

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra ochrany rostlin



**Možnosti integrované ochrany kořenů řepky
proti patogenu *Verticillium longisporum***

Bakalářská práce

Václav Škarýd

Pěstování rostlin

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

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Možnosti integrované ochrany kořenů řepky proti patogenu *Verticillium longisporum*" jsem vypracoval(a) 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 autor(ka) uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 18. 4. 2019

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval doc. Ing. Janu Kazdovi, CSc., za vedení bakalářské práce a vytvoření příjemných pracovních podmínek. Zároveň bych rád poděkoval Ing. Evě Zuskové za vedení při praktických pokusech v této bakalářské práci a obětavou asistenci při její tvorbě.

Možnosti integrované ochrany kořenů řepky proti patogenu *Verticillium longisporum*

Souhrn

Tato bakalářská práce se zabývá biologickou ochranou proti patogenu *Verticillium longisporum* na rostlinách řepky olejky a diagnostikou choroby – verticiliového vadnutí – tímto patogenem způsobeným. V literární části se stručně věnuje současnému běžnému způsobu pěstování řepky olejky a zmiňuje některé problémy spojené s výrazným rozvojem pěstebních ploch ozimé řepky v České republice. Zběžně charakterizuje některé odrůdy řepky olejky, které mají deklarovanou odolnost vůči patogenu *V. longisporum*. V další části jsou zmíněny nejvýznamnější choroby řepky olejky a jejich původci. Detailněji se práce věnuje zejména Verticilliovému vadnutí řepky a houbovému patogenu, který tuto chorobu způsobuje. Jsou popsány důvody obtížnosti detekce této choroby a zmíněna poškození, která rostlinám způsobuje. Patogen je popsán a je charakterizován jeho životní cyklus. Nadále jsou zmíněny možnosti ochrany proti Verticilliovému vadnutí řepky, a to zejména v rámci integrované ochrany rostlin, jejíž zásady jsou uvedeny. Práce se též zabývá biologickou ochranou, jejíž definice se pokouší vymezit a zevrubně popisuje mechanismy, kterými jsou schopny prospěšné bioagens redukovat či přímo znemožňovat výskyt patogenních organismů na rostlinách. Poslední část je věnována biologickým přípravkům, které by mohly vykazovat účinnost proti houbovému patogenu *Verticillium longisporum*.

V rámci praktické části práce je popsána metodika skleníkových pokusů provedených v období mezi 15. 4. 2018 a 13. 5. 2018 v Pokusných a demonstračních sklenících ČZU, které se věnovaly hodnocení zdravotního stavu rostlin řepky olejky ošetřených vybranými biologickými přípravky (Prometheus, Hirundo, Serenade, Gliorex, Polyversum a Clonoplus). Dále jsou vylíčeny metody laboratorní diagnostiky, které byly využity ke zhodnocení současné metody polní diagnostiky rostlinného patogenu *V. longisporum* při hodnocení 30 vzorků rostlinného materiálu shromážděných v poloprovozních pokusech na území České a Slovenské republiky. Těmito metodami jsou Izolace celkové DNA pomocí CTAB, Extrakce DNA dle Brandfass 2004, PCR a Gelová elektroforéza.

Nebylo potvrzeno, že biologické přípravky redukují výskyt patogenu *V. longisporum* v kořenech řepky ozimé, ale některé přípravky prokazatelně zpomalují jeho vývoj.

Klíčová slova: *Verticillium longisporum*, *Brassica napus* var. *Napus*, Integrovaná ochrana rostlin, Biologická ochrana rostlin, Laboratorní diagnostika

Integrated Protection of the Winter Rape Roots Against *Verticillium longisporum*

Summary

This bachelor thesis is focused on biocontrol against the plant pathogen *Verticillium longisporum* on *Brassica napus var. napus* plants and the diagnostics of the disease cause by this pathogen. The literary research part briefly describes the current common way to grow oilseed rape in the Czech Republic and the problems connected to the increasing of growing areas. Varieties of oilseed rape with the tolerance against *Verticillium* wilt are shortly described. In the next part, there are mentioned the most common pathogens of *Brassica napus var. Napus*. The most detailed view is taken on the plant pathogen *Verticillium longisporum*. Problems connected to the detection of this plant pathogen are described with a brief description of the damages it cause on the plants. It also contains part dedicated to the life-cycle of this pathogenic organism. The possibilities of protection against the *Verticillium* wilt are mentioned, mainly focused on the integrated crop protection and its principles are characterized. The main focus is on the methods of biocontrol and the mechanisms used to achieve the reduction of plant pathogens on crops. The last part describes chosen biological preparations that could reduce presence of plant pathogen *Verticillium longisporum* on oilseed rape roots.

The practical part of this bachelor thesis describes the methodology of greenhouse experiments concluded in the greenhouse facilities of Czech University of Life sciences between 15th of April and 13th of May 2018, where the effect of different biological prepartes (Prometheus, Hirundo, Serenade, Gliorex, Polyversum and Clonoplus) on the disease *Verticillium* wilt severity was evaluated. Methods of laboratory diagnostics, which were used to asses the reliability of the currently used field diagnostics are covered. Those methods are CTAB DNA isolation, DNA extraction by Brandfass 2004, PCR and Gel electroforesis. These were conducted on 30 isolates acquired from field experiments from the Czech Republic and Slovakia in 2018.

Biological prepartes used in this bachelor thesis didn't reduce the presence of *Verticillium longisporum* in winter rape roots, but they slow down the development of the plant pathogen.

