

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra ochrany rostlin**



**Využití bakteriálních přípravků k ochraně řepky proti  
houbovým chorobám kořenového krčku**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Monika Halbrštatová**

**Obor studia: Pěstování rostlin**

**Vedoucí práce: doc. Ing. Jan Kazda, CSc.**

© 2019 ČZU v Praze



## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci " Využití bakteriálních přípravků k ochraně řepky proti houbovým chorobám kořenového krčku" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 18. 4. 2019

---



## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce, panu doc. Ing. Janu Kazdovi, CSc. za jeho odborné a cenné rady a Ing. Evě Zuskové za její spolupráci při pokusech a poskytnutí důležitých informací, nezbytných pro dokončení mé bakalářské práce.

# Využití bakteriálních přípravků k ochraně řepky proti houbovým chorobám kořenového krčku

## Souhrn

Fómová hniloba patří k nejvýznamnějším chorobám řepky ozimé. V letech silného výskytu může způsobit výnosové ztráty až 50 %. Cílem bakalářské práce bylo zhodnotit možnosti biologické ochrany řepky ozimé proti Drobníčce skvrnité (*Leptosphaeria maculans*) prostřednictvím skleníkového pokusu. Odebrané rostliny jednotlivých variant byly laboratorně diagnostikovány na přítomnost patogenu metodou PCR. Výzkum probíhal ve výukových sklenících České zemědělské univerzity od 14. 11. do 12. 12. 2018 na dvou odrůdách (Hornet, Croquet) řepky ozimé. Na rostliny byl inokulován patogen *L. maculans* dvěma metodami (potření listu suspenzí spor, výřez mycelia aplikovaný na porušenou epidermis) a rostliny byly následně ošetřeny bakteriálními biologickými přípravky (Hirundo, Prometheus, Serenade) formou postřiku. V předem stanovených časových intervalech (po 1 týdnu) byl hodnocen výskyt a rozvoj patogenu *L. maculans*. V průběhu šesti týdnů byl porost hodnocen pomocí 10 bodové stupnice, která sledovala zdravotní stav rostlin a v šestém týdnu během finálního hodnocení byl zvážen objem biomasy jednotlivých variant a opakování. Laboratorní analýza PCR potvrdila, že v užití biologických přípravků na ochranu rostlin je do budoucna velký potenciál.

**Klíčová slova:** Drobníčka skvrnitá, řepka ozimá, Serenade, Hirundo, Prometheus, *Leptosphaeria maculans*

# Use of bacterial preparations to protect rape against fungal diseases of the root collar

## Summary

Black leg is one of the most important winter rape diseases. In years of high occurrence, it can cause up to 50% yield loss. The aim of the bachelor thesis was to evaluate the possibilities of biological control of winter rape against *Leptosphaeria maculans* in greenhouse experiment. The plants of individual variants were collected and laboratory diagnosed for the presence of pathogen by the PCR method. The research was carried out in the greenhouses of the Czech University of Life Sciences from 14 November to 12 December 2018. On two varieties (Hornet, Croquette) of winter rape, the pathogen *L. maculans* was inoculated by two methods (smear the leaf with a spore suspension, a cut-out of the mycelium applied to the damaged epidermis) and the plants were subsequently treated with bacterial biological preparations (Hirundo, Prometheus, Serenade) by the form of spraying. The occurrence and development of the *L. maculans* pathogen was evaluated at predetermined time intervals (after 1 week). In the course of six weeks, the growth was evaluated using a 10-point scale that monitored plant health and at 6<sup>th</sup> week during the final evaluation, the plants of each variant and repetition were weighed. Laboratory analysis PCR has confirmed that there is great potential in the future for plant protection products.

**Keywords:** *Phoma lingam*, Winter Rape, Serenade, Hirundo, Prometheus, *Leptosphaeria maculans*

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Cíl práce</b> .....	<b>2</b>
<b>3 Literární rešerše</b> .....	<b>3</b>
<b>3.1 Řepka ozimá</b> .....	<b>3</b>
3.1.1 Botanická charakteristika.....	3
3.1.2 Situace ve světě.....	4
3.1.3 Historie pěstování v Čechách .....	4
3.1.4 Nároky na prostředí .....	5
3.1.5 Pěstitelské technologie.....	5
3.1.6 Výživa řepky ozimé.....	6
3.1.7 Hnojení .....	7
3.1.8 Odrůdy .....	7
<b>3.2 Hospodářsky významné choroby řepky</b> .....	<b>8</b>
3.2.1 Verticiliové vadnutí řepky ( <i>Verticillium longisporum</i> ) .....	8
3.2.2 Bílá hniloba řepky ( <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ).....	8
3.2.3 Padlí brukvovitých ( <i>Erysiphe cruciferarum</i> ).....	9
3.2.4 Nádorovitost kořenů brukvovitých .....	9
<b>3.3 Fómové černání stonků řepky (<i>L. maculans</i> (Desm.) Ces. &amp; De Not.)</b> .....	<b>9</b>
3.3.1 Charakteristika <i>L. maculans</i> .....	10
3.3.2 Historie <i>P. lingam</i> .....	10
3.3.3 Vývojový cyklus <i>L. maculans</i> .....	11
3.3.4 Výzkum vlivu počasí na výskyt choroby.....	12
3.3.5 Ochrana proti patogenu <i>L. maculans</i> .....	13
<b>3.4 Biologická ochrana</b> .....	<b>14</b>
3.4.1 Serenade.....	14
3.4.2 Hirundo .....	14
3.4.3 Prometheus .....	15
<b>4 Metodika</b> .....	<b>16</b>
<b>4.1 Skleníkový pokus</b> .....	<b>16</b>
4.1.1 Materiál.....	16
4.1.2 Metody inokulace .....	16
4.1.3 Aplikace biologických preparátů .....	16



4.1.4	Způsob hodnocení.....	17
<b>4.2</b>	<b>Laboratorní diagnostika .....</b>	<b>18</b>
4.2.1	Izolace celkové DNA pomocí CTAB .....	19
4.2.2	PCR (Polymerase Chain Reaction - Polymerázová řetězová reakce).....	20
4.2.3	Agarózová elektroforéza .....	20
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>22</b>
<b>5.1</b>	<b>Skleníkové pokusy.....</b>	<b>22</b>
5.1.1	Hodnocení hmotnosti biomasy jednotlivých variant .....	22
5.1.1.1	Hodnocení hmotnosti pro odrůdu Croquet .....	22
5.1.1.2	Hodnocení hmotnosti pro odrůdu Hornet.....	24
5.1.2	Hodnocení zdravotního stavu porostu jednotlivých variant .....	26
5.1.2.1	Hodnocení zdravotního stavu pro odrůdu Croquet .....	26
5.1.2.2	Hodnocení zdravotního stavu pro odrůdu Hornet .....	28
<b>5.2</b>	<b>Laboratorní diagnostika .....</b>	<b>30</b>
5.2.1	Izolace DNA .....	30
5.2.2	Gelová elektroforéza .....	31
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>32</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>34</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>35</b>



# 1 Úvod

Snahou všech vyspělých zemí je ochrana životního prostředí. V zemědělství se tato snaha nejlépe projevuje na způsobu ochrany konvenčních plodin proti chorobám a škůdcům. Biologické přípravky představují možnou alternativu ke konvenčním chemickým přípravkům pro ochranu rostlin. Hlavní výhodou je nezatížení životního prostředí chemickými rezidui pesticidů a jsou tudíž vítanou pomocí v konvenčním i v ekologickém zemědělství. Ve světě stále ve značné míře převažuje používání chemických pesticidů, nicméně podíl biopesticidů každým rokem stoupá. Příkladem je Belgie, u které tvoří biopesticidy až 10 % z celkového obratu všech pesticidů. Zásahu na tom má zvýšená poptávka po zdravých potravinách minimálně zatížených cizorodými látkami. Například ve Španělsku činí roční nárůst bioprodukce zeleniny až 40 % (Kuthan, 2017).

Z celosvětového hlediska patří olejninu k nejvýznamnějším konvenčním plodinám. Řepka olejná ve světě zaujímá významnou pozici a v České republice je nejpěstovanější olejninou. Je to díky širokému spektru jejího využití od potravinářského průmyslu po technické využití. Právě díky obrovské ploše, na které se řepka pěstuje je snaha zajistit co nejšetrnější ochranu pro její pěstování. Zde mohou být biologické preparáty vítaným pomocníkem, který je svým složením šetrný k přírodě a přitom účinný v boji s chorobami, jež mohou rostlinu ohrozit a snížit tak výnos.

## 2 Cíl práce

Cílem bylo otestovat účinnost biologických bakteriálních přípravků ve skleníkových podmínkách proti patogenu *L. maculans*.

Dílčími cíly práce bylo

- 1) Zhodnotit, jaký způsob inokulace patogenu na rostliny zajišťuje vyšší abundanci patogenu *L. maculans*.
- 2) Otestovat rozdílný vliv patogenu *L. maculans* na odrůdu řepky ozimé s deklarovanou rezistencí (Croquet) proti odrůdě bez rezistence (Hornet).
- 3) Zjistit přítomnost patogenu v rostlinách pomocí diagnostické metody PCR.

**Hypotéza:** Existují biologické bakteriální preparáty, které mohou být využity na ochranu proti patogenu *Phoma lingam* na řepce ozimé.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Řepka ozimá

Řepka olejná (*Brassica napus L. var napus*) patří mezi naši nejdůležitější olejninu. V současné době se kromě potravinářského a kosmetického průmyslu začala intenzivně využívat i jako přídavek do pohonných hmot (Bremer et al., 2011). Jde o dvouděložnou rostlinu. Patří do čeledi brukvovitých - *Brassicaceae* (Diepenbrock et al., 1999). Vznikla pravděpodobně křížením brukve zelné a brukve řepice. Každá z těchto dvou původních rostlin přispěla polovinou své genetické informace ke vzniku dnešní řepky olejné. Řepku olejnou dělíme na ozimou a jarní (Baranyk a kol., 2010). Častější je pěstování řepky ozimé, neboť jarní odrůda je více náročná na podmínky prostředí. Řepka dává poměrně stabilní a kvalitní výnosy. Je také vynikající předplodinou díky rostlinným zbytkům, které po sklizni zůstávají v půdě. Naproti tomu, jde ale o plodinu náročnou nejen na živiny, ale i agrotechniku. V České republice se řepka pěstuje na ploše kolem 400 tisíc hektarů (Slavíková a Kumar, 2018).

#### 3.1.1 Botanická charakteristika

Kořen je kulový, dlouhý 60-70 cm. Poměrně málo rozvětvený. Boční kořeny jsou kratší, slabší s hustou sítí drobných kořínků. Jarní řepky nemají tak rozvinutý kořenový systém. Výška rostlin se pohybuje od 60 do 140 cm. Její výše závisí na odrůdě, půdních a přírodních podmínkách a hnojení. Celá rostlina je modravě zelená a ojíněná. Její lodyha je vzpřímená, kulatá, lysá, nedřevnatějící. Horní část hlavního stonku i každá větev nese hrozny květů (Škaloud, 1960).

Rostlina je fakultativně cizosprašná. Plodem je šešule, složená ze dvou chlopní a blanité přepážky. Obsahuje 15 až 20 drobných tmavých kulatých semen. Řepka tvoří hroznovité květenství se žlutými nebo bílými květy. Síla kořenového krčku je od 8-12 mm. Je to rostlina, která je v současné době hojně pěstována. Mimo pole ji můžeme vidět kolem cest, silnic, lidských obydlí, kam se dostala při přepravě z vozů a návěsů při její sklizni. Následně dochází k jejímu zplanění (Baranyk a kol., 2007).

### 3.1.2 Situace ve světě

Vrkoč a Vach (2005) uvádí, že bude poptávka po olejninách dále vzrůstat. Pozitivní je i stálost obchodních cen. Z uvedených dat vyplývá, že co se výkyvů průměrných ročních cen olejnin na mezinárodním trhu týká, jsou výkupní ceny řepky poměrně stabilní. Například oproti obilninám. Pokud jde o zvýšení produkce řepky v jednotlivých zemích, byl v letech 1994-2005 zaznamenán nejvyšší nárůst především v Brazílii a Argentině. V Argentině se zvýšil o 177,5 % a v Brazílii dokonce o 371 %. Světová produkce byla v roce 2007 50 mil. tun na 30 mil. ha s průměrným výnosem 1,67 t/ha (Bečka a kol., 2007).

Zvýšený trend spotřeby olejnin, zvláště sóji a palmového oleje, je patrný po celém světě. Zvyšuje se podíl spotřeby rostlinných olejů a tuků v lidské výživě, dále použití olejů pro nepotravinové účely a především pak jako alternativní zdroj pro produkci paliv (Vrkoč a Vach, 2005).

### 3.1.3 Historie pěstování řepky v Čechách

V našich zemích došlo k jejímu většímu rozšíření mezi lety 1820 - 1839. Po útlumu během druhé světové války se její plocha začala postupně zvětšovat a zvyšoval se i výnos. V období kolektivizace až do roku 1989 výnos z řepky stabilně rostl. Bylo to převážně díky průmyslovým hnojivům, které se začaly užívat ve vysokých dávkách (Vašák a kol., 2000).

