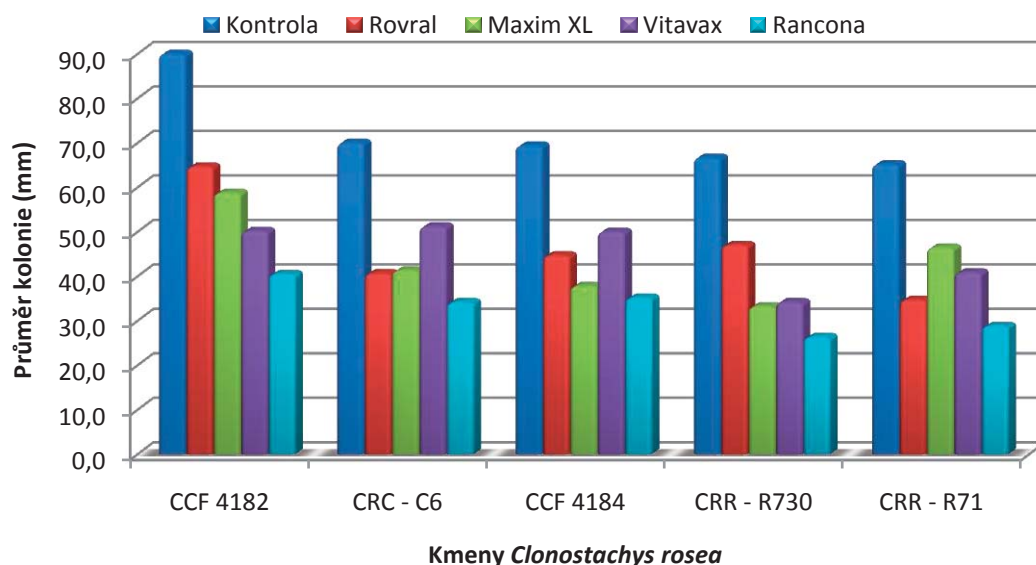
Kombinace fungicidního moření osiv s biologickým přípravkem obsahujícím spóry *C. rosea* je možná. Nicméně nedoporučuje se současná aplikace. Biologickým přípravkem je možné ošetřit fungicidně namořené osivo, ale není vhodné ho přidávat přímo do mořicího roztoku. Při současné aplikaci ztrácejí konidie schopnost vyklíčit nebo klíčí ojedinele se zpožděním. Časově oddělené ošetření fungicidně namořeného osiva biologickým přípravkem klíčivost konidií *C. rosea* neovlivňuje. Fungicidní přípravek zajišťuje ochranu především



Obrázek 5 Růst kmenů *Clonostachys rosea* na živné půdě Czapek-Dox v přítomnosti fungicidů ve srovnání s kontrolou (Czapek-Dox agar bez fungicidu)

v prvních 14 dnech po výsevu, později dojde k namnožení mykoparazitických hub, které zajišťují ochranu kořenového systému po zbytek vegetace.

Graf 1 Průměrná velikost kolonií kmenů *Clonostachys rosea* po 14 dnech kultivace na živné půdě Czapek-Dox s fungicidními přípravky ve srovnání s kontrolou (Czapek-Dox agar bez fungicidu)



2.5 Účinnost hub *Clonostachys rosea* v polních podmínkách

Vliv hub *C. rosea* na zdravotní stav a výnosové parametry byla testována ve skleníkových a polních podmínkách u luskovin a obilnin, dále pak v polních podmínkách u brambor, mrkve, česneku a u travních porostů.

2.5.1 Vliv ošetření *C. rosea* na luskoviny

Ve skleníkových podmínkách se ve fázi před kvetením luskovin (BBCH 50) hodnotila délka kořenů, nadzemních částí a počet kořenových hlízek. Polní pokusy byly zakládány na infekčním poli firmy AGRITEC, kde byly rostliny vystaveny silnému tlaku půdních fytopatogenních hub. U všech testovaných druhů luskovin docházelo ke zvýšení výnosu a HTS (Tabulka 1). Ošetření podporovalo tvorbu kořenových hlízek až o 86 % (Graf 2, Obr. 6).