Keywords: *Verticillium longisporum*, *Brassica napus var. Napus*, Integrated control, Biological control, Laboratory diagnostics

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíl práce.....	9
3 Literární rešerše.....	10
3.1 Řepka olejka (Brassica napus var. Napus).....	10
3.1.1 Biologie.....	11
3.1.2 Technologie pěstování	11
3.2 Odrůdy řepky ozimé	12
3.2.1 Inspiration	12
3.2.2 Factor KWS H 2014	12
3.2.3 Alvaro KWS H 2015	12
3.2.4 Goya L 2009	12
3.2.5 Orex L 2016.....	13
3.3 Choroby řepky olejky	13
3.3.1 Verticillium longisporum (C. Stark) (Karapapa et al. 1997).....	13
3.4 Ochrana proti patogenu <i>V. longisporum</i>.....	16
3.4.1 Vitavax.....	16
3.4.2 Symetra	16
3.5 Integrovaná ochrana rostlin.....	16
3.5.1 Biologická ochrana rostlin.....	17
3.6 Biologické přípravky na bázi mikroorganismů	20
3.6.1 Přípravky použité v rámci předložené bakalářské práce	20
4 Metodika	23
4.1 Skleníkové pokusy.....	23
4.1.1 Použitý materiál	23
4.1.2 Design experimentu	24
4.1.3 Hodnocení experimentu.....	24
4.2 Laboratorní diagnostika.....	26
4.2.1 Izolace celkové DNA.....	28
4.2.2 PCR (Debode et al. 2011).....	31
4.2.3 Gelová elektroforéza.....	31

5	Výsledky	32
5.1	Skleníkové pokusy	32
5.1.1	Stupně zdravotního stavu neinokulovaných rostlin	32
5.1.2	Stupně zdravotního stavu inokulovaných rostlin	33
5.1.3	Délka rostlin	34
5.1.4	Tloušťka kořenového krčku	35
5.3	Laboratorní diagnostika	37
5.3.1	Izolace celkové DNA	37
5.3.2	Gelová elektroforéza	39
6	Diskuze	41
7	Závěr	43
8	Literatura	44
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	50

1 Úvod

Brukev řepka olejka (*Brassica napus* var. *Napus*) je jednou z nejvýznamnějších zemědělských plodin na území České republiky, Evropy ale i celého světa. Ačkoliv se v poslední době objevuje určitý tlak veřejnosti na snížení výměry pěstebních ploch řepky a ekologicko-hospodářský vývoj má také určité tendence přitěžovat pěstování řepky olejky, nedá se předpokládat, že by její místo mohla nahradit, alespoň v dohledné době, plodina jiná. Vzhledem k obrovské výměře a ekonomickému významu této plodiny je však také třeba dbát na její ochranu, protože výraznější rozšíření chorob a škůdců by mohlo vést k poměrně významným ekonomickým ztrátám. Jednou z nejvýznamnějších skupin patogenů řepky jsou houbové choroby. Verticilliové vadnutí způsobené patogenem *Verticillium longisporum* se v posledních letech stává stále diskutovanější chorobou, u které se předpokládá, že může výrazně redukovat výnos. Vzhledem ke směru vývoje současné evropské politiky z hlediska ochrany rostlin je třeba věnovat větší pozornost alternativním zdrojům ochrany bez nebo jen s nezbytným využitím chemických přípravků. Inokulum patogenu *V. longisporum* se nachází v půdě, napadení tak probíhá přes kořeny rostlin, tím pádem je třeba se zaměřit na biologické přípravky působící v půdě a zhodnotit jejich využití při ochraně proti patogenu *Verticillium longisporum* a také jejich případnou účinnost pro ozdravení půdy.

2 Cíl práce

Hlavním cílem práce bylo vyzkoušení a zhodnocení účinnosti biologických přípravků na zdravotní stav rostlin řepky ozimé infikované patogenem *Verticillium longisporum*.

Vedlejší cíle práce:

Zhodnotit spolehlivost současného způsobu polní diagnostiky (tvar stonků během vegetace) za pomoci laboratorní diagnostické metody PCR.

Zhodnotit různé metody izolace DNA a zvolit vhodný způsob pro metody PCR.

Hypotéza:

Některé biologické přípravky jsou schopny zredukovat výskyt patogenního organismu *V. longisporum* na kořenech řepky ozimé.

3 Literární rešerše

3.1 Řepka olejka (*Brassica napus* var. *Napus*)

Říše: Rostliny (*Plantae*)

Oddělení: Rostliny krytosemené (*Magnoliophyta*)

Třída: Vyšší dvouděložné rostliny (*Rosopsida*)

Řád: Brukvotvaré (*Brassicales*)

Čeleď: Brukvovité (*Brassicaceae*)

Rod: Brukev (*Brassica*)

Druh: Brukev řepka (*Brassica napus*) (Daníhelka et al. 2012)

Brassica napus var. *Napus* neboli řepka olejná je rostlina z čeledi brukvovitých, jejíž počátek pěstování se dá v Evropě pozorovat přibližně od 19. století. Výraznější nárůst osevnických ploch lze sledovat od roku 1970. Extrémní vývoj v České republice však zaznamenala zejména v době porevoluční. K pěstování řepky olejky se většina pěstitelů přiklání z poměrně široké řady důvodů, za hlavní se však dá označit její ekonomická zajímavost. Dále je nárůst pěstebních ploch výsledkem mnoha procesů, jako je například restrukturalizace zemědělství či vstup České republiky do Evropské unie. Po razantním snížení stavů hospodářských zvířat a ústupu celé řady plodin ať už z důvodů ekonomických, či technologických, řepka olejka v osevních postupech majoritně využívaných v České republice zaujímá vzácnou roli zlepšující plodiny. Rozšiřování této plodiny s sebou však nese i negativní aspekty, mezi hlavní je možno zařadit velký rozvoj chorob a plevelů přímo vázaných na její pěstování, které se však vždy projevují s určitým zpožděním. V dnešní době se však v podstatě bez výjimky vyskytuje v každém konvenčním osevním postupu a výrazné omezení pěstování řepky olejky se zdá jako nereálné vzhledem k absenci, či spíše výrazně nižší konkurenční schopnosti jiných plodin, z hlediska zařazení v osevních postupech. (Baranyk & Fábry 2007; Bečka et al. 2007)