K nárůstu ploch a zintenzivnění produkce dochází zejména po roce 1970, díky vyšlechtění tzv. „0“ odrůd s nízkým obsahem kyseliny erukové, která ve vyšší míře způsobovala zhoršení chuťových a zdravotních vlastností oleje. Staré odrůdy obsahovaly vysoké procento kyseliny erukové, kolem 45 %. Protože strava bohatá na kyselinu erukovou může u lidí rozvinout myokardiální fibrózu, začaly se šlechtit odrůdy s nízkým obsahem této kyseliny. U současných odrůd obsah kys. erukové je do 2 % (nejčastěji na úrovni několika desetin procenta, podle odrůdy). Řepkový olej obsahuje nízké procento mastných nasycených kyselin. Od roku 1992/1993 se v ČR využívá pouze tzv. „00“ odrůd řepky, jež mají obsah kyseliny erukové snížen pod 2 % a nízký obsah glukosinolátů (25  $\mu$ mol glukosinolátů na gram semene) (Bečka a kol., 2007).

Řepka se využívá v potravinářství, krmivářství, oleochemii. V současné době se po dalším zpracování používá jako přísada do pohonných hmot (Baranyk a kol., 2007).

### 3.1.4 Nároky na prostředí

Řepka ozimá je náročná na kvalitu půdy. Nejlépe jí vyhovují hluboké půdy, hlinité až hlinitojílovité se zásobou vody, humusu, základních živin, vápníku a hořčíku. Nesnáší půdy suché písčité ani mokré a kyselé zároveň, půdy těžké se sklonem k hrudkovitosti (Škaloud, 1960). Na lehkých, mělkých půdách ji lze pěstovat jen za zvýšeného hnojení. Přestože vyžaduje dostatek tepla a vody, se s úspěchem pěstuje i ve vyšších polohách. V první části léta a po dobu kvetení potřebuje déšť. Velké sucho nebo stálý déšť nesnáší. Roční průměrné teploty by se měly v ideálním případě pohybovat okolo 8 °C, úhrn srážek mezi 600 – 800 mm a pH půdy v intervalu 6 – 6,8. Dále je výhodnější pěstování na spíše rovinném terénu než svažitém. Již sklon 7 % snižuje úrodnostní potenciál o 10,2 % (Torma, 2007).

### 3.1.5 Pěstitelská technologie

Půda pro řepku musí být pečlivě připravena. Musí být bez hrud, nezaplevelená a bez posklizňových zbytků. Pozemek po předcházející plodině se musí co nejdříve podmítnout, aby zůstala v zemi vláha a semena plevelů mohla lépe vzejít. V klasické předset'ové přípravě se provede středně hluboká orba, při které se do půdy zapravují fosforečná a draselná hnojiva, popřípadě hnůj (Baranyk a kol., 2010).

Velký důraz je také kladen na včasnost založení porostu. Zažítým datem je sice 25. srpen, pěstitelé se však snaží zasít o týden až dva dříve, aby mohla rostlina využít tzv. chmelových dešťů, které přicházejí obvykle po 20. srpnu. Rostlina má tak šanci vytvořit dostatečný kořenový systém, který ji pomůže ve zvládnutí nadcházející zimy (Souffi info, 2016).

Důležitý je též výběr správné předplodiny. Tou by měla být taková plodina, která je včas sklizena a zanechá půdu čistou a kyrou. V dřívějších dobách byly doporučovány rané brambory, směsky (které se nyní už prakticky nesejí), hrách, jetel (Škaloud, 1960).

V současné době je úspěšně pěstována po obilovinách (ozimém ječmenu, žitu, pšenici). Dříve byly tyto plodiny považovány za nevhodné z důvodu značného vyčerpání živin. Ty jsou nahrazeny organickou hmotou dodanou rozdrčenou slámou ze sklizně předcházející obiloviny a průmyslovými hnojivy. Krajně nevhodnou předplodinou pro řepku je řepka sama a to důvodu chorob a škůdců, kteří po předchozí řepce zůstanou na poli. Ideální je minimálně 4-5 roční odstup. Řepka má příznivý vliv na následující plodinu, kořeny otvírají půdu

a přispívají k jejímu provzdušnění. Listy rostlin půdu zastiňují, snižují tak její vysychání. Řepka dodává do půdy organickou hmotu a podílí se na vytvoření drobkovité struktury půdy. Chrání proti vodní a větrné erozi. To vše řadí řepku mezi vynikající předplodiny (Torma, 2007).

### **3.1.6 Výživa řepky ozimé**

Pokud jde o spotřebu živin, patří podle Baranyka a kol. (2007) řepka mezi náročné plodiny na hnojení. Řepka z jednoho hektaru půdy vyčerpá přibližně 208 – 236 kg dusíku, 160 – 200 Kg draslíku, 120 – 152 kg vápníku, 44 – 72 kg fosforu, 16 – 24 kg hořčíku a 48 – 64 kg síry. Níže budou blíže popsány tři nejdůležitější prvky: Dusík, fosfor, draslík. Kromě nich je však důležité mít na mysli i adekvátní příjem ostatních prvků jako je hořčík, bór nebo vápník.

#### **Dusík**

Pro výnos je rozhodující dusík. Dodává se pomocí minerálních hnojiv či kejdy. Kromě výnosu má nedostatek dusíku za následek omezení růstu rostlin a jejich orgánů. Dochází k opadu květů a pupenů, snížení počtu šesulí (Koenig et al., 2011). Rostliny jsou celkově slabší, nižší, barva je světlejší. Nadbytek naopak prodlužuje dozrávání šesulí, zhoršuje citlivost rostliny vůči chladu (Jones et Olson-Rutz, 2016).

#### **Fosfor**

Dostatek fosforu je důležitý na počátku vegetace, v období tvorby květenství a tvorby semen. Při nedostatku fosforu, dochází k přerušení přenosu energie. Je narušen proces fotosyntézy. Listy mají purpurové až fialové zbarvení vlivem antokyanů. Zpožďuje se růst kořenů a je omezena tvorba semen (Süzer, 2016).

#### **Draslík**

Draslík podporuje osmotický tlak v buňkách, čímž dochází k lepšímu transportu látek v rostlině. Rostliny jsou při dostatku draslíku pevnější, mrazu vzdornější, dobře regenerují. Jsou také odolnější k houbovým chorobám. Poznávacím znamením při nedostatku draslíku jsou zasychající okraje spodních listů, může docházet i k jejich opadu (Jones et Olson-Rutz, 2016).



### 3.1.7 Hnojení

Hnojení se provádí na základě agrochemických rozborů půd. Po zjištění výživného stavu půdy můžeme přistoupit k dodání potřebného množství živin. Pro zlepšení podmínek růstu rostlin, kořenů a udržení optimálního pH v půdě a používá vápnění. Vápní se půdy s obsahem nižším než 0,3 % uhličitanů. Mezi tzv. univerzální hnojiva řadíme statková hnojiva. Ty uvolňují do půdy živiny pozvolně, jsou přírodní a velmi dobře zúrodňují půdu. Půdy díky tomu lépe přijímají vodu, zadržují živiny, jsou odolnější vůči výkyvům pH (Baranyk a kol., 2007).

### 3.1.8 Odrůdy

Kvůli intenzivnímu pěstování řepky je možné využívat hybridní odrůdy, nicméně liniové odrůdy jsou schopné dosahovat produkčně podobných výsledků (Horák, 2007). Sdružení šlechtitelských a výzkumných organizací „Česká řepka“ přináší na trh pravidelně nově vyvinuté odrůdy řepky, které jsou schopny naplnit požadavky jednotlivých pěstitelů a zároveň konkurovat nabídce zahraničních odrůd (Koprna a Macháčková, 2007). Pro rok 2007 je to například odrůda Jesper, která je v oblibě již několik let. Zejména díky vysoké toleranci k houbovým chorobám. Nejvýnosnější odrůdou se naopak stala odrůda Ontario. Výběr vhodné odrůdy

je stejně důležitý jako agrotechnika a správná výživa. Pokud použijeme odrůdu, která není vhodná k pěstování v našich podmínkách, bude to mít na konečném výnosu podobný vliv, jako při špatné předset'ové přípravě, nebo při nedodání potřebných živin (Bečka a Vašák, 2007).

Při pokusu pro účely této bakalářské práce byly použity odrůdy Hornet a Croquet. Odrůda Hornet je polopozdní hybrid oblíbená zejména díky vysokému výnosu semene a vysoké olejnatosti. Vyznačuje se vyšším počtem nasazování větví a rychlým pozdním vývojem. Je vhodná i do těžkých půd a snáší pozdější termín setí (Štěpánek, 2013).

Odrůda Croquet byla vyšlechtěná ve Francii. Vyznačuje se specifickou rezistencí vůči nádorovitosti a fómové hnilobě typu APR<sub>37</sub>. Lze ji tedy bezpečně pěstovat i na pozemcích postižených těmito chorobami. Je vhodná i do těžších půd a velice dobře přezimuje (Bouma, 2018).

## 3.2 Hospodářsky významné choroby řepky

Podle Ryšánka a kol. (2015) jsou nejvýznamnějšími chorobami řepky v dnešní době hlavně fómové černání stonku řepky (*Leptosphaeria maculans*), bílá hniloba (*Sclerotinia sclerotiorum*) řepky a nádorovitost kořenů brukvovitých. Baranyk a kol. (2007) uvádí, že verticiliové vadnutí (*Verticillium longisporum*) a čern na řepce (*Alternaria brassicae*) jsou další závažné choroby řepky.

### 3.2.1 Verticiliové vadnutí řepky (*Verticillium longisporum*)

*Verticillium longisporum* je půdou přenášený vaskulární patogen nacházející se především na řepce olejné v severní Evropě (Ralhan et al., 2013). Tento patogen způsobuje ztráty na výnosu u řepky olejné a to v Evropě, Asii a Japonsku (Heale et Karapapa, 1999). Ekonomický dopad při napadení Verticiliem může být velký, s odhadovanou roční ztrátou 3 miliardy EUR na celém světě (Siebold et Tiedemann, 2013).

*V. longisporum* produkuje dlouhé konidie (7,1-8,8 µm). Mikrosklerocia jsou protáhlá a nepravidelná (Bano et al., 2015). Jedním z příznaků napadení může být zakrnělý růst a chloróza listů, která se vyvíjí do nekrózy a je často charakterizována výskytem asymetričnosti na jednotlivých listech. Chřadnutí částí rostliny a předčasné dozrávání semen během konečných růstových fází hostitele je zjevným příznakem (Heale et Karapapa, 1999).

### 3.2.2 Bílá hniloba řepky (*Sclerotinia sclerotiorum*)

*Sclerotinia sclerotiorum* je patogenní půdní houba a je jednou z nejzávažnějších onemocnění postihujících řepku olejkou. Listy, stonky, květy a lusky jsou citlivé části, které mohou být infikovány (Baranyk a kol., 2007).

*S. sclerotiorum* se vyskytuje v relativně chladných a vlhkých oblastech světa, nyní se však rozšiřuje i do lokalit považovaných za horké a suché. Příznaky hniloby jsou vadnutí listů a stonků, nakažené listy žloutnou, hnědnou a odumírají. Léze na větvičkách jsou světle hnědé s výrazným vymezením mezi zdravou a napadenou tkání. Postupně tmavnou a může také dojít k rozkladu tkání v místě napadení. Znamky plísně mohou být ve formě bílého bavlněného

mycelia či černých sclerocií, které se nacházejí na povrchu tkáně nebo uvnitř měkkých hostitelských tkání či dutin (Purdy, 1979).

### **3.2.3 Padlí brukvovitých (*Erysiphe cruciferarum*)**

Houba *Erysiphe cruciferarum* je identifikovatelná jako přítomnost bílého, hnědého nebo šedého prášku na povrchu infikované rostliny. Postiženy jsou převážně listy a stonky. Později ve vegetačním období se objeví malé kulaté černé houby – plodnice. Tato plíseň se může vyskytovat ve formě izolovaných skvrn nebo může pokrývat celý povrch rostliny. Mladé listy se při napadení mohou zkroutit. Tato choroba se nejrychleji rozšiřuje na vlhkých tmavých místech se špatnou cirkulací vzduchu (Pfeufer et al., 2017).

### **3.2.4 Nádorovitost kořenů brukvovitých (*Plasmodiophora brassicae*)**

Patogen vytváří nádory na kořenech, ty se tvoří nadměrným zvětšením a zmnožením buněk. Dochází k omezení transportu vody a živin. Nádory se nejdříve vytvářejí na postranních kořenech. Mají šedožluté zbarvení a postupně tmavnou a dřevnatějí. Spory po rozkladu nádorů přežívají v půdě i 10 let. Při silném napadení rostlina vadne, zakrňuje a nevytváří šešule. Šíří se větrem, vodou, na zemědělských strojích a při manipulaci na poli (Ryšánek a kol., 2018).

## **3.3 Fómové černání stonků řepky (*L. maculans* (Desm.) Ces. & De Not.)**

Říše: Fungi

Oddělení: *Ascomycota*

Třída: *Dothideomycetes*

Řád: *Pleosporales*

Čeleď: *Leptosphaeriaceae*

Rod: *Leptosphaeria*

Druh: *Leptosphaeria maculans*

(Rouxel et Balesdent, 2005)

### 3.3.1 Charakteristika *L. maculans*

Fómová hniloba je jednou z hlavních a nejzávažnějších chorob řepky. Jde o významný patogen rostlin z čeledi *Brassicaceae*, především řepky (*Brassica napus* subsp. *napus*). Objevuje se na podzim již v prvním roce vegetace. Askospory hub *Leptosphaeria maculans* Ces. & De Not., Commentario della Società Crittogamologica Italiana 1 (4): 235 (1863) způsobují infekci řepky (Mycobank 1, 2019). Původcem je houba *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. & De Not., nepohlavní stádium *P. lingam* (Tode) Desm., Annales des Sciences Naturelles Botanique 11: 281 (1849) (Mycobank 2, 2019).