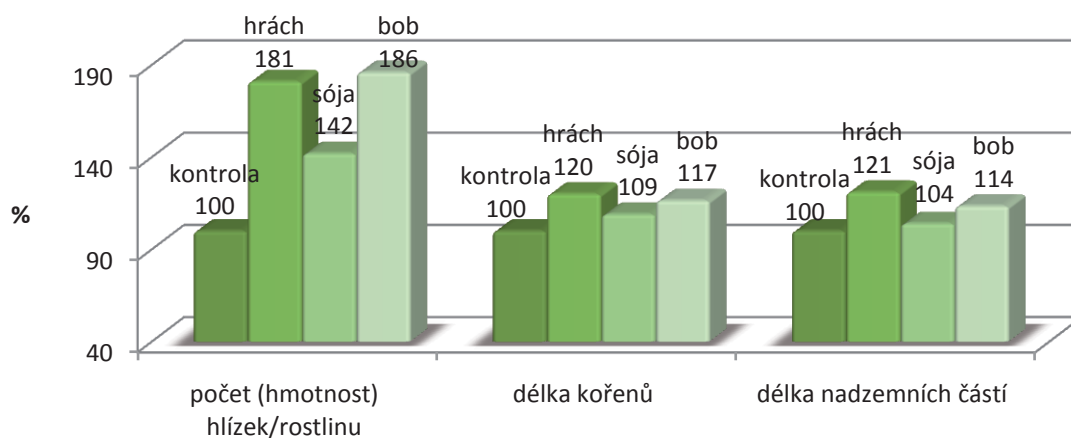
Obrázek 6 Kořenové hlízky u bobu u ošetřené varianty směsí hub *Clonostachys rosea* (vlevo) a u kontrolní neošetřené varianty (vpravo)

Kořeny luskovin byly méně napadeny komplexem půdních fytopatogenních hub (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Aphanomyces euteiches*, *Pythium* sp. aj.), z nichž *R. solani* degraduje vytvořené kořenové hlízky.

Tabulka 1 Výnosové parametry luskovin ošetřených směsí 4 kmenů *Clonostachys rosea* (CL4) ve srovnání s neošetřenou kontrolou v letech 2011–2013 na infekčním poli Šumperk. (Výsledky jsou uvedeny v %.)

Plodina	Varianta	Výnos/roślinu (%)				HTS (%)			
		2011	2012	2013	Průměr	2011	2012	2013	Průměr
Fazol, sója, hrách, bob	Kontrola	100	100	100	100	100	100	100	100
Fazol	CL4	135	109	134	126	110	104	121	112
Sója	CL4	117	121	109	116	104	100	103	102
Hrách	CL4	115	117	143	125	104	112	118	111
Bob	CL4	113	107	125	115	106	95	103	101

Graf 2 Hodnocení délky rostlin (kořenů a nadzemní části) vybraných luskovin a tvorby kořenových hlízek (počtu/hmotnosti) ve variantách s ošetřením semen přípravkem obsahujícím 4 kmeny *Clonostachys rosea* ve srovnání s neošetřenou kontrolou (výsledky jsou uvedeny v %). Skleníkové pokusy 2011–2013; Šumperk.

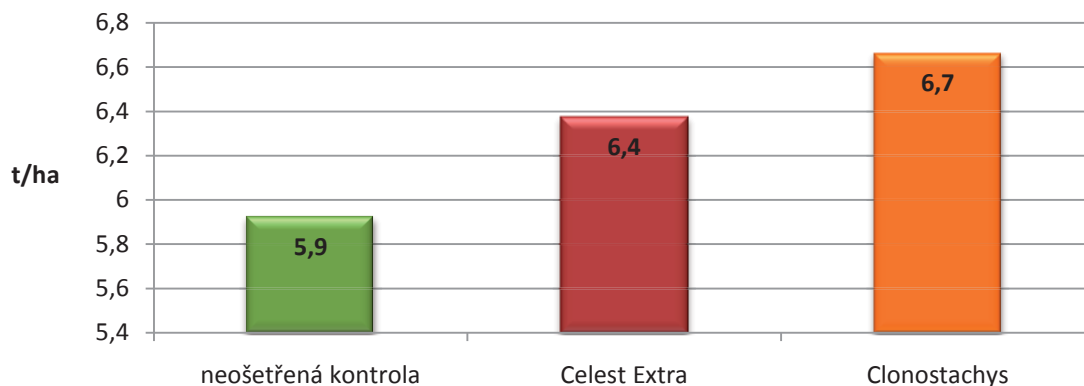


2.5.2 Vliv ošetření *C. rosea* na obilniny

V laboratorních podmínkách byl ověřován vliv ošetření osiva mykoparazitickou houbou *Clonostachys rosea* na klíčivost, ve skleníkových nádobových pokusech byl ověřován vliv ošetření na vzcházivost a rychlost růstu rostlin jarní a ozimé pšenice. U jarní pšenice ošetření stimulovalo klíčivost, nemělo však vliv na vzcházivost a hmotnost rostlin ve stáří 22 dnů. U ozimé pšenice byla mírně vyšší vzcházivost, nebyl prokázán vliv na hmotnost rostlin.