ŘO je rostlinou mírného pásma, rozšířena je však co se týče tohoto klimatu kosmopolitně. Pěstování je většinou vázáno na pěstování obilovin, jelikož řepka je výbornou předplodinou a nejčastěji po ní v osevních postupech následuje pšenice ozimá. Česká republika je pátým největším pěstitelům řepky olejné v EU a devátým největším na světě. Výnosy se pohybují okolo 3 t/ha semen. K největšímu rozvoji pěstování došlo po roce 1990, kdy se pěstební plochy přibližně ztrojnásobily. Tento vývoj byl vázaný na snížení živočišné produkce, jejímž důsledkem byla potřeba nahrazení jetelovin, pro které se nenacházelo využití. Řepka tedy zabrala skupinu zlepšujících plodin a v osevních postupech ve většině českých systémů dominuje nad ostatními alternativami. V roce 2017 bylo na území České republiky vyseto 394 262 hektarů řepky meziročně se jedná o změnu v rámci desetin procent (ČSÚ 2019)

Každoročně se však změny plochy odlišují maximálně v rámci jednotek procent. (Baranyk 2010; Bečka et al. 2007)

3.1.1 Biologie

Brukev řepka olejka je jednoletá nebo dvouletá rostlina dosahující výšky okolo 150 centimetrů. Květy jsou žluté a čtyřčetné a plodem je šešule, v níž se nacházejí semena, jež jsou hlavním pěstitelským zájmem. Jedná se o rostlinu hluboko kořenící, kulový kořen dosahuje hloubky přes 0,5 metru. Setí probíhá přibližně v druhé polovině srpna a sklízet se začíná v první polovině července. Na podzim probíhá vývoj listové růžice a kořenu, na jaře dále pokračuje dlouhivý růst. Řepka kvete přibližně v období pozdního dubna, na některých místech převážně ve vyšších polohách je kvetení oddáleno až do května. Po odkvetení a vytvoření šešulí nastává fáze dozrávání, kdy porost zasychá, čímž se dostává do stavu vhodného ke sklizni a dalšímu využití. (Baranyk & Fábry 2007)

3.1.2 Technologie pěstování

Klíčovým faktorem pro správné setí řepky je výběr vhodné předplodiny. Důležitým faktorem, kterým předplodina ovlivňuje pěstování a výnos řepky je termín sklizně dané předplodiny a stav, v jakém předplodina zanechává půdu. Za vhodné předplodiny se dají označit ranné brambory, luskoviny a píceiny sklizené v červenci. Jelikož se ale tyto plodiny v českých osevních postupech vyskytují minimálně, na většině ploch jsou jako předplodiny pěstovány obilniny, ze kterých se jako nejvhodnější předplodiny jeví ozimý ječmen, vzhledem k jeho rannějšímu termínu sklizně. Obilniny s sebou nesou ale i řadu problému a jako nejvýznamnější se dá označit poměrně agresivní růst výdrolu, jenž je vhodné herbicidně likvidovat. Mezi nevhodné předplodiny patří kukuřice, cukrová řepa a pozdní brambory. (Baranyk & Fábry 2007; Zemědělec.cz 2013)

Správná předseťová příprava je klíčovým faktorem při správném pěstování řepky. Správné rozvržení předseťové přípravy je přímo navázáno na pěstovanou předplodinu a přírodní podmínky. Důležitá je analýza vláhového režimu půdy a určení stavu, v jakém se v současné chvíli půda nachází a pěstovaná předplodina ovlivňuje čas, ve kterém se musí předseťová příprava stihnout. Regulace velikosti půdních agregátů je jednou z nejdůležitějších operací nutných v tomto období provést. V humidních oblastech je vzhledem i k lepší regulaci výdrolu a semen plevelných rostlin doporučována orba. Ta je však energeticky a ekonomicky náročná a častěji vede k erozi, a tak je současným trendem v předseťové přípravě rostlin minimalizace. Zpracování půdy bez obracení orniční vrstvy často vede k ekonomicky lepším výsledkům zejména v aridnějších oblastech, ale nevede k tak dobré regulaci plevelů a výdrolu. (Bečka et al. 2007; Zemědělec.cz 2013)

Termín výsevu ozimé řepky se většinou pohybuje v rozmezí poloviny až konce srpna, vhodné je však řepku zasít v co nejzazším termínu s ohledem na polohu. Hloubka setí se vzhledem k velikosti semen pohybuje okolo dvou až tří centimetrů, a proto je důležité v této oblasti zajistit vhodné podmínky pro vzcháživost semen. Výsevní jednotka ozimé řepky se pohybuje zhruba v rozsahu 450 až 700 tisíc klíčivých semen na hektar. Pro výsev řepky je možné použití jak normálních, tak přesných secích strojů. (Baranyk & Fábry 2007)

3.2 Odrůdy řepky ozimé

Pokus, na kterém se zakládá tato bakalářská práce, byl vedený na odrůdě řepky Inspiration, která nevykazuje odolnost vůči patogenu *V. longisporum*. Vzhledem k narůstajícími problémy s půdními houbovými patogeny je třeba využívat odrůdy, které se vyznačují rezistencí či odolností k půdním kořenovým chorobám. Vzhledem k nedostatečné možnosti ochrany je na šlechtění kladen narůstající důraz a je to jedna z možností, jak s kořenovými chorobami řepky bojovat. (Knüfer 2011)