Velmi podobná je *Leptosphaeria biglobosa*. Ta je podstatně drobnější a na rozdíl od *L. maculans* vyrůstá zpod epidermis. Rozdílné jsou i velikosti výtrusů (větší u *L. maculans*). K primární infekci dochází askosporami rostoucích ze strniště z předchozího roku, přičemž infekce může působit až po dobu 5 let (Toscano-Underwood et al., 2003). Askospory pak podle Kaczmarek et Jędryczka (2011) mohou přežít i více než měsíc a přemístit se na vzdálenost až pět kilometrů. Ve většině případů se však askospory dostanou do vzdálenosti cca 50 metrů.

K prvním projevům nákazy dochází již v dubnu, v dalších měsících může způsobit i odumření celých rostlin a dochází tak ke škodám a velkým ztrátám na výnosech (Harrison et al., 2005).

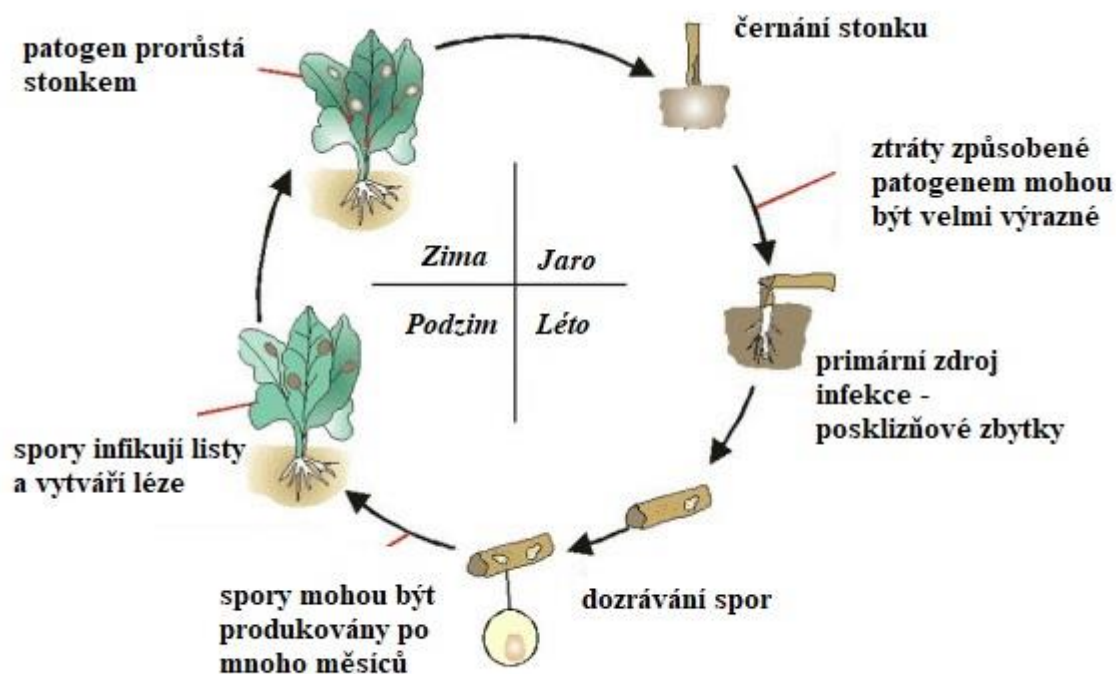
### 3.3.2 Historie *P. lingam*

První zmínku o výskytu *P. lingam* na řepce podává zprávu Cunningham (1927) z Nového Zélandu a Neill et Brien (1933). Zmiňují se o případě, kdy řepka setá po tuřinu byla tímto patogenem těžce poškozena. Od čtyřicátých let minulého století bylo v Československé republice chemické ošetřování sporadické a využití přípravků na ochranu rostlin bylo vynahrazeno častým používáním agrotechnických opatření. V průběhu let se stále zvyšoval podíl mechanizace ve zpracování půdy. K podstatné změně v agrotechnice došlo v padesátých a začátkem šedesátých let minulého století a zavedla se větší výměra polí. V těchto letech se též rapidně zvýšilo používání postřiků a hnojiv, avšak v této době se ještě fómová hniloba v Evropě nevyskytovala. V 70. a 80. letech byly výměry honů dále zvětšovány a stále narůstalo užívání hnojiv (převážně chlévská mrva). Tím dochází i k některým zjednodušením agrotechnických postupů pro úsporu nákladů. Teprve až v roce 1981 se u nás vyskytuje ojediněle fómové černání stonků (poprvé popsáno v odborné literatuře). Větší výskyt této

choroby byl zaznamenán až v roce 1993 na více než 15 % plodin. V tento rok se však choroba nerozšířila do stadia dozrávání. Choroba ve fázi dozrávání se vyskytla až v roce 1998 a o rok později bylo napadení hnilobou na bázích a stoncích 40 % (Málek a kol., 2011).

Z výsledků výzkumů provedených v letech 2000 až 2010 vyplývá, že patogen *L. maculans* se během pár let stal velmi významným. V roce 2001 byl výskyt hniloby až na 40 % ploch neošetřených fungicidem. Během tohoto desetiletí se fóma vyskytovala až na 80 % stonků, především v roce 2002 došlo k velké epidemii, což pravděpodobně způsobila větší změna teplot, pokles dusíku v půdě a dlouhodobé přemokření. Na mnoha místech republiky došlo k časné infekci, která se rozšířila do krčků a kořenů. V letech 2003 až 2007 nebylo napadení tak výrazné jako v roce 2002. Procento napadení se pohybovalo cca od 5 – 20 %. Infikované byly převážně listy, nedošlo k rozšíření do stonků a kořene. Až v roce 2008 došlo k významnému nárůstu houbových chorob. V tomto roce se navýšilo preventivní užití fungicidů s dobrými výsledky na výnosech. V roce 2009 a 2010 nebyl výskyt hniloby tak vysoký, přesto se ošetření postřikem vyplatilo (Málek a kol., 2011).

### 3.3.3 Vývojový cyklus *L. maculans*



Obrázek 1 – Životní cyklus *L. maculans* na ozimé řepce; převzato z <http://resources.rothamsted.ac.uk/phoma-leaf-spot-forecast/phoma-stem-canker-epidemiology>

Původce přežívá na strništích řepky, kde produkuje pseudoperithecia neboli pohlavní plodnice. Z nich se uvolňují askospory schopné cestovat větrem i několik kilometrů. Při styku s rostlinou řepky vzniká nekrotrofni fáze a tvoří se léze. Askospora začne klíčit a tvoří se klíční vlákno, které prorůstá epidermis (Ryšánek a kol., 2018). Infekční hyfa proniká přes stomata nebo přes poraněnou tkáň rostliny (Rouxel et Balesdent, 2005). K napadení dochází obvykle na podzim. V napadené rostlině se utváří pyknidy. Mycelium hub prorůstá do tkáně rostliny a nastává fáze biotrofni. Dochází k netrotizaci pletiv. Při silném rozvinutí choroby dochází k předčasnému dozrávání a poléhání rostlin v důsledku lámání stonků. Rozšíření infekce napomáhá také hmyz (př. krytonosci) nebo mechanické poškození (Ryšánek a kol., 2018). U nás jsou ztráty na výnosu uváděny do 20 %, kdežto v zahraničí jsou až 50 % (Kužma a kol., 1996).

Patogen může napadat různé plodiny. A to řepku, květák, kukuřici, kapustu, hořčici. Může také napadnout i některé příbuzné plevele jako je penízek nebo kokoška (Dominiak-Olson et al., 2017).

### 3.3.4 Výzkum vlivu počasí na výskyt choroby

Data pro experimenty byla zjišťována v letech 2008 až 2011 v Kroměříži a dále shromažďována v meteorologickém ústavu. Jedná se o oblast teplou a mírně vlhkou s průměrnou teplotou 8,7 stupně Celsia a s ročními srážkami 599 mm. Umístěn byl též lapač spor (vzdálený cca 1 km od infikovaného pole, na kterém proběhly polní pokusy) pro určení nákazou *L. maculans*. Výzkum teplot a srážek byl prováděn v září a říjnu a porovnán s dlouhodobými normály (Spitzer a Bílovský, 2014).

Výsledky daného výzkumu ukázaly, že v říjnu ve sledovaném období byly srážky a teploty v úrovni normálu nebo podnormálu. V říjnu v roce 2011 byl nálet spor velmi nízký, kdežto na podzim v letech 2008 a 2010 kdy byly srážky nadnormální a teploty v normálu, se vyskytla cca 5 % infikace chorobou na listech plodin. Zatímco ve sledovaném období v letech 2009 a 2011, kde množství srážek bylo v podnormální úrovni a teploty v normálu, bylo napadení velmi nízké či žádné. V roce 2011 lapač zachytil malé množství spor *L. maculans*, přitom napadení na poli nebylo zaznamenáno. V roce 2008 lapač nezachytil žádné spory. Z tohoto výsledku se lapač jeví nespolehlivě, pravděpodobně z důvodu nedostatečné vlhkosti v oblasti, jelikož nálet spor byl velmi malý. K vyšší úrovni napadení nedošlo z důvodu sucha.

Bez dostatečné vlhkosti se nemohlo napadení rozšířit a postihnout stonky a kořenové krčky (Spitzer a Bílovský, 2014).

Závěrem výzkumu bylo prokázáno, že pro rozvoj choroby v říjnu je vhodný vyšší srážkový úhrn a teplota v normě a v září též nadnormální úhrn srážek a nadnormální teplotní úroveň. Jsou-li tyto podmínky splněny, míra epidemie stoupne a s tím i produkce a šíření askospor, která naruší pletivo rostliny a dojde k tvorbě mycelia (Spitzer a Bílovský, 2014).

### 3.3.5 Ochrana proti patogenu *L. maculans*

Houba se objevuje na krčku, listech, stonku a jeho bázi. Šíří se i do semen, čímž dochází k jejich infikování. Příznaky napadení semen jsou špatně zjistitelné. Plodinu je možno ochránit dvěma způsoby, a to přímo či nepřímo (Prokinová, 2003).

Nepřímá ochrana spočívá ve správném výběru osiva a správnou úpravou půdy. Zpracování infikovaného strniště, jako je zaorání a spalování může snížit infekci až o 50 %. Není však známo, kolik strniště je nutné zničit, aby bylo dosaženo ke snížení závažnosti fómové hniloby a bylo dosaženo ekonomického prospěchu (McCaffery et al., 2009). Je nutné odstranit posklizňové zbytky a to nejlépe hlubokou orbou a zasít uznané, zdravé osivo, příp. mořené. Je vhodný delší osevnický cyklus a to alespoň 3 až 4 roky, aby posklizňové stonky měli dostatek času se rozložit (Málek a kol., 2011). Doporučena je také likvidace rostlin z výdrolu, které fungují jako hostitel patogenů mimo hlavní vegetační období a mohou být zdrojem infekce i pro okolní pole. Důležité je také udržovat pole nezaplevelené, neboť plevel způsobuje vyšší vlhkost vzduchu a výskyt houbových chorob a hnilob (Prokinová, 2003).

V průběhu 3-4 let je vhodné zasít obiloviny, trávy, vojtěšku, jetel a luštěniny. Pokud je to možné tak v okolních polích je dobré se vyvarovat výsevu řepky. Ošetření se provádí již na podzim či časně na jaře při výskytu choroby (Harrison et al., 2005).

K přímé ochraně plodiny dochází za použití fungicidů. Dají se použít postřiky s aktivní složkou fluquinconazol nebo hnojivo s účinnou látkou flutriafol, které snižují závažnost hniloby řepky. Nicméně, fungicidy ne vždy poskytnou ekonomickou návratnost plodiny, záleží, jak silná je hniloba, zda dochází k vysokým srážkám a teplotám a zda se pole nachází ve větrné oblasti (McCaffery et al., 2009). V období kdy jsou teploty nadprůměrné a dochází k většímu množství srážek, je přínos použití postřiku až 20% (Málek a kol., 2011).

## 3.4 Biologická ochrana

Biologická kontrola chorob rostlin byla považována za alternativní metodu řízení onemocnění rostlin (Cook, 1993). Dnes se již využívá i konvenčně. Biologická ochrana je inhibice růstu, infekce nebo reprodukce jednoho organismu za použití jiného organismu (Baker, 1987; Cook, 1993). Je šetrná k životnímu prostředí a v některých případech je jedinou možností ochrany rostlin proti patogenům. Využívá přirozené nepřátele patogenů k vymýcení nebo kontrole jejich populace (Cook, 1993).

Přípravky využití v předložené bakalářské práci a jejich charakteristika:

### 3.4.1 Serenade

Biopreparát Serenade je fungicid určený k ochraně rostlin proti plísním. Působí proti bakteriálním a houbovým patogenům způsobem, kdy pokryje povrch rostliny a odebírá těmto patogenům živiny. Obsahuje účinnou látku *Bacillus subtilis* QST 713 13,96 g/l. Preparát produkuje lipoproteiny, které poškozují buněčné stěny hub i bakterií. U rostlin Serenade zlepšuje stav kořenů i celé rostliny. Pokud se vyskytuje v rostlinných pletivech, způsobuje rezistenci rostlin k dalším patogenům. Bioagens je možno použít proti plísni révy (peronospora), padlí, strupovitosti jaderovin, bakteriální spále jabloňovitých, plísní bramborové, monilióze a alternariové skvrnitosti (Bioagens, 2019).