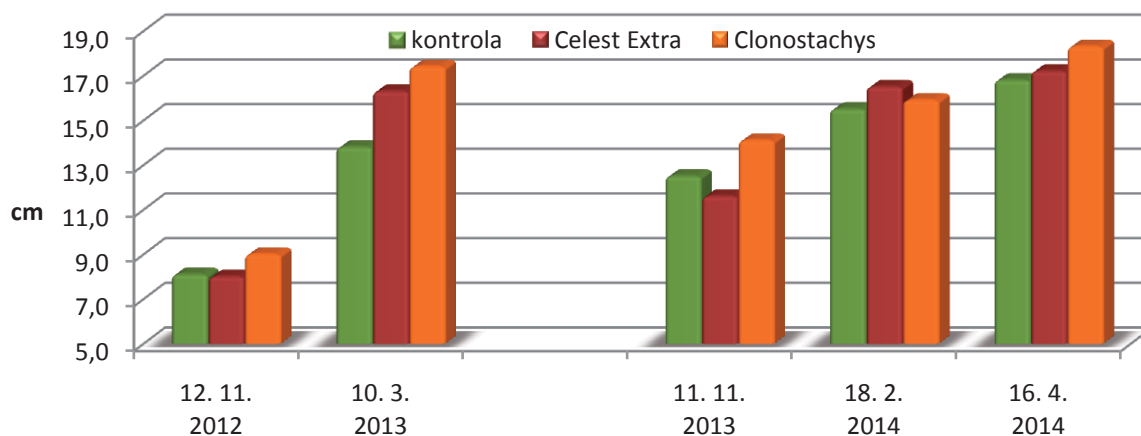
Pro ověření účinnosti ošetření osiva ozimé pšenice (odrůda Potenzial) byly v letech 2012 a 2013 založeny polní pokusy na provozní konvenční ploše. Lokalita se nachází v mírně teplé vlhké klimatické oblasti v nadmořské výšce 240 m v řepařské výrobní oblasti s hlinitopísčitou půdou. Předplodinou byla řepka ozimá. Varianty pokusu: neošetřená kontrola, ošetření přípravkem Celest Extra a ošetření přípravkem obsahujícím směs čtyř kmenů druhu *Clonostachys rosea*. Insekticidní a herbicidní ochrana a hnojení byly provedeny společně s ostatní osetou plochou, fungicidní ochrana provedena nebyla. Hodnotila se vzcházivost, přezimování a dále v polovině listopadu a v polovině března velikost a hmotnost rostlin. Po sklizni (2013) byl vyhodnocen výnos.

Graf 3 Výnos pšenice ozimé (odrůda Potenzial) v roce 2013 v jednotlivých variantách ošetření osiva biologickým přípravkem na bázi 4 kmenů *Clonostachys rosea* a fungicidním přípravkem Celest Extra.



Ošetření osiva *C. rosea* prakticky nemělo ve dvou pokusných letech vliv na vzcházivost, došlo – stejně jako u chemického mořidla – ke snížení počtu prezimovaných rostlin (počet rostlin/m²). Ošetření osiva mělo stimulační vliv na velikost kořenů rostlin, tento efekt se projevil při jarním hodnocení (Graf 4). Ve sklizni roku 2013 byl ve variantě s osivem ošetřeným houbou *Clonostachys* zvýšen výnos jak oproti kontrole, tak oproti variantě s osivem ošetřeným fungicidním přípravkem Celest Extra (Graf 3). Na základě výsledků rozboru rhizosféry provedeného na jaře 2013 byla zjištěna účinnost biologického přípravku na půdní fytopatogenní houby – v kontrolní variantě byla z rhizosféry izolována mimo jiné i *Rhizoctonia* sp., zatímco v ošetřených variantách nikoli. Bylo také izolováno méně kolonií *Fusarium* spp. než v kontrolní variantě.

Graf 4 Délka kořenů pšenice ozimé (odrůda Potenzial) po ošetření osiva biologickým přípravkem na bázi 4 kmenů *Clonostachys rosea* a fungicidním přípravkem Celest Extra.



2.5.3 Vliv ošetření *C. rosea* na travní porosty

V laboratorních podmínkách a ve skleníkových pokusech byla hodnocena klíčivost a vzcházivost semen jednotlivých druhů trav. Přípravek byl aplikován přímo na osivo před setím. V polních pokusech byly ošetřovány postřikem a rozhozem zátěžové trávníky různého stáří a druhového složení založené na pozemcích VST Zubří a na golfovém hřišti v Rožnově pod Radhoštěm. Byl hodnocen celkový zdravotní stav porostů a také četnost výskytu spór saprotrofních a patogenních hub na nadzemní hmotě a četnost výskytu mykoparazitických hub na kořenech rostlin.