3.2.1 Inspiration

Jedná se o středně raný hybrid vhodný do všech oblastí pěstování. Odrůda se vyznačuje vysokou plasticitou, olejnatostí a HTS. Dosahuje střední až vyšší výšky a má vysokou odolnost k poléhání. Doporučený je spíše nižší výsevku. Tato odrůda nemá deklarovanou odolnost vůči patogenu *Verticillium longisporum*. (Elita 2019)

3.2.2 Factor KWS H 2014

Jedná se o středně raný pylově fertilní hybrid, který se hodí do většiny oblastí pěstování a dobře reaguje na vyšší intenzitu pěstování. Tento hybrid má vysoký výnos semene i oleje a nijak výrazně se neprojevují podmínky ročníku. Tato odrůda se hodí k širokořádkovému využití a k nižšímu výsevku díky dobré tvorbě bočních větví a větví druhého řádu. Odolná vůči poléhání a pukání šešulí. Nadprůměrná tolerance k *Verticillium longisporum* a geneticky podmíněné odolnosti vůči *Phoma lingam*. (KWS 2019)

3.2.3 Alvaro KWS H 2015

Středně raný pylově fertilní hybrid vhodná pro typické polohy a půdy pěstování řepky ozimé s vysokou schopností kompenzace nedostatků daného stanoviště. Vysoký výnos semene a oleje. Vhodné pro strip-till i přesné setí. Dobrá odolnost vůči poléhání za předpokladu jarní regulace výšky porostu a vysoká odolnost vůči vypadávání semen. Velmi dobře odolává komplexu chorob (*Phoma*, *Botrytis*, *Alternaria*, *Sclerotinia*, *Verticillium*). (Agromanuál 2016; KWS 2018)

3.2.4 Goya L 2009

Polopozdní liniová odrůda s vysokým výnosovým potenciálem. Vhodná pro všechny oblasti typické pro pěstování řepky. Střední až vyšší vzrůst a nízká náchylnost k poléhání. Semeno obsahuje minimum glukosinolátů a kyseliny erukové. Zdravotní stav na velmi dobré úrovni, vysoká tolerance zejména vůči *Verticillium longisporum*. (Agromanuál 2016; Saatbau 2019)

3.2.5 Orex L 2016

První česká registrovaná odrůda vzniklá dihaploidizací. Nižší, polopozdní, dobrá odolnost vůči poléhání a nadprůměrná zimuvzdornost. Odolnost vůči významným chorobám dobrá, vysoká tolerance zejména vůči *Verticillium longisporum*. (Selgen 2019)

3.3 Choroby řepky olejky

Ačkoliv je doporučený rozestup pěstování řepky na jednotlivých půdních blocích 4 roky, díky tlaku poptávky je občas nemožné ho dodržovat. Toto však vede ke zvýšenému výskytu houbových chorob, které se mohou významně projevovat jako limitující faktor pěstování řepky. Mezi důležité původce houbových chorob na našem území patří *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*) a *Verticillium longisporum* (Prokinová 2003). Dále se také mohou vyskytovat *Pyrenopeziza brassicae*, *Alternaria brassicae*, *Erysiphe cruciferarum*, *Plasmidiophora brassicae*, *Botrytis cinerea*, *Peronospora parasitica* (Odstrčilová & Plachká 2007).

Diagnostika houbových chorob je zejména v počátečních fázích napadení velice složitá, vzhledem k vzájemné podobnosti daných příznaků. Na řepce se také vyskytuje více druhů rodu *Verticillium*, které je možno rozeznat až za pomoci využití laboratorních diagnostických metod. (Knüfer 2011)

3.3.1 *Verticillium longisporum* (C. Stark) (Karapapa et al. 1997)

Říše: *Fungi*

Oddělení: *Ascomycota*

Pododdělení: *Pezizomycotina*

Třída: *Sordariomycetes*

Podtřída: *Hypocreomycetidae*

Řád: *Glomerellales*

Čeleď: *Plectosphaerellaceae*

Rod: *Verticillium*

Druh: *Verticillium longisporum* (C. Stark)

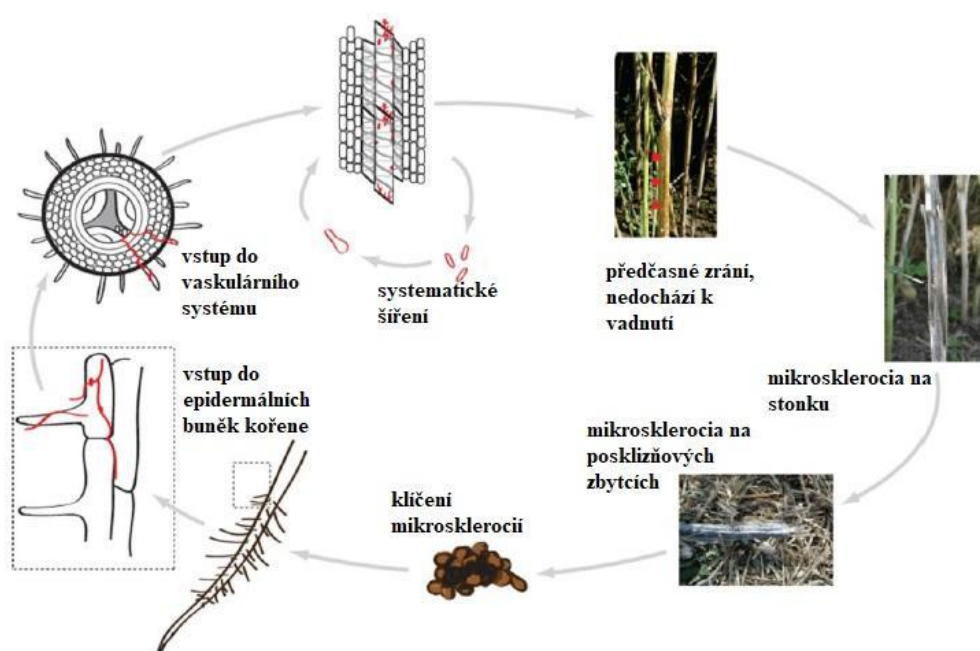
(Karapapa et al. 1997)