### 3.4.2 Hirundo

Přípravek Hirundo obsahuje živé buňky bakterií rodu *Bacillus*. Potlačuje patogeny v půdě a stimuluje růst rostliny. Bakterie je přizpůsobena výkyvům teplot, je odolná vůči pesticidům. Kolonie bakterií přerůstají kořen v celém jeho povrchu a produkcí fytoalexinů je chrání před houbovými chorobami. Ochranná bariéra okolo kořene chrání před infekcí bílé hniloby, fómové hniloby či verticiliovému vadnutí řepky. Dále napomáhá v uvolňování živin z půdy (Monas 1, 2019).



### 3.4.3 Prometheus

Přípravek Prometheus obsahuje živé buňky bakterií rodu *Pseudomonas*. Účinek bioagens je založen na symbióze mezi bakteriemi a kořeny rostliny. Chrání kořeny rostliny před houbovými chorobami a bakterie jsou dokonce schopny svými metabolickými procesy ovlivňovat pH půdy. Přípravek Prometheus se využívá jako preventivní opatření proti výskytu *Sclerotinia sclerotiorum*. Mimo jiné pomáhá uvolňovat živiny z půdy a napomáhá rozkladu reziduí pesticidů (Monas 2, 2019).

## 4 Metodika

### 4.1 Skleníkový pokus

Pokus byl založen 14. 11. 2018 ve výukových sklenících České zemědělské univerzity a po 6 týdnech (12. 12. 2018) byl vyhodnocen.

#### 4.1.1 Materiál

Byla připravena suspenze spor patogenu *P. lingam* setřením mycelia z petriho misky. Izolát *P. lingam* pocházel ze sbírky Katedry ochrany rostlin ČZU.

V pokusu byly použity odrůdy řepky ozimé Croquet a Hornet, tedy rezistentní odrůda vůči *P. lingam* a odrůda bez deklarované rezistence.

Byly použity biologické preparáty Serenade (*Bacillus subtilis*), Hirundo (*Bacillus* sp.), Prometheus (*Pseudomonas* sp.) a Agra (měďnatý přípravek v testování).

#### 4.1.2 Metody inokulace

Rostliny byly inokulovány patogenem *P. lingam* po týdnu od zasetí dvěma metodami:

Při metodě A:

Spory byly setřeny z Petriho misky do destilované vody a následně naředěny na koncentraci  $3 \times 10^8$  spor v 1 ml suspenze, která byla štětečkem nanесena na děložní list (Mithen et Lewis, 1988).

Při metodě B:

Byl slabě naříznut děložní list a poté byl na porušené místo aplikován výřez mycelia patogenu *Phoma lingam* (výřezy byly připraveny ve sterilních podmínkách).

#### 4.1.3 Aplikace biologických preparátů

Polovina inokulovaných rostlin byla ihned ošetřena biologickými přípravky a druhá polovina o týden později. Přípravky (Serenade, Hirundo, Prometheus, Agra) byly aplikovány formou postřiku v doporučené dávce dle obalu přípravku.

Pokus proběhl v pěti opakováních na 18 variantách po 5 rostlinách.

	A		B	
	hned	po týdnu	hned	po týdnu
<b>Hirundo</b>	5	5	5	5
<b>Prometheus</b>	5	5	5	5
<b>Serenade</b>	5	5	5	5
<b>AGRA</b>	5	5	5	5
<b>Kontrola inokulovaná <i>P. lingam</i></b>	5		5	
<b>Kontrola bez inokulace</b>	5			
	počet opakování			

Tabulka 1: Design skleníkového pokusu - počet variant a opakování

#### 4.1.4 Způsob hodnocení

Následně se vždy po týdnu kontroloval stav rostlin. Byl hodnocen výskyt a rozvoj patogenu *L. maculans*. V průběhu šesti týdnů byl porost hodnocen pomocí 10 bodové stupnice, která sledovala zdravotní stav rostlin a v šestém týdnu během finálního hodnocení byl zvážen objem biomasy jednotlivých variant a opakování.

Stupnice pro hodnocení zdravotního stavu rostlin modifikováno dle Zeise (1992):

<b>0</b>	<b>bez příznaků</b>
<b>1</b>	<b>léze na inokulovaném listu (děložním)</b>
<b>2</b>	<b>odumřelý inokulovaný list (děložní)</b>
<b>3</b>	<b>odumřelý inokulovaný list a léze na druhém děložním listu</b>
<b>4</b>	<b>odumřelé oba děložní listy</b>
<b>5</b>	<b>odumřelé oba děložní listy a příznaky na 1-2 nejstarších listech</b>
<b>6</b>	<b>odumřelé oba děložní listy a 1 - 2 nejstarší listy</b>
<b>7</b>	<b>odumřelé oba děložní listy a 1 - 2 starší listy, příznaky na 3 - 4 nejstarších listech</b>
<b>8</b>	<b>odumřelé oba děložní listy a 3 - 4 nejstarší listy</b>
<b>9</b>	<b>více jak 4 nejstarší listy jsou odumřelé</b>

Tabulka 2: Stupnice pro hodnocení zdravotního stavu rostlin

Skleníkové pokusy byly hodnoceny pomocí programu MS Excel a STATISTICA. Nebyla zaznamenána statisticky významná rozdílnost mezi variantami, všechny výsledky byly zpracovány v programu MS Excel.

## 4.2 Laboratorní diagnostika

Ze skleníkového pokusu bylo vybráno 12 rostlin, které byly následně hodnoceny pomocí metody PCR na přítomnost DNA patogenu *L. maculans* u jednotlivých variant pokusu.

1	odrůda Croquet, infikováno metodou A, ošetřeno ihned preparátem Hirundo
2	odrůda Croquet, infikováno metodou A, ošetřeno ihned preparátem Serenade
3	odrůda Croquet, infikováno metodou A, ošetřeno ihned preparátem AGRA
4	odrůda Croquet, infikováno metodou A, ošetřeno ihned preparátem Prometheus
5	odrůda Croquet, infikováno metodou A, kontrola infikovaná patogenem <i>P. lingam</i>
6	odrůda Croquet, neinfikovaná kontrola
7	odrůda Hornet, infikováno metodou A, ošetřeno ihned preparátem Prometheus
8	odrůda Hornet, infikováno metodou A, ošetřeno ihned preparátem Hirundo
9	odrůda Hornet, infikováno metodou A, ošetřeno ihned preparátem Serenade
10	odrůda Hornet, infikováno metodou A, ošetřeno ihned preparátem AGRA
11	odrůda Hornet, infikováno metodou A, kontrola infikovaná patogenem <i>P. lingam</i>
12	odrůda Hornet, neinfikovaná kontrola

Tabulka 3: Vybrané rostliny pro metodu PCR (Polymerázová řetězová reakce)

Všechny rostliny vybrané pro laboratorní diagnostiku musely být povrchově sterilizovány. Rostliny byly nejdříve na 2 minuty ponořeny do 70 % E-OH, následně 10 minut 20 % SAVO a pak dvakrát důkladně promyty destilovanou vodou tak, aby na rostlinách nezůstaly stopy ethanolu a SAVA.

#### 4.2.1 Izolace celkové DNA pomocí CTAB

1. Biologický materiál byl rozdrcen ve třecí misce pomocí tekutého dusíku na drobný prášek, který byl převeden pomocí sterilní špachtle do mikrozkuhavky (navážka 100 mg).
2. Ve vzorku byly přidány tři drtící koule (o průměru 3 mm) a 100  $\mu$ l CTAB pufru (těsně před použitím byl do pufru přidán 2- merkaptoetanol v poměru 1 ml/1,56  $\mu$ l).
3. Vzorek byl homogenizován pomocí oscilačního mlýna po dobu 1,5 min. rychlostí 30 kmitů za sekundu. Poté bylo do mikrozkuhavky přidáno 400  $\mu$ l CTAB pufru a vzorek byl po dobu 2 min. třepán stejnou rychlostí.
4. Poté bylo do mikrozkuhavky přidáno 400  $\mu$ l CTAB pufru a vzorek byl inkubován 1 h. při 64 °C.
5. Ke vzorku bylo přidáno 900  $\mu$ l směsi fenol DNA (pH 8)-chloroform-izoamylalkoholu (24:1) v poměru 1:1. Vzorek byl třepán (2200 RPM, 10 min.) a následně centrifugován (7000 x g, 10 min.).
6. Poté byla do nové mikrozkuhavky převedena vodní fáze a tento krok byl jednou zopakován [přidáno stejné množství směsi fenol (pH 8): chloroform-izoamylalkoholu (24:1) v poměru 1:1, třepání, centrifugace].
7. Vodní fáze byla převedena do nové mikrozkuhavky a ke směsi bylo přidáno stejné objemové množství chloroform-izoamylalkoholu (24:1). Vzorek byl třepán (2200 RPM, 10 min.), poté centrifugován (7000 x g, 10 min.).
8. Vodní fáze byla převedena do nové mikrozkuhavky, do které bylo přidáno stejné množství ledového izopropylalkoholu. Směs byla promíchána (několikrát převrácena v ruce) a ponechána přes noc v mrazicím boxu (-24 °C), popřípadě pro urychlení postupu byl vzorek ponechán 3 x 3 min. v tekutém dusíku.
9. Poté byl vzorek centrifugován (10 000 x g, 10 min.) a vodní fáze byla odstraněna. Peleta byla promyta v 70 % chlazeném etanolu a centrifugována (10 000 x g, 10 min.).
10. Po odstranění vodní fáze byla mikrozkuhavka ponechána při laboratorní teplotě inkubovat 10 min. Peleta byla rozpuštěna v 50  $\mu$ l TE pufru a vzorek byl uskladněn v mrazicím boxu (-28 °C).

## 4.2.2 PCR (Polymerase Chain Reaction – Polymerázová řetězová reakce)

### Mahuku et al., 1996

Primers – HV17S: HV26C Primer dilution – 1: 1: 2 ddH<sub>2</sub>O (25 μM: 25 μM: 50 μM ddH<sub>2</sub>O)

Primers – WV17S: HV58C Primer dilution – 1: 1: 2 ddH<sub>2</sub>O (25 μM: 25 μM: 50 μM ddH<sub>2</sub>O)

Reakční směs (25 μM):

ddH <sub>2</sub> O.....	18,15/17,775 μl
buffer for Taq polymerase (10 ×) (Thermo Scientific).....	2,5 μl (1 ×)
MgCl <sub>2</sub> (25 mM) (Thermo Scientific).....	2,5 μl (2,5 mM)
dNTP (25 mM/10 mM) (Thermo Scientific).....	0,25/0,625 μl (0,25 mM)
primer mix (Sigma-Andrich).....	0,4 μl (0,4 μM each)
Taq polymerase (5U/ μl) (Thermo Scientific).....	0,2 μl (1 U)
template DNA.....	1 μl (cca 100 ng)

Thermal cycling parameters for LMB-HW:

initial denaturation	95 °C, 2 min
35 cycles	denaturation 94 °C, 1 min
	annealing 55 °C, 30 s
	extension 72 °C, 1 min
final extension	72 °C, 4 min

## 4.2.3 Agarózová elektroforéza

Byl připraven roztok z 1,5 % agarózy v TBE 1 x pufu. Roztok byl převeden do Erlenmayerovy baňky, promíchán a v mikrovlnné troubě rozvařen. Poté zchlazen na 60 °C. Do směsi bylo přidáno ½ objemu zásobního roztoku etidumbromidu v μl (do 100 ml objemu gelu bylo přidáno 50 μl zásobního roztoku etidumbromidu). Vše bylo promícháno a poté byl obsah baňky nalit do vaničky na odlití gelu. Zasunutím hřebíků do tekuté agarózy bylo umožněno vytvoření jamek pro nanášení jednotlivých vzorků. Gel polymerizoval při laboratorní teplotě zhruba 15 - 25 min. Po ztuhnutí gelu byly hřebíčky opatrně vyjmuty z gelu a vanička byla přenesena do elektroforetické horizontální cely s TBE 1 x pufrem. Do jednotlivých jamek byla napipetována směs 10 μl DNA (produkt PCR) + 2 μl barviva (6 x loading dye solution,

Fermentas). PCR produkt byl ponechán v elektroforéze cca 1 hodinu při konstantním stejnosměrném napětí 90 V.