Ošetření osiva vybraných travních druhů biologickým přípravkem před setím neovlivňovalo jejich klíčivost ani vzcházivost.

Aplikace biologického přípravku do již založených trávníků redukovala počet patogenních i saprotrofních druhů hub a jejich sporulaci tím, že došlo ke konkurenční kolonizaci rhizosféry trav. Byl omezen výskyt a škodlivost zejména půdních fytopatogenních hub (*Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, původce antraknózy trávníku - *Colletotrichum graminicola*). Proti chorobám nadzemních částí – padlí (*Blumeria graminis*), rzivosti (*Puccinia* spp.), kornatce (*Laetisaria fuciformis*) – byla biologická ochrana neúčinná a jejich redukce je možná jen v kombinaci s aplikací dodatečné fungicidní ochrany (přípravky na bázi azoxystrobinu).

2.5.4 Vliv ošetření *C. rosea* na zeleninu (brambory, česnek aj.)

Sadba brambor byla ošetřena namočením hlíz v suspenzi přípravku obsahujícím 4 kmeny *C. rosea*. Brambory byly vysazeny až po zaschnutí přípravku. Ošetření sadby brambor mělo pozitivní vliv na zdravotní stav rostlin i sklizených hlíz.



Kořeny byly méně napadeny komplexem hub *R. solani* a *Colletotrichum* sp. Napadení hlíz strupovitostí (*Streptomyces scabiei*) bylo u ošetřené varianty v roce 2011

Obrázek 7 Brambory (Laura): vlevo – sadba ošetřena biologickým přípravkem na bázi 4 kmenů *Clonostachys rosea*, vpravo – neošetřená kontrola (poškození kořenů houbou *Rhizoctonia solani* a hlíz strupovitostí brambor); Víkřovice 2012

nižší o 79 % a v roce 2013 o 94 % ve srovnání s neošetřenou kontrolou. U varianty ošetřené směsí izolátů/kmenů houby *Clonostachys* došlo v letech 2011 a 2012 k prodloužení vegetační doby o 8–10 dnů. Průměrný počet sklizených hlíz byl u ošetřené varianty o 14 % vyšší a průměrný výnos o 23 % vyšší než u neošetřené kontroly.

Na sadbu česneku paličáku (odrůda Karel IV.) nebo jarního česneku (odrůda Japo) byl biologický přípravek aplikován v dávce 10 g/1 kg sadby. V pokusech byla zařazena také varianta s aplikací dolomitického vápence do řádků k vysazeným stroužkům (1 kg/10 m²) a varianta s ošetřením sadby fungicidním přípravkem Rovral Aquaflo (0,4% roztok). Biologický přípravek měl pozitivní vliv na zvýšení výnosu a velikosti sklizených cibulí česneku ve srovnání s neošetřenou kontrolou. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u varianty se sadbou ošetřenou biologickým přípravkem s aplikací dolomitického vápence.



Obrázek 8 Stroužky česneku ošetřené biologickým přípravkem na bázi 4 kmenů *Clonostachys rosea*



Obrázek 9 Česnek paličák po ošetření sadby biologickým přípravkem na bázi 4 kmenů *Clonostachys rosea* (vpravo) ve srovnání s neošetřenou sadbou (vlevo); Vikýřovice 2011

U mrkve, která byla vyseta do půdy s vysokou zamořeností fytopatogenní houbou *Rhizoctonia solani*, byl u varianty ošetřené houbou *C. rosea* zjištěn o 97 % nižší počet nekrotizovaných kořenů než u neošetřené kontroly.

Experimentální vzorky byly úspěšně odzkoušeny i v provozních podmínkách u pěstitelů cibule a celeru. U cibule byl přípravek aplikován na osivo (4 g/kg), u celeru do substrátu při pěstování sadby. Přípravek měl pozitivní vliv jednak na výnosové parametry a jednak na nízké ztráty vzniklé skladováním. U cibule byl výnos o 6 % vyšší u ošetřené varianty ve srovnání s kontrolou a ztráty při skladování byly o 69–82 % nižší.