Verticillium longisporum je vřeckovýtrusá houba způsobující chorobu rostlin běžně známou jako verticilliové vadnutí. V závislosti na minulém zvyšování pěstebních ploch ozimé řepky a stále se rozšiřujícímu areálu tohoto patogenu začíná představovat poměrně výrazný limitující faktor v pěstování řepky. „Škody však mohou být mimořádně významné a mohou snížit výnos o mnoho desítek procent.“ (Baranyk & Fábry 2007)

3.3.1.1 Projevy verticilliového vadnutí

Ačkoliv se choroba nazývá verticilliové vadnutí, neprojevuje se vadnutím a usycháním jako u jiných vaskulárních patogenů (Gladders 2009). Příznaky této choroby jsou často nespecifické a snadno zaměnitelné s jinými patogenními organismy. Nejvýznamnější příznaky se objevují až v pozdní fázi vývoje hostitele, což komplikuje diagnostiku choroby v polních podmínkách (Dunker et al. 2008). Za první příznak může být považováno žloutnutí jedné poloviny listů při kvetení řepky (Eastburn & Paul 2007). V této fázi se také mohou objevit další nespecifické příznaky jako chloróza listů a postranních větví. Nejčastější příznaky se objevují až ve fázi dozrávání. V důsledku napadení xylému hostitele patogenem lze na infikované rostlině pozorovat zprvu žlutý a později tmavnoucí podélný pruh pletiva táhnoucí se v různé šířce po jedné straně stonku od jeho báze až případně do jeho postranních větví. Podélná léze je postupem času výraznější díky šíření patogena z xylému do primární kůry. V té se dále tvoří mikrosclerocia, načechrá praská pokožka. Tento proces je také pozorovatelný v napadených kořenech a dřeni. U silně napadených jedinců může na postranních větvích docházet k předčasnému dozrávání. Všechny příznaky lze však poměrně snadno zaměnit s jinými patogeny, které se na řepce vyskytují v podobné fenologické fázi a diagnostika je tedy nepřesná (Depotter et al. 2016; Gladders 2009).

3.3.1.2 Životní cyklus



Obrázek 1 - Životní cyklus *Verticillium longisporum* viz Knüfer 2011

Pro *Verticillium longisporum* a další druhy *Verticillia* jako třeba *Verticillium dahliae* a *Verticillium arbo-atrum* je charakteristická změna životní strategie během jejich životního cyklu. V závislosti na podmínkách prostředí se *V. longisporum* může vyskytovat ve fázi dormantní, parazitické nebo saprofytické (Eynck 2008). V dormantní fázi se houba vyskytuje

ve formě microsclerotíí, což jsou melanizované shluky zvětšených hyf. Microsclerotia mohou v půdě přežít déle než deset let a mohou tedy způsobit její dlouhotrvající kontaminaci (Heale & Karapapa 1999). Microsclerotia začínají klíčit při kontaktu s kořenovými exudáty rostlin. Předchozí studie ukazují, že microsclerotia mohou začít klíčit nejen při kontaktu s kořenovými exudáty hostitelské rostliny, ale mohou ho také vyvolat kořenové exudáty rostlin, které *Verticillium longisporum* nenapadá (Mol & Riessen 1995). Exudáty vypuštěné buňkami kořenu se rozpustí do rhizosféry, což vede k navýšení exudátového gradientu (Olsson & Nordbring-Hertz 1985). Tento gradient stimuluje růst hyf ke kořenu a parazitická fáze houby začíná přímou penetrací kořenových epidermálních buněk (Zhou et al. 2006; Eynck et al. 2007). Během penetračního procesu nikdy nebylo pozorováno, že by hyfy formovaly apressoriální struktury. Průnik do epidermálních buněk proběhl spíše formou mírného rozšíření hyfálních špiček a vytvořením tenkého čepu, který do rostliny vstupuje. Průnik kořenovou kůrou byl pozorován před napadením xylémových cév, a to jak mimobuněčně, tak i mezibuněčně (Eynck et al. 2007). Ve vaskulárním systému probíhá systematický růst v rámci centrálního válce a v cévních svazcích stonku. Během této fáze je vytvořena nová generace konidií. Se začátkem stárnutí rostliny patogen opouští xylémové cévy a vstupuje do parenchymatických buněk. Tato migrace začíná saprofytickou fází životního cyklu houby a vede k tvorbě microsclerotíí. (Knüfer 2011)