## 5 Výsledky

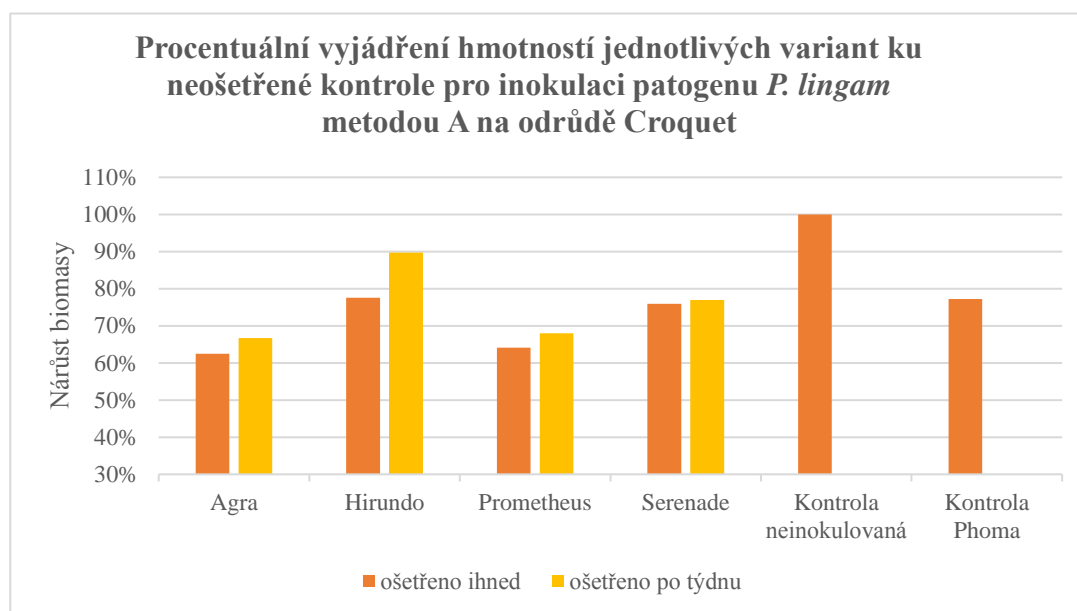
### 5.1 Skleníkové pokusy

#### 5.1.1 Hodnocení hmotnosti biomasy jednotlivých variant

Všechny rostliny byly zprůměrovány.

##### 5.1.1.1 Hodnocení hmotnosti pro odrůdu Croquet

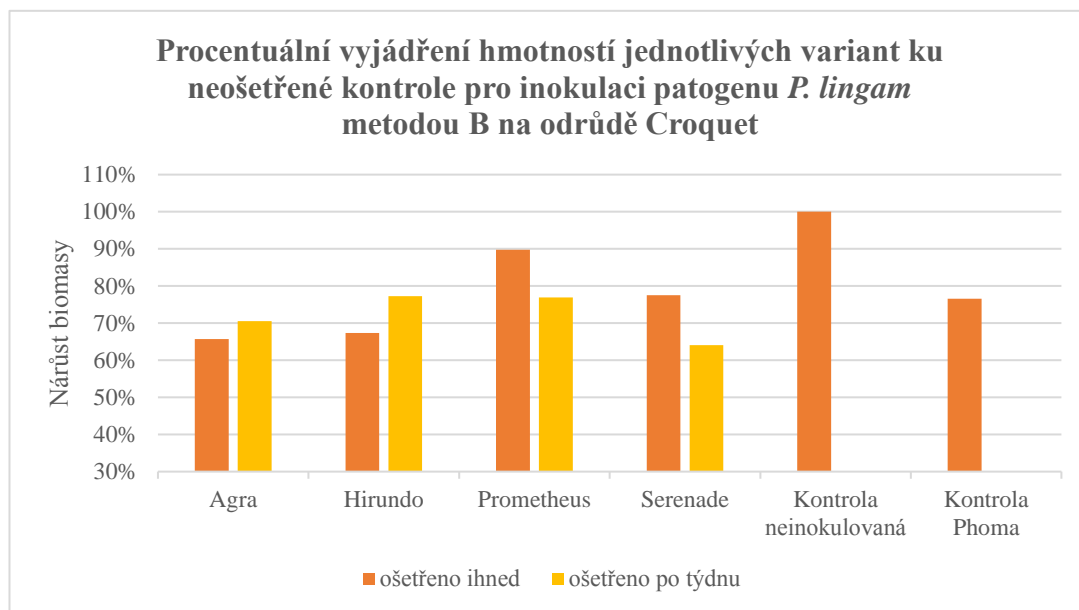
Pro graf č. 1 i pro graf č. 2 je hodnota kontroly (100 %) 3,12 g.



*Graf 1: Procentuální vyjádření hmotností jednotlivých variant ku neošetřené kontrole pro inokulaci patogenu *P. lingam* metodou A na odrůdě Croquet*

Neinokulovaná kontrola patogenem *P. lingam* zaznamenala největší nárůst biomasy. Varianta inokulovaná patogenem *P. lingam* bez ošetření vykázala větší nárůst biomasy než varianty ošetřené přípravkem Agra a Prometheus a stejný nárůst biomasy jako varianta ošetřená přípravkem Serenade. Varianta ošetřená přípravkem Hirundo, dosáhla při inokulaci metodou A a okamžitém ošetření nejlepšího výsledku v nárůstu biomasy. Z výsledků vyplývá, že termín aplikace přípravku ihned a týden po inokulaci nemá výrazný vliv na nárůst biomasy.





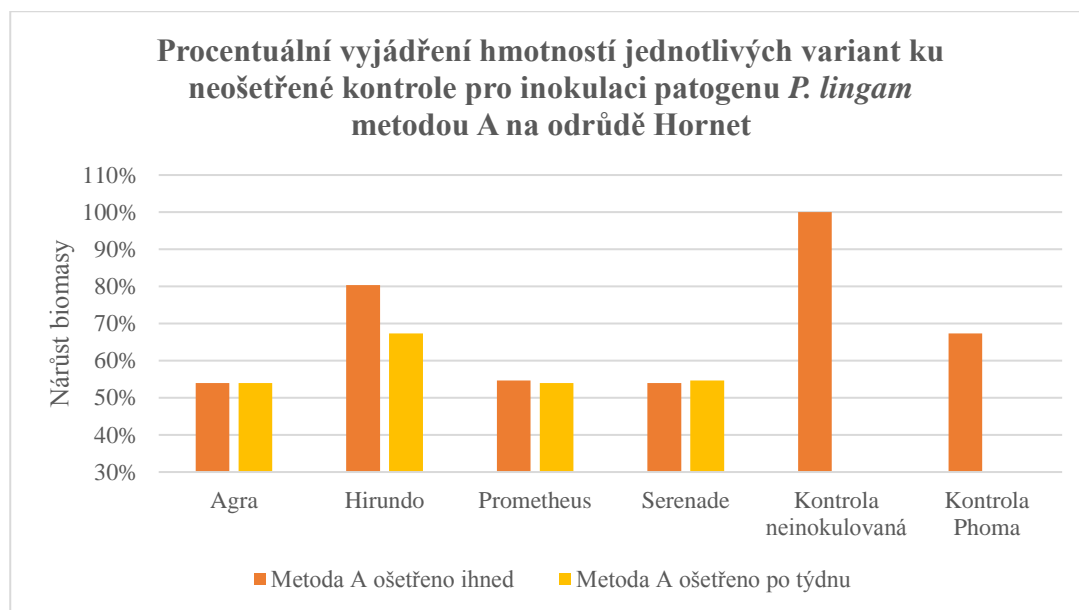
*Graf 2: Procentuální vyjádření hmotností jednotlivých variant ku neošetřené kontrole pro inokulaci patogenu *P. lingam* metodou B na odrůdě Croquet*

Neinokulovaná kontrola patogenem *P. lingam* zaznamenala největší nárůst biomasy. Varianta inokulovaná patogenem *P. lingam* bez ošetření vykázala menší nárůst biomasy než varianta ošetřená přípravkem Prometheus a stejný nárůst biomasy jako varianta ošetřená přípravkem Serenade. Varianty ošetřené přípravkem Hirundo a Agra dosáhly při ošetření hned a po týdnu stejného výsledku v nárůstu biomasy. Z výsledků vyplývá, že termín aplikace přípravku ihned a týden po inokulaci nemá výrazný vliv na nárůst biomasy.

Nárůst biomasy není výrazně ovlivněn způsobem inokulace patogenu na rostlinu. Rostliny ošetřené přípravkem Hirundo při inokulaci metodou B měly menší nárůst biomasy než při inokulaci metodou A, zatímco přípravek Prometheus měl opačný trend. Agra a Serenade nevykázaly významné rozdíly.

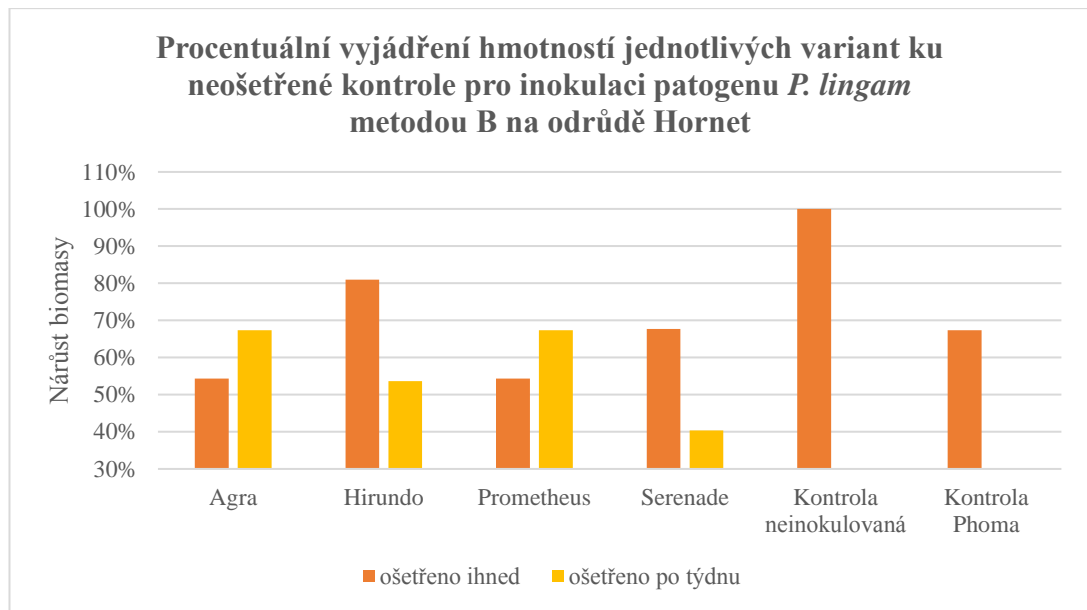
### 5.1.1.2 Hodnocení hmotnosti pro odrůdu Hornet

Pro graf č. 3 i pro graf č. 4 je hodnota kontroly (100 %) 3 g.



*Graf 3: Procentuální vyjádření hmotností jednotlivých variant ku neošetřené kontrole pro inokulaci patogenu *P. lingam* metodou A na odrůdě Hornet*

Neinokulovaná kontrola patogenem *P. lingam* zaznamenala největší nárůst biomasy. Varianta inokulovaná patogenem *P. lingam* bez ošetření vykázala menší nárůst biomasy než varianta ošetřená přípravkem Hirundo a větší nárůst biomasy než u variant Agra, Prometheus, Serenade. Varianta ošetřená přípravkem Hirundo, dosáhla při inokulaci metodou A a okamžitým ošetření nejlepšího výsledku v nárůstu biomasy. Z výsledků vyplývá, že termín aplikace přípravku ihned a týden po inokulaci nemá výrazný vliv na nárůst biomasy.



*Graf 4: Procentuální vyjádření hmotností jednotlivých variant ku neošetřené kontrole pro inokulaci patogenu *P. lingam* metodou B na odrůdě Hornet*

Neinokulovaná kontrola patogenem *P. lingam* zaznamenala největší nárůst biomasy. Varianta inokulovaná patogenem *P. lingam* bez ošetření vykázala menší nárůst biomasy než varianta ošetřená přípravkem Hirundo a stejný nárůst biomasy jako varianta ošetřená přípravkem Serenade. Varianta ošetřená přípravkem Hirundo, dosáhla při inokulaci metodou B a okamžitém ošetření nejlepšího výsledku v nárůstu biomasy.

Nárůst biomasy není výrazně ovlivněn způsobem inokulace patogenu na rostlinu. Rostliny ošetřené přípravkem Hirundo při inokulaci metodou B měly menší nárůst biomasy než při inokulaci metodou A při ošetření po týdnu, zatímco přípravek Prometheus měl opačný trend. Agra a Serenade nevykázaly významné rozdíly.

V pokusu byly využity odrůdy Hornet a Croquet. Odrůda Croquet vykázala vyšší nárůst biomasy při inokulaci oběma metodami. Odrůda s deklarovanou odolností vůči *P. lingam* Croquet vykázala vyšší nárůst biomasy než odrůda bez deklarované odolnosti Hornet.

## 5.1.2 Hodnocení zdravotního stavu porostu jednotlivých variant

Po dobu šesti týdnů (5 měření pro aplikaci biopřípravku ihned po inokulaci, 4 měření pro aplikaci biopřípravku týden po inokulaci) byl hodnocen zdravotní stav rostlin dvěma metodami.

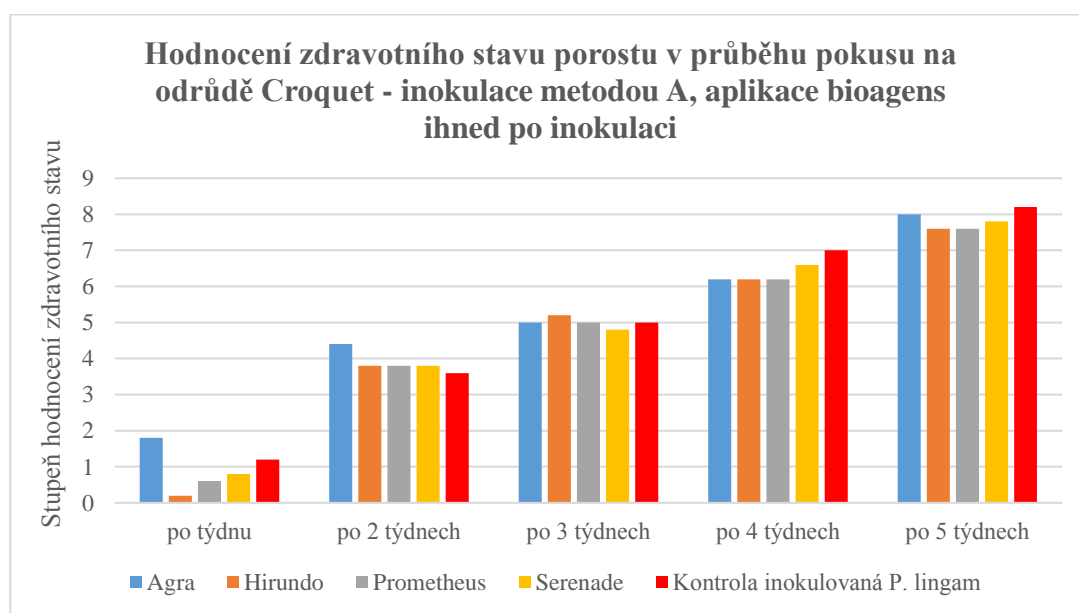
Metoda A:

Setření spor z Petriho misky do destilované vody a naředění na koncentraci  $3 \times 10^8$  spor v 1 ml suspenze, která byla štětečkem nanesena na děložní list (Mithen et Lewis, 1988).