Obrázek 10 Napadení mrkve fytopatogenní houbou *Rhizoctonia solani* v kontrolní variantě (vpravo) oproti variantě ošetřené přípravkem na bázi 4 kmenů *Clonostachys rosea* při setí (vlevo); Vikýřovice 2012

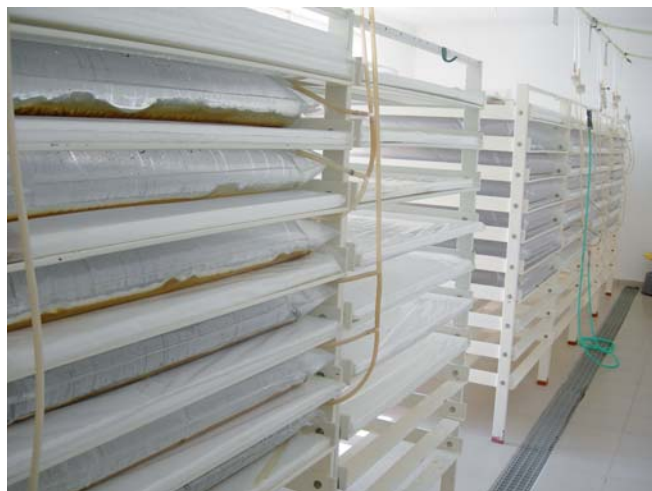
2.6 Biologický přípravek na bázi hub *Clonostachys rosea*

Metodika je určena pro aplikaci biologického přípravku CLONOPLUS, který obsahuje směs 4 kmenů *Clonostachys rosea*, která je přihlášena jako užitečný vzor č. 26757. Přípravek bude vyrábět firma FYTOVITA, spol. s r.o. a v současné době je v registračním řízení. Jedná se o jemný dispergovatelný prášek s aditivem uhličitanu vápenatého, který podporuje růst hub *C. rosea*. Přípravek je určen k ošetření osiv a sadby a k aplikaci do půdy.

Metodiku lze využít i pro aplikaci biologického přípravku Gliorex, který vyrábí firma FYTOVITA, spol. s r.o. Gliorex byl registrován v roce 2010 jako pomocný rostlinný přípravek. Obsahuje spory pouze jednoho kmene *Clonostachys rosea* a spory houby *Trichoderma asperellum*.

2.6.1 Výroba

Houby *C. rosea* se množí povrchovou kultivací na tekutých živných půdách. Produkce myceliové a sporové biomasy probíhá u jednotlivých kmenů odděleně. Nosičem



Obrázek 11 Kultivace hub ve vácích

spor je srážený oxid křemičitý. Uhličitan vápenatý je v přípravku zastoupen minimálně 10% podílem. Koncentrace spor hub v přípravku je řádově 10^6 – 10^7 CFU/g.

2.6.2 Aplikace biologického přípravku

Biologický přípravek na bázi hub *Clonostachys rosea* lze aplikovat do půdy, na osivo nebo sadbu, nebo se může přimíchávat do výsevních substrátů.

2.6.2.1 Moření osiva

Při aplikaci na osivo se doporučuje osivo nejdříve zvlhčit vodou s přídavkem adheziva (lepidla) na bázi polyvinylacetátu a posléze zaprášit přípravkem a promíchat. K tomuto způsobu moření je vhodná mořička s dávkovačem práškových přípravků. Pokud to mořicí zařízení nedovoluje, je možné přípravek rozmíchat v daném množství vody s adhezivem a tuto suspenzi aplikovat na osivo. První způsob aplikace přípravku udrží více životaschopných spor. Dávkuje se většinou 400 g přípravku/100 kg osiva.

Doporučený způsob aplikace na osivo obilnin při použití mořičky typu Rotostat:

Na moření 1 t osiva se připraví suspenze: 4 kg biologického přípravku + 16–20 l 1,5% roztoku adheziva a vody (př. na 20 l roztoku rozmíchat v 19,7 l vody 300 ml adheziva). Množství vody je možné upravit podle potřeby pro konkrétní typ mořicího zařízení. Obdobný způsob moření lze využít i pro osiva jiných plodin (luskoviny, řepka aj.).



Obrázek 12 Osivo bobu ošetřené biologickým přípravkem na bázi 4 kmenů *Clonostachys rosea* (nahore) a neošetřené osivo bobu (dole)

Doporučený způsob aplikace při použití mořičky typu Rotostat s dávkovačem práškových přípravků:

Pro kombinované moření osiva řepky biologickým přípravkem s chemickými mořidly se přípravek aplikuje na mořičce Rotostat s dávkovačem práškových přípravků. Nejdříve se na osivo za stálého míchání aplikuje suspenze chemických mořicích přípravků – na 1 t osiva: Chinook 200 FS (20 l) + Vitavax 2000 (4 l) + voda (4–7 l). Posléze se dávkovačem práškových přípravků aplikuje řádně homogenizovaná směs podpůrného přípravku pro zlepšení technologických vlastností mořeného osiva Talkum Blue (16 kg) a biologického přípravku (4 kg) v dávce 20 kg/t osiva. Dávka na vsádku 20 kg osiva je 400 g.