3.3.1.3 Detekce

Verticilliová hniloba na ozimé řepce, široce rozšířená choroba v kontinentální Evropě, je způsobena „téměř diploidním“ houbovým patogenem *Verticillium longisporum*. 31 izolátů z rostlin brukvovitých, a to zejména z ozimé řepky olejky z Německa, Švédska, Japonska, Francie a Polska, a 1 izolát z cukrové řepy byly popsány a porovnávány s 9 typickými izoláty *Verticillium dahliae* a 5 izoláty *Verticillium arbo-atrum*. Isoláty *Verticillium longisporum* byly odlišitelné od *Verticillium dahliae* třemi morfologickými znaky: podlouhlá microsclerotia, dlouhá conidia (7,1–8,8 μm) a zejména 3 phalida na nódum na conidioforech. Zástupci *Verticillium dahliae* měli přibližně kulovitá microsclerotia, kratší conidie (3,5–5,5 μm) a 4-5 phalid na conidioforech. Při použití tří oligonukleotidových primerů byly izoláty *Verticillium longisporum* jednoznačně odlišitelné od izolátů *Verticillium dahliae* a *Verticillium albo-atrum* pomocí výsledků RAPD. Při skleníkových testech patogenity, ve kterých bylo využito 5 odrůd ozimé řepky olejky, se potvrdila patogenita *Verticillium longisporum*, kdežto *Verticillium dahliae* nebylo patogenní. Důkazy naznačují, že se *Verticillium longisporum* mohlo vyvinout pomocí parasexuální hybridizace mezi *Verticillium dahliae* a *Verticillium arbo-atrum*, čímž by mohl být vysvětlen jeho „téměř diploidní“ stav a původ čtyř pozorovaných rekombinací. Na poli se první symptomy této choroby projevují poměrně pozdě, a to až ve fázi dozrávání hostitelských rostlin a zároveň jsou snadno zaměnitelné s jinými houbovými patogeny, proto je správné rozpoznání této choroby v polních podmínkách velice složité a v praxi nemá velkého uplatnění. (Karapapa et al. 1997)

3.4 Ochrana proti patogenu *V. longisporum*

Jako klíčový prvek ochrany proti všem houbovým patogenům je uváděno dodržování minimálně tříletého, raději však čtyřletého odstupu v osevních sledech. Do nich by také neměly být zařazovány luskoviny a slunečnice. Mezi další možnosti patří kvalitní management posklizňových zbytků, který podpoří jejich rozklad a zkrátí tím dobu přežívání patogena na pozemku. Potřebná je také likvidace rostlin vzešlých z výdrolu, které umožní vývoj choroby mimo hlavní vegetační období a může tak být zdrojem infekce pro okolní porosty. Jako poslední by se dalo zmínit odplevelování, které je zapotřebí pro snížení vlhkosti vzduchu oproti neodplevelenému porostu a snižuje tak výskyt chorob s houbovými původci. Ačkoliv je možné využití i chemických přípravků, zůstává otázkou, jaká je jejich účinnost, jestliže se aplikují za stavu, když je patogen plně rozvinut. (Prokinová 2003)

3.4.1 Vitavax

Vitavax je kombinované nertuťnaté mořidlo ve formě tekutého dispergovatelného koncentrátu určené k moření kukuřice, ječmene, pšenice, žita, triticales, lnu, hrachu, ovsu, řepky, brambor, bobu obecného a lupiny bílé. Účinné látky v tomto přípravku jsou carboxin což je 5,6-dihydro-2-karboxanilido-3-methyl-1,4-oxathin a thiram, což je tetramethylhiuramdisulfid. Působí jako fungicid se systémovou a kontaktní složkou. Zabraňuje klíčení spor a omezuje růst mycelia houbových patogenů. (Chemtura Europe 2016)

3.4.2 Symetra

Symetra je kombinovaný přípravek se systémovou a kontaktní složkou. Je určen k použití na řepce v období květu. Účinné látky použité v tomto přípravku jsou isopyrazam a atoxystrobin. Isopyrazam má schopnost navázat se na voskovou vrstvu rostliny a také na původce choroby. Přípravek působí na široké spektrum chorob, a i při absenci napadení deklaruje zvýšení výnosu, flexibilitu a rentabilitu. (Syngenta)

3.5 Integrovaná ochrana rostlin

Jedná se o přechod mezi konvenčním zemědělstvím a ekologickým zemědělstvím. Integrovaná ochrana rostlin preferuje použití přirozenější možnosti ochrany rostlin a pokouší se snížit závislost na pesticidech. Stavebním kamenem je stejně jako u konvenčního zemědělství efektivní ochrana plodin před škůdci, plevely a chorobami. Stejně jako u konvenčních systémů je cílem stabilní výnos pěstovaných plodin, odpovídající kvalita dané produkce, ale navíc se pokouší snížit rizika na zdraví a ekosystémy způsobené pesticidy. Pokud tyto body nejsou naplnitelné pomocí využití alternativních metod ochrany rostlin, důležité je odpovědné využití takových pesticidů, které mají vysokou specifitu k daným škodlivým organismům a mají co nejmenší dopady na okolní prostředí. (ÚKZÚZ 2019)

3.5.1 Biologická ochrana rostlin

Termín biologická ochrana byl použit v mnoha různých oborech, nejvýznamněji v entomologii a ochraně rostlin. V ochraně rostlin se tento termín rovná použití mikrobiálních antagonistů stejně jako k použití hostitelsky specifických patogenů pro redukci populací plevelů. V obou oborech je organismus, který potlačuje škůdce či chorobu označován jako agent biologické ochrany. Šířeji byl termín biologická ochrana použit také při použití přírodních produktů extrahovaných či fermentovaných z různých zdrojů. Tyto přípravky mohou být velmi jednoduchou směsí přírodních produktů se specifickou aktivitou nebo komplexní směsí s vícenásobným efektem na hostitele stejně jako na cíleného patogena či škůdce. Ačkoliv tyto přípravky napodobují aktivity žijících organismů, neživé přípravky by měli být správněji označovány jako biopesticidy či biohnojiva v závislosti na primárním benefitu poskytovaném hostitelské rostlině (Cook 1993). V neširším smyslu je biologická ochrana potlačení škodlivých aktivit škodlivého organismu za pomoci jednoho či více jiných organismů, často označovaných za přirozené nepřátele. V užším slova smyslu pojednává termín biologická ochrana o cíleném využití introdukovaných či residentních žijících organismů, jiných než resistantních hostitelských organismů, k regulaci aktivit a populací jednoho či více rostlinných patogenů. V nejužším slova smyslu je biologická ochrana potlačení jednoho patogena pomocí jednoho antagonisty v jedné monokultuře. (Heydari & Pessaraki 2010)

3.5.1.1 Mechanismy biologické ochrany

Jelikož je biologická ochrana výsledkem spousty typů interakcí mezi mikroorganismy, vědci se zaměřili na charakterizaci situací vedoucí k jednotlivým mechanismům (Audenaert et al. 2002; De Meyer & Hofte 1997; Elad & Baker 1985; Heydari et al. 1997; Howell et al. 1988; Islam et al. 2005; Meziane et al. 2005; Ryu et al. 2004; Van Dijk & Nelson 2000). Ve všech případech jsou patogeny antagonizovány přítomností a aktivitou jiných mikroorganismů, se kterými přijdou do styku.