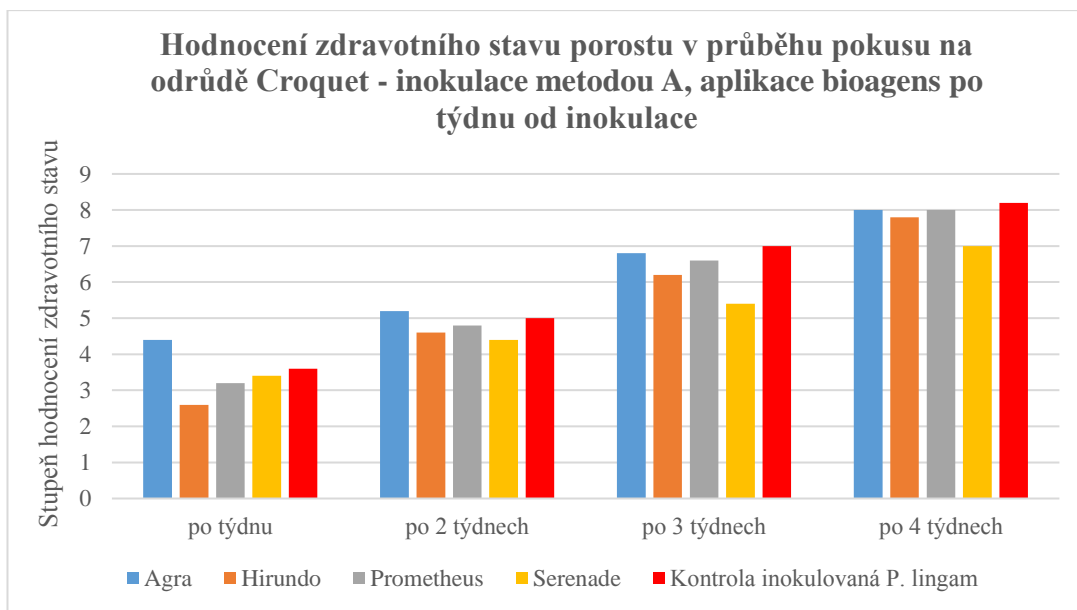
Metoda B:

Naříznutí děložního listu a aplikování výřezu mycelia patogenu *Phoma lingam* na porušené místo.

### 5.1.2.1 Hodnocení zdravotního stavu pro odrůdu Croquet

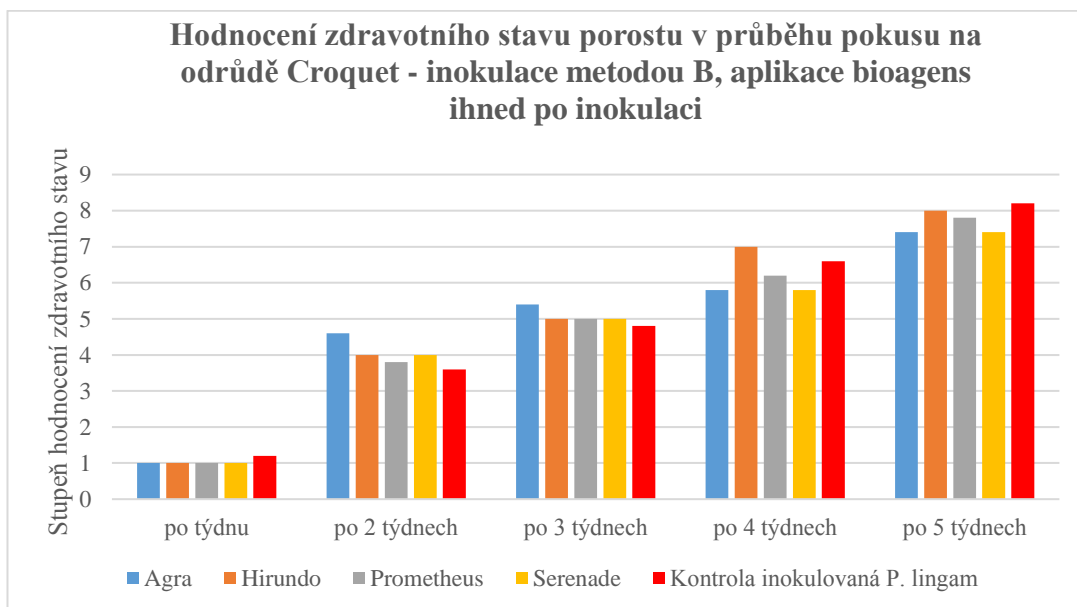


Graf 5: Hodnocení zdravotního stavu porostu v průběhu pokusu na odrůdě Croquet – inokulace metodou A, aplikace bioagens ihned po inokulaci.

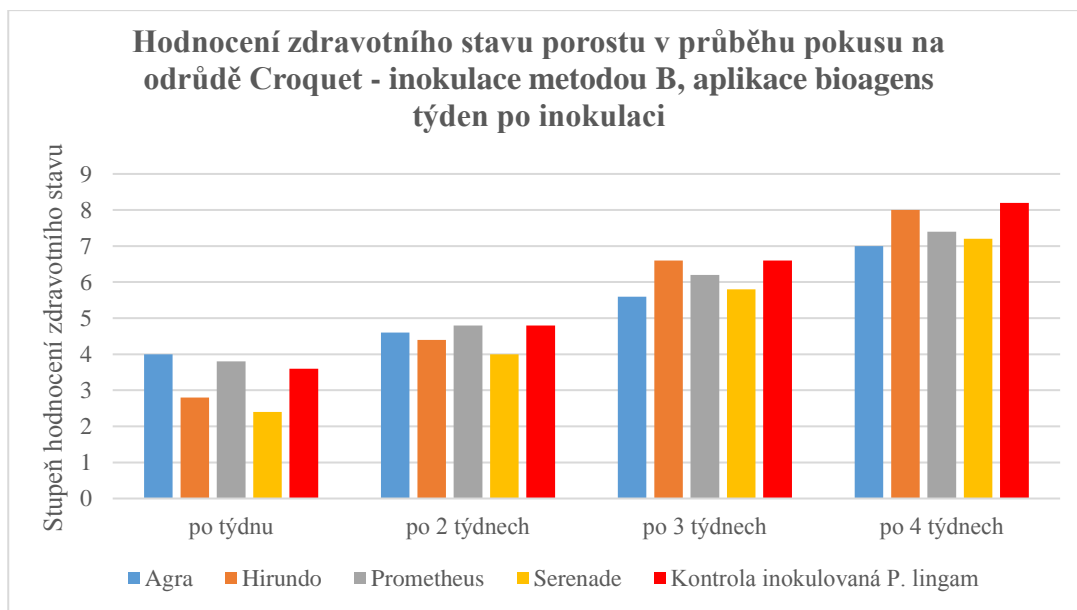


*Graf 6: Hodnocení zdravotního stavu porostu v průběhu pokusu na odrůdě Croquet – inokulace metodou A, aplikace bioagens po týdnu od inokulace.*

V grafu č. 5 a 6 byl hodnocen zdravotní stav porostu při inokulaci patogenu metodou A. Týdenní rozestup v aplikaci nemá výrazný vliv na zdravotní stav porostu. Nejlepší výsledek vykazují přípravky Serenade a Hirundo, ale rozdíl není statisticky průkazný.



*Graf 7: Hodnocení zdravotního stavu porostu v průběhu pokusu na odrůdě Croquet – inokulace metodou B, aplikace bioagens ihned po inokulaci.*

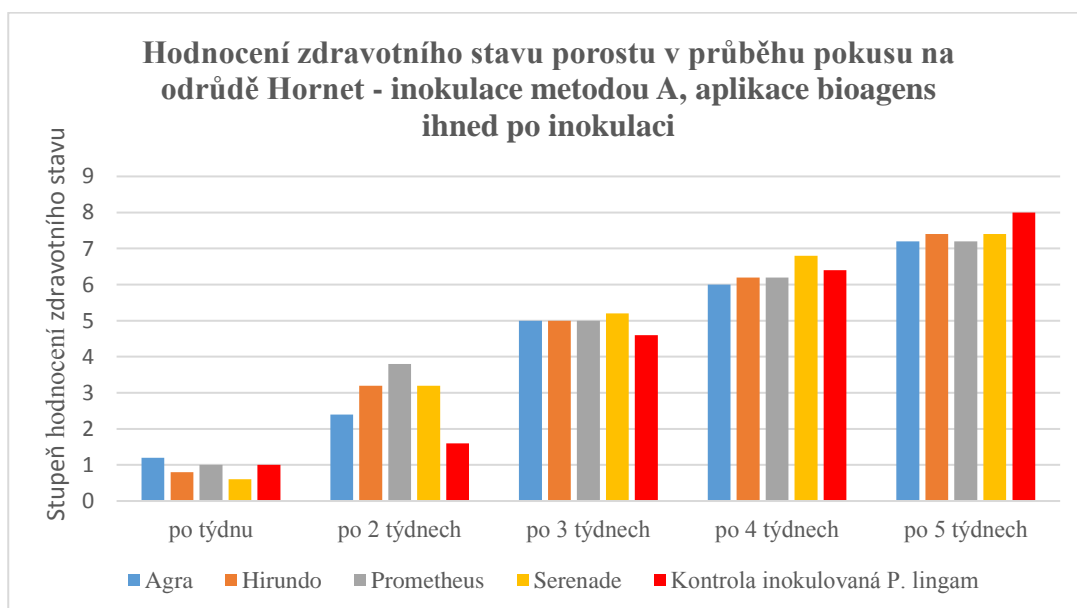


*Graf 8: Hodnocení zdravotního stavu porostu v průběhu pokusu na odrůdě Croquet – inokulace metodou B, aplikace bioagens týden po inokulaci.*

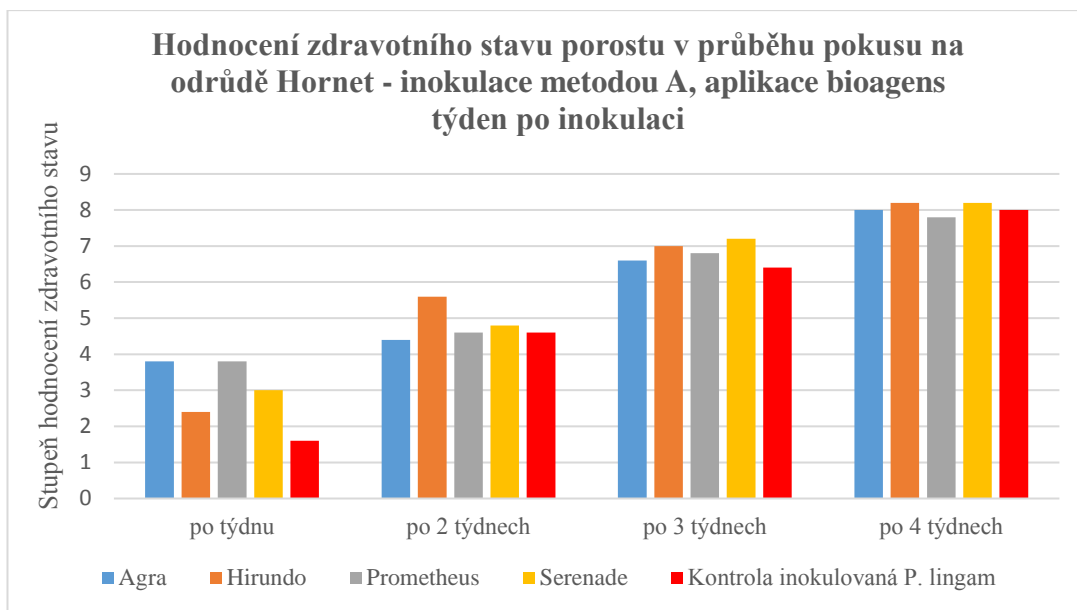
V grafu č. 7 a 8 byl hodnocen zdravotní stav porostu při inokulaci patogenu metodou B. Týdenní rozestup v aplikaci nemá výrazný vliv na zdravotní stav porostu. Nejlepší výsledek vykazuje přípravek Serenade, ale rozdíl není statisticky průkazný.

Dvě metody inokulace patogenu *P. lingam* na rostliny řepky ozimé nevykázaly mezi sebou významné rozdíly pro zdravotní stav rostlin na odrůdě Croquet.