Obrázek 13 Klíčící kombinaně ošetřené semínko řepky

2.6.2.2 Moření sadby česneku

Pro moření malého množství sadby česneku nebo jiných cibulovin (cca 100–200 kg) se sadba nejprve zvlhčí vodou s adhezivem a posléze se zapráší přípravkem v dávce 1 kg/100 kg a promíchá lopatou. Sadba se nechá rozprostřená zaschnout. Jako adhezivum se osvědčil 1% roztok lepidla na bázi polyvinylacetátu.

Pro moření velkého množství sadby česneku (cca 1,5 t) lze využít kádě, která slouží k chemickému moření sadby česneku. Do kádě s 1800 l vody se rozpustí 40 kg biologického přípravku. Do lázně se ponoří 3 síťové palety naplněné sadbovými stroužky česneku (cca 500 kg/1 síťovou paletu). Ponořená sadba se po 5 minutách vytáhne z lázně, nechá se okapat a osuší se v paletě za nuceného proudění vzduchu. Na česneku ulpí přibližně 10 % z mořicího roztoku.

2.6.2.3 Moření sadby brambor

Ošetření sadbových hlíz brambor se provádí během výsadby speciálními aplikátory umístěnými na sazeči suspenzí biologického přípravku (4 kg/t) s vodou (60–80 l/ha).

Současně s hlízami je ošetřeno i jejich okolí, takže dochází k zasažení a redukci propagul fytopatogenní houby *Rhizoctonia solani* (označované jako kořenomorka brambor) v půdě v bezprostřední blízkosti hlíz.

2.6.2.4 Doporučená aplikace na travní porost

Při aplikaci přípravku na travní porost se jako nejlepší způsob ošetření osvědčila aplikace postřikem pomocí postřikovače, v dávce 4 kg přípravku a 600 l vody na ha. Postřikovou jíchu je třeba pečlivě homogenizovat řádným promícháním a samotná postřiková kapalina musí proniknout co nejhlouběji do porostu. Pokud aplikaci přípravku kombinujeme s ošetřením fungicidem (azoxystrobin), či aplikací dolomitického vápence (v dávce 1–5 t/ha), je vhodné daný fungicid či dolomitický vápenec aplikovat zvlášť, s minimálně 14denním předstihem.

2.6.2.5 Doporučená aplikace do půdy a do substrátů

Pro aplikaci do půdy je možné přípravek smíchat s dolomitickým vápencem, zeolitem nebo fertilizačními granulemi PRP-SOL a aplikuje se rozhozem v dávce minimálně 4 kg/ha. Větší aplikační množství biologického přípravku je výhodou. V případě aplikace s dolomitickým vápencem nebo zeolitem se připraví směs (1 kg přípravku + 39 kg vápence/zeolitu) a na plochu 1 ha se rozmetadlem aplikuje 160 kg této směsi, tzn. 4 kg biologického přípravku/ha. Při aplikaci s fertilizačními granulemi PRP-SOL se dává 40 g přípravku na 3–4 kg PRP-SOL a směs se aplikuje v množství dle požadavků na přípravek PRP-SOL.

Do výsevních substrátů pro pěstování sadby zeleniny, okrasných rostlin aj. se přimíchá 20 g biologického přípravku na 100 l substrátu nebo se přípravek aplikuje zálivkou na substrát v sadbovačích v množství 2–4 g/m². Zálivku se doporučuje po 14 dnech opakovat.

2.6.3 Životaschopnost konidií *C. rosea* v přípravku

Vyrobený biologický přípravek je balen do alusáčků (malá balení) nebo do plastových PE-pytlů (velká balení). 1 g přípravku obsahuje řádově cca 10⁷ spor. Po půl roce skladování při pokojové teplotě (23–25 °C) dochází k poklesu životaschopných spor o jeden řád, tedy na 10⁶ spor/1 g, což je ještě dostačující množství pro dobrou účinnost. Toto množství se v přípravku udržuje cca 1 rok od výroby. V otevřeném nespoteřebaném sáčku dochází rychle k úbytku životaschopných spor, proto je



Obrázek 14 Kmeny *Clonostachys rosea* na RBCh agaru

třeba nespotřebovaný přípravek skladovat v lednici. Při skladování přípravku v lednici při teplotě do 8 °C nedochází po půl roce skladování k poklesu množství životaschopných spor ani v již otevřeném sáčku. Uspokojivé množství životaschopných spór je v lednici zachováno i po dvou letech skladování. Při skladování otevřeného sáčku je třeba zamezit zvlhnutí přípravku.