Přímý antagonismus je výsledkem fyzického kontaktu a vysokého stupně selektivity na patogena mechanismu biologického přípravku. Při tomto typu interakce by byl hyperparasitismus obligátními parazity rostlinných patogenů považován za nejpřímější typ tohoto mechanismu, protože není vyžadována aktivita žádného jiného mikroorganismu (Harman et al. 2004). Z druhého konce spektra, nepřímý antagonismus je výsledkem aktivity, která nezahrnuje přímé působení mikroorganismů na rostlinný patogen. Zlepšení a stimulace obranných mechanismů hostitelské rostliny nepatogenními organismy je příklad nejméně přímé formy antagonismu (Kloepper et al. 1980; Lafontaine & Benhania 1996; Leeman et al. 1996; Maurhofer et al. 1994; Silva et al. 2004). Ačkoliv se spousta studií koncentrovala na ustálení důležitosti jednotlivých mechanismů biologické ochrany u různých patologických systémů, všechny popsané mechanismy se pravděpodobně projevují ve všech přírodních a zemědělských ekosystémech.

3.5.1.2 Mycoparasitismus

Při hyperparasitismu je patogen přímo napaden specifickým bioagens, který zabije jeho nebo jeho propagule. Byli identifikované čtyři nejvýznamnější skupiny hyperparazitů – Hypoviry, fakultativní parazité, obligátní bakteriální patogeny a predátoři. Příkladem hypoparazita je virus, který napadá *Cryphonectria parasita*, houbové původce korové nekrózy kaštanovníku, který způsobuje hypovirulenci, redukci patogenocity tohoto patogena. Tento mikroorganismus přispěl k ochraně před korovou nekrózou kaštanovníku na mnoha místech (Milgroom & Cortesi 2004). Interakce viru, houby, stromu a prostředí řídí úspěch či neúspěch hypovirulence.

Jako další byly identifikovány hypoparazité včetně těch, které napadají sclerotii nebo jiné, které napadají houbové hyfy. V některých případech může být jediny houbový patogen napaden několika hyperparasity.

Na rozdíl od hyperparasitismu, mikrobiální predace je více obecná, nspecifická a poskytuje hůře předpověditelnou úroveň biologické ochrany. Někteří bioagens vykazují predační chování v prostředí s omezenými podmínkami výživy. Třeba jako *Trichoderma*, houbový antagonist, který produkuje řadu enzymů, které působí na buněčné stěny houbových parazitů. Když je při kompostování využita čerstvá kůra, *Trichoderma* přímo nenapadá rostlinného patogena *Rhizoctonia solani*. Pokud je však použita rozkládající se kůra, je koncentrace přímo využitelné celulózy snížena, což aktivuje chitinázní geny *Trichodermy* a vede tak k produkci chitinázi k parazitování na *R. Solani* (Benhamou & Chet 1997).

3.5.1.3 Antibióza

Spousta mikroorganismů produkuje a sekreduje sloučeniny s antibiotickou aktivitou (Homma et al. 1989; Howell & Stipanovic 1980; Islam et al. 2005; Leclere et al. 2005; Shahraki et al. 2009; Shanahan et al. 1992; Thomashow et al. 1990; Thomasow & Weller 1988). V obecné definici jsou antibiotika mikrobiální toxiny, které mohou, při nízkých koncentracích, otrávit či zabít jiné mikroorganismy. Bylo dokázáno, že některá antibiotika jsou obzvláště účinná proti rostlinným patogenům a chorobám, které způsobují choroby rostlin (Homma et al. 1989; Howell & Stipanovic 1980; Islam et al. 2005; Shanahan et al. 1992; Thomashow et al. 1990; Thomasow & Weller 1988). Ve všech případech bylo dokázáno, že antibiotika jsou obzvláště efektivní k omezení růstu cílového patogena v in vitro a in situ podmínkách. Účinné antibiotikum musí být produkováno v dostatečném množství blízko patogena. Byla studována in situ produkce antibiotika několika biologickými přípravky (Thomashow et al. 1990). Ačkoliv byli vyvinuty různé procedury k určení kdy a kde budou antibiotika produkována, detekce exprese v místě infekce je velice složitá vzhledem k nerovnoměrnému rozložení mikrobů a potenciálních místech infekce (Thomashow et al. 1990).

V některých případech byla důležitost produkce antibiotik prokázána. Zmutované kmeny neschopné produkce fenazínů (Thomasow & Weller 1988) a fluoroglucinolů (Keel et al. 1989), které byly schopny kolonizace rhizosféry, ale daleko méně schopny potlačit kořenové choroby než přirozené kmeny. Bylo prokázáno, že mnoho bioagens je schopno produkce více antibiotik, které jsou schopny potlačit jednoho či více patogenů (Homma et al. 1989; Howell & Stipanovic 1980; Islam et al. 2005; Shanahan et al. 1992; Thomashow et al. 1990; Thomasow & Weller

1988). Schopnost produkce více antibiotik pravděpodobně vede ke schopnosti potlačit různé mikrobiální kompetitory a rostlinné patogeny.