#### 5.1.2.2 Hodnocení zdravotního stavu pro odrůdu Hornet

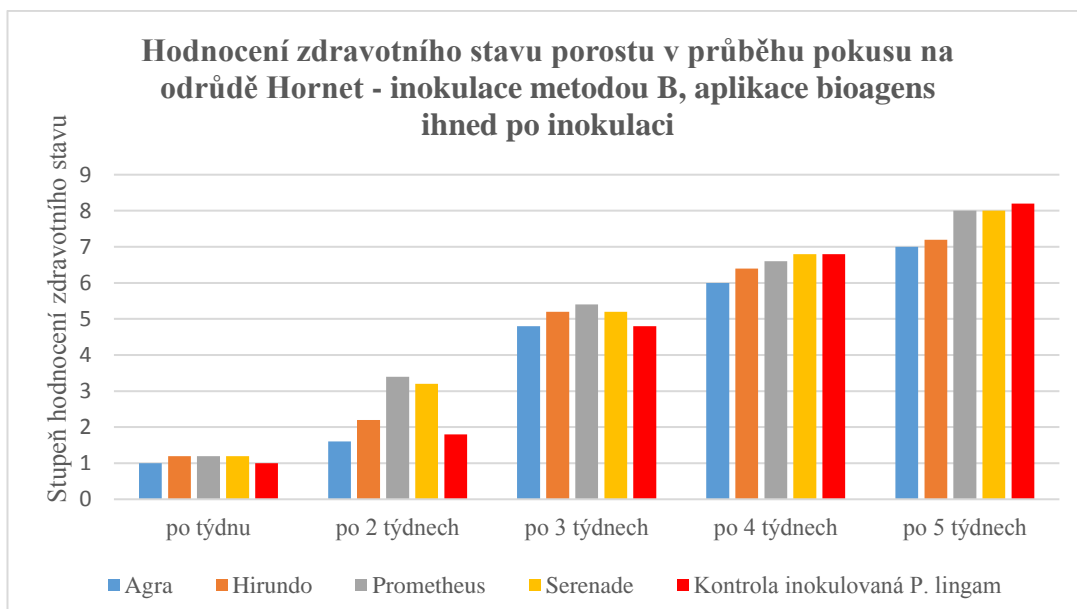


*Graf 9: Hodnocení zdravotního stavu porostu v průběhu pokusu na odrůdě Hornet – inokulace metodou A, aplikace bioagens ihned po inokulaci.*

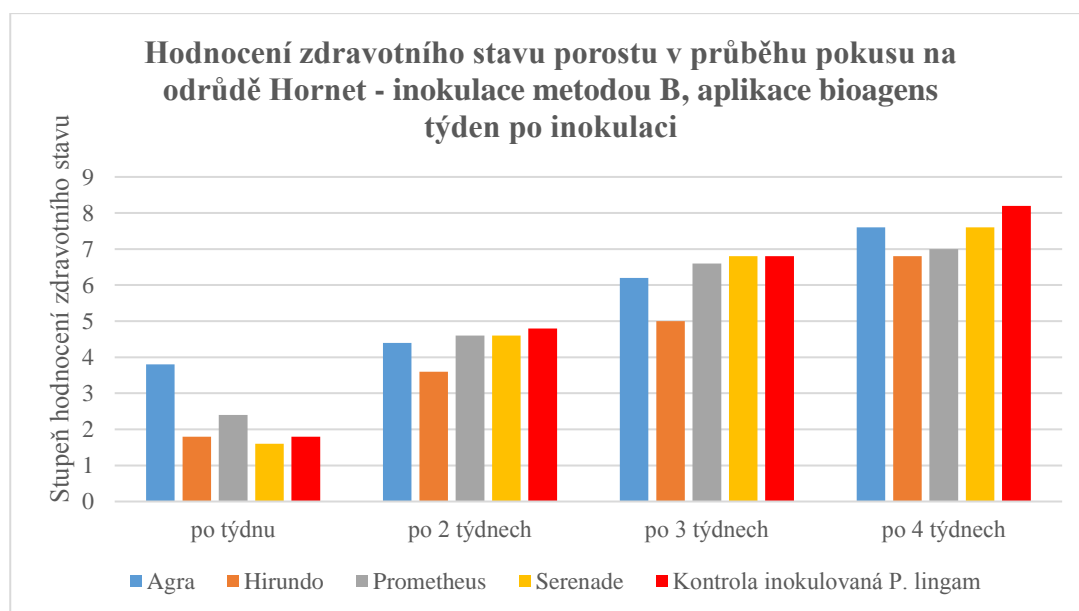


*Graf 10: Hodnocení zdravotního stavu porostu v průběhu pokusu na odrůdě Hornet – inokulace metodou A, aplikace bioagens týden po inokulaci.*

V grafech č. 9 a 10 byl hodnocen zdravotní stav porostu při inokulaci patogenu metodou A. Týdenní rozestup v aplikaci nemá výrazný vliv na zdravotní stav porostu. Nejlepší výsledek vykazuje přípravek Prometheus, ale rozdíly mezi variantami nejsou statisticky průkazné.



*Graf 11: Hodnocení zdravotního stavu porostu v průběhu pokusu na odrůdě Hornet – inokulace metodou B, aplikace bioagens ihned po inokulaci.*



Graf 12: Hodnocení zdravotního stavu porostu v průběhu pokusu na odrůdě Hornet – inokulace metodou B, aplikace bioagens týden po inokulaci.

V grafech č. 11 a 12 byl hodnocen zdravotní stav porostu při inokulaci patogenu metodou B. Týdenní rozestup v aplikaci nemá výrazný vliv na zdravotní stav porostu. Nejlepší výsledek pro oba termíny aplikace dosáhl přípravek Hirundo.

Dvě metody inokulace patogenu *P. lingam* na rostliny řepky ozimé nevykázaly mezi sebou po pěti týdnech významné rozdíly pro zdravotní stav rostlin na odrůdě Hornet.

Odrůda s deklarovanou odolností Croquet nevykázala významný rozdíl v hodnocení zdravotního stavu od odrůdy bez deklarované odolnosti Hornet.

## 5.2 Laboratorní diagnostika

### 5.2.1 Izolace DNA

Ideální hodnoty čistoty vyizolované DNA se pohybují při poměru absorbancí 260/280 od 1,7 až 1,9. Pokud je hodnota vyšší jak 2,1 nebo nižší než 1,5 nedochází ke správné PCR reakci.



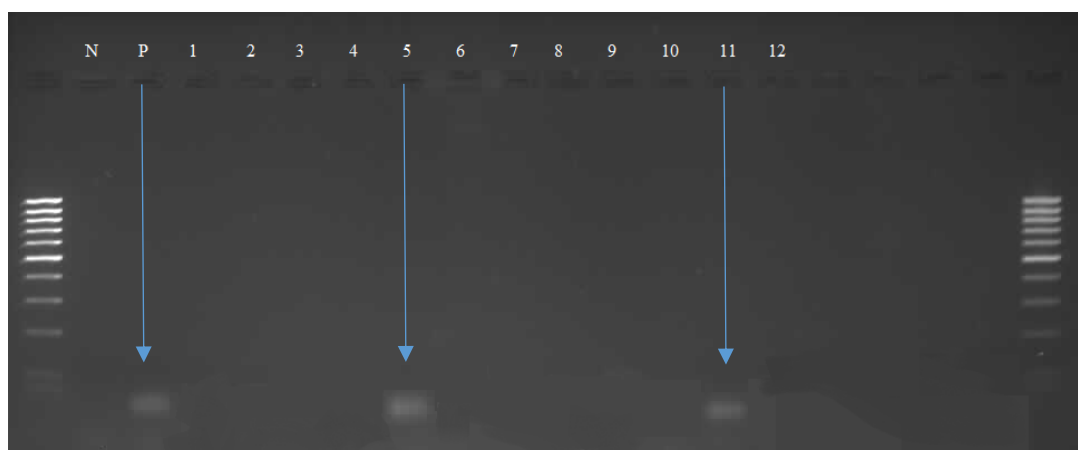
## Tabulka čistota 260/280

vzorek č. 1	2,10
vzorek č. 2	2,10
vzorek č. 3	2,08
vzorek č. 4	1,93
vzorek č. 5	2,00
vzorek č. 6	1,98
vzorek č. 7	2,02
vzorek č. 8	2,06
vzorek č. 9	1,99
vzorek č. 10	2,07
vzorek č. 11	1,86
vzorek č. 12	2,02

Tabulka 4: Čistota vyizolované DNA

Všechny hodnoty 260/280 vyizolované DNA jsou v rozmezí, které umožňuje PCR reakci.

### 5.2.2 Gelová elektroforéza



Obrázek 2: Gelová elektroforéza

Pozitivní kontrola, vzorek č. 5 (odrůda Croquet, infikováno metodou A, kontrola infikovaná patogenem *P. lingam*) a vzorek č. 11 (kontrola infikovaná patogenem *P. lingam*) jsou pozitivní.

## 6 Diskuze

Rostlinní škůdci (škodlivý hmyz, parazitické plevele a patogeni) patří mezi nejdůležitější biotické činitele, které způsobují vážné ztráty a škody na zemědělských produktech. Je třeba kontrolovat jejich šíření, aby byla zajištěna kvantitativní a kvalitativní produkce potravin a krmiv. V současnosti se zavádí mnoho různých strategií. Kromě správné agrotechniky a pěstitelské technologie se pěstitelé často spoléhají na chemické pesticidy (Agrios, 1988; Baker, 1987; Bargabus et al., 2002; Cook, 1993; Benhamou, 2004; Chisholm et al., 2006; Heydari et al., 2007; Kloepper et al., 2004). V současné době existují přísné předpisy o aplikaci chemických pesticidů. Znečištění životního prostředí způsobené nadměrným používáním agrochemikálií však vedlo ke značným změnám v postojích lidí k používání pesticidů v zemědělství. V důsledku toho se některé výzkumy na ochranu proti škůdcům zaměřily na vývoj alternativních vstupů pro syntetické chemikálie pro kontrolu škůdců a chorob. Zkoumá se vliv přípravků na životní prostředí a na necílové organismy (Baker, 1987; Cook, 1993).

Jedním z problémů vývoje nových šetrných přípravků je však neochota některých chemických společností vyvíjet a testovat nové chemikálie kvůli problémům s registračním procesem a vysokými náklady (Cook, 1993).

V předložené bakalářské práci byly využity přípravky Serenade (*Bacillus subtilis*), Prometheus (*Pseudomonas*) a Hirundo (*Bacillus* sp.), Agra (měďnatý přípravek v testování).

Ekologicky šetrnou náhradou za chemické pesticidy pro ochranu rostlin jsou rhizosferní půdní bakterie-antagonisté původců houbových chorob, nejčastěji *Pseudomonas fluorescens* pc78 (Kong et al., 2016), *Pseudomonas aeruginosa* PM12 (Fatima et Anjum, 2017) nebo *Pseudomonas fluorescens* PICF7 (Maldonado-Gonzalez et al., 2015).

Vhodnou biologickou ochranu řepky ozimé proti houbovým chorobám původem z půdy je přípravek Prometheus s rodem *Pseudomonas*. To je velmi překvapivé, neboť napříč mnoha uskutečněnými testy zaujímá většinou druhé, nebo třetí místo (Vašák a kol., 2000). Prometheus ve skleníkových pokusech, které byly sestaveny pro účely této bakalářské práce, prokázal účinnost vůči patogenu *P. lingam*.

Kmen *Bacillus subtilis* QST 731 produkuje řadu lipopeptidů (agrastatin, iturin, surfactin). Lipoproteiny narušují povrch buněk houbových patogenů. Poškozují buněčné membrány a při postupném zvýšení jejich koncentrace způsobují destrukci buněk patogenu (Agromanuál,

2018). Přípravek Serenade na základě výsledků předložené bakalářské práce prokázal účinnost proti patogenu *P. lignam*.

## 7 Závěr

Byly otestovány biologické bakteriální přípravky ve skleníkových podmínkách proti patogenu *P. lingam*.

1) Na odrůdách Croquet i Hornet nebyl prokázán významný rozdíl zdravotního stavu porostu při inokulaci metodou A a metodou B. Dvě testované metody inokulace nemají významný vliv na projev patogenu *P. lingam*.

2) Pomocí skleníkového pokusu bylo potvrzeno, že odrůda s deklarovanou odolností Croquet vykazala vyšší nárůst biomasy než odrůda bez deklarované odolnosti vůči *P. lingam* Hornet.

Po šesti týdnech nebyl zaznamenán významný rozdíl zdravotního stavu mezi odrůdou Croquet a Hornet.

3) Metodou PCR bylo potvrzeno, že biologické bakteriální přípravky jsou účinné proti patogenu *P. lingam*.

Hypotéza, že existují biologické bakteriální preparáty, které mohou být využity na ochranu proti patogenu *Phoma lingam* na řepce ozimé, byla potvrzena.

## 8 Literatura

Agrios, N. A. 1988. Plant Pathology. 3 rd ed. Academic Press. USA. 220-222.

Agromanuál. Serenade ASO [online]. 1. srpna 2018 [cit. 2019 – 04 - 05]. Dostupné z <[https://www.agromanual.cz/download/pdf\\_etiketa/e\\_serenade\\_aso.pdf](https://www.agromanual.cz/download/pdf_etiketa/e_serenade_aso.pdf)>.

Baker, K. F., 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 25. 67 – 85.

Banno, S., Ikeda, K., Saito, H., Sakai, H., Urushibara, T., Shiraishi, T., Fujimura, M. 2015. Characterization and distribution of two subtypes of *Verticillium longisporum* isolated from cabbage fields in Japan. Journal of General Plant Pathology. 81 (2). 118-126.