3 NOVOST POSTUPŮ

Biologický přípravek kombinující několik kmenů *Clonostachys rosea* f. *rosea* a *C. rosea* f. *catenulata* není v současné době vyráběn v ČR ani v zahraničí. Ve Finsku, USA a Kanadě jsou vyráběny biologické přípravky na bázi vždy jednoho kmene *C. rosea* f. *rosea* nebo *C. rosea* f. *catenulata*. Aditivum CaCO₃ v biologickém přípravku pozitivně ovlivňuje růst a sporulaci kmenů *Clonostachys rosea*. Navíc se podílí na neutralizaci kyselých metabolitů některých fytopatogenních hub (kyselina šťavelová, kyselina fusarová aj.).

Směsný přípravek se vyznačuje vyšší a rychlejší mykoparazitickou účinností proti širšímu spektru fytopatogenních hub. Degraduje půdní fytopatogenní houby *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Mycocentrospora acerina*, *Colletotrichum* spp., *Alternaria* spp. aj.

Přípravek aplikovaný na osivo, sadbu nebo do půdy pozitivně ovlivňuje zdravotní stav a výnos rostlin. Snižuje četnost výskytu fytopatogenní mykoflory na osemení a v rhizosféře rostlin. Biologický přípravek lze aplikovat na osivo jakékoliv zemědělské plodiny. Velmi pozitivní účinek byl prokázán u luskovin, obilnin, česneku, cibule, brambor aj. Kmeny *Clonostachys rosea* snižují půdní zamořenost trvalými zárodky fytopatogenních hub (sklerocia, mikrosklerocia, chlamydo-spory, oospory). Oproti jiným mykoparazitickým druhům hub (např. *Trichoderma*) působí i při nižších teplotách (7–10 °C), což umožňuje úspěšné použití v polních podmínkách.

Kmeny *Clonostachys rosea* obsažené v biologickém přípravku jsou kompatibilní s fungicidními přípravky Vitavax 2000, Maxim XL 035, Cruiser OSR, Amistar, Ortiva, Rovral Aquaflo, Sfera. Zatímco fungicidní mořící přípravky působí pouze krátkodobě během vzcházení rostlin, mykoparazitické houby se v okolí kořenového systému (rhizosféře) udržují po celou vegetaci. Mořidla nepůsobí na klidové struktury fytopatogenních hub (sklerocia), naopak mykoparazitické houby je v půdě rozkládají.

4 POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika je určena pro pěstitele polních plodin, zeleniny v polních i skleníkových podmínkách a pro pěstitele travních porostů. Je vhodná pro pěstitele v ekologickém zemědělství i v systému integrované ochrany rostlin. Metodika seznamuje pěstitele s možnostmi využití *Clonostachys rosea* proti půdním fytopatogenním houbám, představuje nový přípravek a poskytuje návod k jeho aplikaci. Metodika tak přispívá k možnosti faktického uplatňování obecných zásad integrované ochrany rostlin (vyhláška č. 205/2012 Sb, § 3, odst. 4). Před chemickými metodami se dává přednost biologickým, fyzikálním a jiným nechemickým metodám, pokud zajistí účinnou ochranu proti dotčeným škodlivým organismům.

5 EKONOMICKÉ ASPEKTY

Ošetření osiv/sadby povede k lepšímu zdravotnímu stavu rostlin, a tím ke zvýšení výnosů. Dosažením vyšších výnosů se předpokládá, že finanční výnosy převyšují vložené materiálové a provozní náklady. Po aplikaci přípravku na sadbu česneku, brambor, na osivo cibule nebo aplikací do substrátu při předpěstování sazenic celeru lze očekávat nejen vyšší výnosy po sklizni, ale i nižší ztráty způsobené skládkovými hnilobami. U luskovin ošetření osiv stimuluje rozvoj a množství a velikost vytvořených kořenových hlízek o 40–80 % s následným vlivem na obohacení půdy dusíkem po sklizni. Klesají tím nároky na hnojení dusíkem pro následující plodinu.

Po aplikaci na osivo obilnin (ozimé pšenice aj.) lze předpokládat zvýšení výnosu při omezení fungicidní ochrany. Očekává se, že nebude nutné časně jarní ošetření proti chorobám vyvolaným půdními patogeny.

Ošetření travních porostů biologickým přípravkem omezuje rozvoj fytopatogenní mykoflóry v porostu, zejména půdních patogenů v porostu, čímž napomáhá zlepšit jejich zdravotní stav. Rovněž dochází k rychlejšímu rozkladu nahromaděné odumřelé organické hmoty v půdě, což má pozitivní vliv na příjem živin a celkový vzhled trávníku.

6 SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- BARNET H. L., LILLY V. G. (1962): A destructive mycoparasite – *Gliocladium roseum*. *Mycologia*, 54: 72–77.
- DOMSCH K. H., GAMS W., ANDERSON T. H. (2007): Compendium of soil fungi. 2nd edition, IHW – Verlag Eching, 672 pp.
- HAIDER K., DOMSCH K. H. (1969): Decomposition and transformation of lignified plant material by microscopic soil fungi. *Arch. Microbiol.*, 64: 338–348.
- PACHENARI A., DIX N. J. (1980): Production of toxin and wall degrading enzymes by *Gliocladium roseum*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 74: 561–566.
- PENG G., SUTTON J. C. (1991): Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Can. J. Plant Pathol.*, 13: 247–257.
- RODRIGUEZ M. A., CABRERA E., GOZZO F. C., EBERLIN M. N. et GODEAS A. (2011): *Clonostachys rosea* BAFC 3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist mechanisms and potentials as a biocontrol agent. – *J. Appl. Microbiology* 110 (5): 1177–1186.
- SCHROERS H. J., SAMUELS G. J., SEIFERT K. A., GAMS W. (1999): Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia*, 91: 365–385.
- XUE A. G. (1988): *Gliocladium roseum* strains useful for the control of fungal pathogens in plants. US Patent No. US6495133.

7 SEZNAM VÝSLEDKŮ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY VYDÁNÍ METODIKY

- ONDŘEJ M., ONDRÁČKOVÁ E., NESRSTA M. Využití mykoparazitických hub v integrované ochraně luskovin. *Úroda* 2011, roč. LIX, č. 11, s. 48–50.
- ONDRÁČKOVÁ E., ONDŘEJ M. Vliv mykoparazitických hub na zdravotní stav a výnosové parametry luskovin (hrách, bob, sója, fazol). *Sprav. Slov. Mykol. Spol.* 2011, č. 38, s. 49.
- ONDŘEJ M., ONDRÁČKOVÁ E., NESRSTA M. Využití mykoparazitických hub rodu *Clonostachys* v ochraně rostlin proti půdním patogenům. *Úroda* 2012, roč. LX, č. 3, s. 64–67.
- ONDRÁČKOVÁ E., ONDŘEJ M. Ochrana luskovin proti chorobám z hlediska uplatňování zásad integrované ochrany rostlin. *Úroda* 2012, roč. LX, č. 4, s. 74–76.

ONDŘEJ M., ONDRÁČKOVÁ E. Antagonistická a mykoparazitická účinnost kmenů *Clonostachys* a *Chaetomium* proti vytypovaným fytopatogenním houbám. Mykologické listy 2012, č. 120, s. 24–27.

ONDŘEJ M., ONDRÁČKOVÁ E. Výběr kmenů mykoparazitických hub rodu *Clonostachys* využitých k výrobě biopreparátů – pomocných rostlinných přípravků. Rostlinolékař, 2012, roč. 23, č. 2, s. 24–27.

ONDŘEJ M., CAGAŠ B., ONDRÁČKOVÁ E., NESRSTA M. Biologická ochrana trávníků proti patogenním houbám. Úroda 2012, roč. LX, č. 12, s. 25–28.

PROKINOVÁ E., ONDŘEJ M., ONDRÁČKOVÁ E., 2012: *Clonostachys rosea* – možnost využití v ochraně rostlin. Zborník abstraktov z XIX. Slovenskej a českej konferencie o ochraně rastlín, Nitra, s. 41–42.

ONDRÁČKOVÁ, E., ONDŘEJ, M., PROKINOVÁ, E., NESRSTA, M., CAGAŠ, B. Kořenové hniloby sóje – možnosti biologické ochrany. Úroda 2013, roč. LXI, č. 4, s. 50–54.

ONDRÁČKOVÁ, E., ONDŘEJ, M., PROKINOVÁ, E., NESRSTA, M. Mycoparasitic fungi reducing the incidence and virulence of *Bipolaris sorokiniana*. Czech Mycology 2013, roč. 65, č. 1, s. 103–112.

ONDŘEJ, M., ONDRÁČKOVÁ, E. Biologická ochrana česneku. Farmář, 2014, č. 2, s. 30–33.

AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o., Šumperk. Směs kmenů *Clonostachys rosea* s aditivem CaCO₃. Původce: Eliška Ondráčková, Michal Ondřej. Int. Cl.: A01N63/04. Česká republika. U1 26757. 7. 4. 2014.

Tisk: Grafotyp s.r.o., Šumperk
Náklad: 200 ks

Tato publikace neprošla jazykovou úpravou.
Za věcnou a jazykovou správnost odpovídají autoři.



AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o.
Zemědělská 2520/16
787 01 Šumperk
Tel.: 583 382 111
Fax.: 583 382 999
info@agritec.cz
www.agritec.cz