Baranyk, P., Balík, J., Háková, M., Havel, J., Kazda, J., Lošák, T., Málek, B., Markytán, P., Plachká, E., Richter, R., Soukup, J., Stražil, Z., Šaroun, J., Škeřík, J., Šmirous, P., Štranc, P., Volf, M., Vrbovský, V., Zehnálek, P., Zelená, V. 2010. Olejniny. Profi Press s.r.o. Praha. 206 s. ISBN: 978-80-86276-38-0.

Baranyk, P., Fábry, A., Balík, J., Dostálová, J., Humpál, J., Kazda, J., Koprna, R., Kuchtová, P., Markytán, P., Nerad, D., Soukup, J., Šaroun, J., Škeřík, J., Volf, M. 2007. Řepka. Pěstování. Využití. Ekonomika. Nakladatelství Profi Press, s. r. o. Praha. 208s. ISBN 978-80-86726-26-7.

Bargabus, R. L., Zidack, N. K., Sherwood, J. E., Jacobsen, B. J. 2002. Characterization of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phylosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. Physiol. Mol. Plant Pathol. 61. 289-298.

Bečka, D., Vašák, J., 2007. Výběr odrůd řepky ozimé pro sezonu 2007/8. Agromanuál. Profesionální ochrana rostlin. Příprava porostů ke sklizni. Přehled osiv řepky. 2007 (6). 68 - 71.

Bečka, D., Vašák, J., Zukalová, H., Mikšík, V. 2007: Řepka ozimá: pěstitelský rádce. Praha: Pro katedru rostlinné výroby FAPPZ, ČZU v Praze. Kurent. 56s. ISBN 978-80-87111-05-5.

Benhamou, N., 2004. Potential of the mycoparasite, *Verticillium lecanii*, to protect citrus fruit-against *Penicillium digitatum*, the causal agent of green mold. A comparison with-the effect of chitosan. *Phytopathology*. 94. 693-705.

Bioagens [online]. 2019 [cit. 2019 – 04 - 01]. Dostupné z <<https://www.bioagens.eu/serenade-aso-5-l>>.

Bouma, D. Uvádějí 4 nové odrůdy řepky. *Úroda* [online]. 18. května 2018 [cit. 2019 – 04 - 01]. Dostupné z <<https://www.uroda.cz/uvadeji-ctyri-nove-odrudy-repky/>>.

Bremer, H., Pfenning, M., Kehler, R. 2011. The Clearfield® production system in oilseed rape – a new herbicide generation in oilseed rape in Europe. International Rapeseed Congress. SPZO s.r.o. Prague. p. 602. ISBN: 978-87065-32- 7

Cook, R. J., 1993. Making greater use of microbial inoculants in agriculture. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31. 53-80.

Cunningham, G. H. 1927. Fungus disease attacking artichokes. Incidence, life - history, and remedial treatment. *New Zealand Journal of Agriculture*. 34. 402 – 408.

Diepenbrock, W., Fischbeck, G., Heyland, K. U., Knauer, N. 1999. *Spezieller Pflanzenbau*. Eugen Ulmer Company Stuttgart. p. 524. ISBN:3825201112.

Dominiak-Olson, J., Boyles, M., Peeper, T., Sander, H. 2017. Blackleg of canola. *Division of Agricultural Sciences and Natural Resources*. (3). 2.

Fatima, S., Anjum, T. 2017. *Frontiers in Plant Science* 8. 848.

Harrison, L., Evans, I., Thomas, P., Kharbanda, P. Blackleg of Canola. *Agri-Facts* [online]. Alberta. 14th December 2005 [cit. 2019 – 04 - 01]. Dostupné z <<https://open.alberta.ca/dataset/21d4a6a7-6ab5-459a-9e95-146c147a25ff/resource/1f43feb8-dfbb-47bc-9056-b489990cd307/download/1997-149-632-3.pdf>>.

Heale, J. B., and Karapapa, V. K. 1999. The *Verticillium* threat to Canada's major oilseed crop. Canola. *Can. J. Plant Pathol.* 21. 1 - 7.

Heydari, A., Misaghi, I. J., Balestra, G. M. 2007. Preemergence herbicides influence the efficacy of fungicides in controlling cotton seedling damping-off in the field. *Int. J. Agric. Res.* 2. 1049-1053.

Horák, I., 2007. Silný porost je vždy základem. *Agromanuál. Profesionální ochrana rostlin. Příprava porostů ke sklizni. Přehled osiv řepky.* 2007 (6). 50 – 51.

Chisholm, S. T., Coaker, B. D., Staskawitz B. J. 2006. Host-microbe interactions. Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell.* 124. 803 – 814.

Jones, C., Olson-Rutz, K. Soil nutrient management for canola. Montana State University Extension [online]. September 2016 [cit. 2019 – 04 - 01]. Dostupné z <<http://agresearch.montana.edu/wtarc/producerinfo/agronomy-nutrient-management/Canola/MSUEExtensionBulletin.pdf>>.

Kaczmarek, J., Jędryczka, M. 2011. Characterization of two coexisting pathogen populations of *Leptosphaeria* spp., the cause of stem canker of Brassicas. *Acta Agrobotanica* 64(2). 3-14.

Kloepper, J. W., Ryu, C. M., Thang, S. 2004. Induce systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology.* 94. 1259-1266.

Koenig, R., Hammac, W. A., Pan, W. Calona Growth, Development and Fertility. Washington State University Extension Fact Sheet FS045E [online]. November 2011 [cit. 2019 – 04 - 01]. Dostupné z <<http://cru.cahe.wsu.edu/CEPublications/FS045E/FS045E.pdf>>.

Kong, H. G., Kim, N. H., Lee, S. Y., Lee, S. W. 2016. *Plant Pathology Journal* 32 (2). 136-144.

Koprna, R., Macháčková, I. 2007. Odrůdový program Česká řepka. *Agromanuál. Profesionální ochrana rostlin. Příprava porostů ke sklizni. Přehled osiv řepky.* 2007 (6). 64 – 65.

Kuthan, A. Biopesticidy u nás a ve světě. Agromanuál [online]. 15. února 2017 [cit. 2019 – 04 - 01]. Dostupné z <<https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/ochrana-obecne/biopesticidy-u-nas-a-ve-svete>>.

Kužma, Š., Ackermann, P., Dobrovodský, J., Dostál, I., Filkuka, I., Harašta, P., Hauerland, M., Chládek, Z., Jüttner, T., Klumpar, J., Makeš, M., Minář, P., Muška, F., Navrátilová, M., Prukárová, D., Ptáček, F., Ráčil, K., Rozkošová, V., Švaříček, J., Talašová, N., Vaňurová, E. 1996. Metodická příručka pro ochranu rostlin: polní plodiny. Díl I. Polní plodiny. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v Brně. Odbor prostředků a metod ochrany rostlin. 303s.

Mahuku, G. S., Hall, R., Goodwin, P. H. 1996. Co-infection and induction of systemic acquired resistance by weakly and highly virulent isolates of *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 49. 61–72.

Maldonado-Gonzalez, M., Bakker, P. A. H. M., Prieto, P. 2015. *Frontiers in Microbiology* 6. 266.

Málek, B., Herda, G., Říha, K., Škeřík, J., Šaroun, J., Kazda, J., Baranyk, P., Volf, M. 2011. Stanovisko k pesticidům: ŘEPKA, Sborník vzdělávacích materiálů pro účastníky seminářů Svazu pěstitelů a zpracovatelů olejnin a SZPO s. r. o. V rámci Programu rozvoje a venkova ČR. SPZO s.r.o. Praha 7. 52s. ISBN: 978-80-87065-31-0.

McCaffery D., Potter T., Marcroft S., Pritchard F., Hind-Lanoiselet, T. 2009. Canola - best practice management guide for south-eastern Australia. Grains Research and Development Corporation. Kingston, Australia. p. 91. ISBN: 978-1-875477-85-2.

Mithen, R. F., Lewis, B. G. 1988. Resistance to *Leptosphaeria maculans* in hybrids of *Brassica oleracea* and *Brassica insularis*. *J. Phytopathol.* 123. 253 – 258.

Monas 1 [online]. Monas technology. 2019 [cit. 2019 – 04 - 01]. Dostupné z <<http://www.monastechnology.cz/index.php/hirundo>>.

Monas 2 [online]. Monas technology. 2019 [cit. 2019 – 04 - 01]. Dostupné z <<http://www.monastechnology.cz/index.php/prometheus-cz>>.



Mycobank 1 [online]. 2019 [cit. 2019-04-05]. Dostupné z <<http://mycobank.org/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000067&Rec=14410&Fields=All>>.

Mycobank 2 [online]. 2019 [cit. 2019-04-05]. Dostupné z <<http://mycobank.org/MB/230154>>.

Neill, J. C., Brien, R. M. 1933. Occurrence of dry rot on rape and chou moellier in the field. New Zealand Journal of Agriculture. 47. 19 – 20.

Pfeufer, E., Gauthier, N., W., Bradley, C., A. Powdery Mildew. University of Kentucky Plant Pathology Fact Sheet [online]. January 2017 [cit. 2019 – 04 - 01]. Dostupné z <<https://plantpathology.ca.uky.edu/files/ppfs-gen-02.pdf>>.

Prokinová, E. 2003. Choroby řepky význam v ČR a ochrana proti nim - Sborník „Řepka, Mák, Hořčice“. 19. 2. 2003. 76-79.

Purdy, H. L. 1979. Sclerotinia sclerotiorum: History, Diseases and Symptomatology, Host Range, Geographic Distribution, and Impact. The American Phytopathological Society. 69 (8). 875-878.

Ralhan, A., Thurow, C., Gatz, C. 2013. The tolerance of the *Arabidopsis* defense hormone receptor mutant *coil* against the vascular pathogen *Verticillium longisporum* is not due to increased levels of the active hormone jasmonoyl-isoleucine. Plant Signaling & Behavior. 8 (11). 1.

Rouxel, T., Balesdent, M. H. 2005. The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era. Molecular Plant Pathology. 6(3). 225-241.

Ryšánek, P., Mazáková J., Konradyová, V., Grimová, L. 2018. Nejvýznamnější choroby řepky olejky v České republice. Česká zemědělská univerzita v Praze. Katedra agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. 99s. ISBN: 978-80-213-2832-7.

Ryšánek, P., Mazáková, J., Řičařová, V. 2015. Laboratorní diagnostika hlavních patogenů řepky. Rostlinolékař. 2015 (6). 35-37.

Siebold, M., Tiedemann A. V. 2013. Effects of experimental warming on fungal disease progress in oilseed rape. Glob. Chang. Biol. 19. 1736–1747.

Slavíková, L., Kumar, J. Virové choroby řepky a možnosti ochrany. Agromanuál [online]. 3. září 2018 [cit. 2019 – 04 - 01]. Dostupné z <<https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/choroby/virove-choroby-repky-a-moznosti-ochrany>>.

Souffi info. Řepka. 2016. Odborný zemědělský občasník společnosti Soufflet Agro a.s. (25). 1-15.

Spitzer, T., Bílovský, J. 2014. Vliv průběhu počasí na podzimní výskyt *Leptosphaeria maculans* na řepce. Obilnářské listy č. 1/2014. XXII (1). 18 – 19.

Süzer, S. 2016. Effects of plant nutrition on canola (*Brassica napus* L.) growth. Trakya University Journal of Natural Sciences. 16(2). 87-90.

Škaloud, J. 1960. Základy pěstování rostlin. 3. vydání. Státní zemědělské nakladatelství v Praze. Praha 3. 296 s.

Štěpánek, P. Představení odrůd ozimé řepky jednotlivých společností dodávajících osiva na český trh v roce 2013. Agromanuál [online]. 20. května 2013 [cit. 2019 – 04 - 01]. Dostupné z <<https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/osivo-a-sadba-1/predstaveni-odrud-ozime-repky-jednotlivych-spolecnosti-dodavajicich-osiva-na-cesky-trh-v-roce-2013>>.

Torma, S. 2007. Řepka olejná a jej požadavky na půdu a živiny. Agromanuál. Profesionální ochrana rostlin. Příprava porostů ke sklizni. Přehled osiv řepky. 2007 (6). 46 – 48.

Toscano-Underwood, C., Huang, C. Y. J., Fitt, B. D. L., Hall, A. M. 2003. Effects of temperature on maturation of pseudothecia of *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* on oilseed rape stem debris. *Plant Pathology*. 52. 726-736.

Vašák, J., Baranyk, P., Bartoška, J., Bečka, D., Bechyně, M., Filípek, I., Kamler, F., Kuchtová, P., Matula, J., Mikšík, V., Nerad, D., Novák, J., Nozdrovický, L., Pawlica, R., Prášil, I., Prokinová, E., Suškevič, M., Šedivý, J., Tuček, P., Vincenc, J., Zehnálek, P., Zupalová, H. 2000. *Řepka*. Agrospoj. Praha. 321 s.

Vrkoč, F., Vach, M., 2005. Sborník „Řepka, mák, slunečnice a hořčice“. Česká zemědělská univerzita v Praze. Katedra rostlinné výroby. 194s. ISBN 80-213-1289-0.

Zeise, K. 1992. Gewächshaustest zur Resistenzprüfung von Winterraps (*Brassica napus* L. var. *oleifera* Metzger) gegen den Erreger der Rapswelke *Verticillium dahliae* Kleb. *Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst* 44. 125-128.