3.5.1.4 Produkce metabolitů

Mnoho biologických přípravků může produkovat další metabolity, které mohou zasahovat do růstu patogenů. Lytické enzymy jsou jedněmi z těch, které mohou narušit polymerické sloučeniny, například chitin, bílkoviny, celulózu, hemicelulózu a DNA (Anderson et al. 2004; Howell et al. 1988; Loper & Buyer 1991; Ordentlich et al. 1988; Press et al. 2001; Wilhite et al. 2001). Studie prokázaly, že některé z těchto metabolitů jsou schopné vést k přímému potlačení rostlinných patogenů. Například ochrana před *Sclerotium rolfsii* pomocí *Serratia marcescens* byla zprostředkována expresí chitinázy (Ordentlich et al. 1998). Zdá se pravděpodobné, že antagonistické schopnosti těchto metabolitů jsou důsledkem potřeby degradace komplexních polymerů za účelem získání živiny uhlíkem. Mikroorganismy, které projevují preferenci v kolonizování a potlačování rostlinných patogenů mohou být označeny za bioagens. Například *Lysobacter* a *Myxobacteria*, které produkují lytické enzymy se ukázaly jako efektivní proti některým houbovým patogenům rostlin (Bull et al. 2002).

Studie ukázaly, že některé produkty lytické enzymatické aktivity mohou mít nepřímý efekt na rostlinné patogeny. Oligosacharidy odvozené z buněčných stěn byly schopny indukovat obranu u hostitelské rostliny (Howell et al. 1988). Pravděpodobně je efektivita těchto sloučenin závislá na složení a uhlíkových a dusíkových zdrojích půdy a rhizosféry. Při posklizňové ochraně rostlin se jako efektivní ukázalo přidání chitosanu, což je netoxický a organicky rozložitelný polymer beta 1,4-glukosaminu, produkovaného z chitinu alkalinní deacylací, který podporoval mikrobiální degradaci patogenů (Benhamou 2004). Pozměnění substrátu chitosanem vedlo k potlačení kořenové hniloby způsobené *Fusarium oxysporum f. sp. Radicis-lycopersici* u rajčat (Lafontaine & Benhamou 2004).

Některé další produkty mikrobiální aktivity mohou také hrát důležitou roli v biologické ochraně rostlin (Philipps et al. 2004). Například kyanovodík (HCN) efektivně blokuje metabolickou cestu cytochromové oxidasy a je vysoce toxický pro všechny aerobní mikroorganismy už při pikomolárních koncentracích (Ramette et al. 2003). Produkce HCN některými fluorescenčními pseudomonázami se ukazuje jako efektivní proti rostlinným patogenům. Výsledky některých studií ukazují, že *P. fluorescens* CHA0, antagonistická bakterie, produkuje antibiotika jako siderofory a HCN, ale potlačení černé hniloby tabáku způsobené *Thielaviopsis basicola* je efektivní zejména kvůli produkci HCN. Další studie ukazují, že těkavé látky jako amoniak mohou být také využity při biologické ochraně rostlin.

3.5.1.5 Kompetice

Zdroje živin v půdě a rhizosféře jsou často nedostačující pro mikroorganismy. Pro úspěšnou kolonizaci phytosféry a rhizosféry musí mikroorganismus efektivně soutěžit o živiny (Elad & Baker 1985; Keel et al. 1989; Loper & Buyer 1991). Na povrchu rostlin zahrnují hostitelem poskytnuté živiny exudáty, roztoky nebo zestárlá pletiva. Živiny mohou být navíc získávány z odpadních produktů jiných organismů jako hmyzu či z půdy. Existuje obecná představa o tom, že kompetice o živiny mezi patogenními a nepatogenními mikroorganismy je

důležitou složkou ochrany rostlin (Elad & Baker 1985; Keel et al. 1989; Loper & Buyer 1991). Kompetice o živiny je také důležitější u půdních patogenů jako *Fusarium* a *Pythium*, které napadají rostlinu skrz myceliární kontakt, než u patogenů, které napadají rostlinu skrz nadzemní části (Elad & Baker 1985; Keel et al. 1989; Loper & Buyer 1991). Výsledky studií od Andersona a kol. (1988) prokazuje, že produkce rostlinného glykoproteinu agglutininu koreluje s potenciální schopností *Pseudomonas putida* kolonizovat kořenový systém. Mutanti druhu *P. putida* nedisponující touto schopností projevují sníženou schopnost kolonizovat rhizosféru a korespondující schopnosti potlačení fusáriové hniloby u okurek (Tari & Anderson 1988).

Bylo také dokázáno, že nepatogenní mikroorganismy obecně ochraňují rostlinu rychlou kolonizací, a tedy vyčerpáním omezených dostupných substrátů, takže žádné nejsou dostupné pro růst patogenů. Například efektivní katabolismus živin ve spermosféře byl identifikován jako mechanismus přispívající k redukci *Phytium ultimum* mikroorganismem *Enterobacter cloacae* (Van Dijk & Nelson 2000; Kageyama & Nelson 2003). Tyto mikroby také produkují metabolity, které jsou efektivní pro potlačení patogenů. Kolonizují místa s dostupnou vodou a uhlík obsahujícími živinami, jako třeba krčky sekundárních kořenů, poškozené epidermální buňky a nektary a využívají kořenový sliz.

Kompetice o vzácné ale klíčové mikroživiny, jako třeba železo, se také ukázala být důležitým faktorem při biologické ochraně rostlin. Železo je v rhizosféře extrémně vzácné v závislosti na půdním pH. Ve vysoce oxidovaných a provzdušněných půdách se železo vyskytuje ve formě kationtů železitých (Kageyama & Nelson 2003; Shahraki et al. 2009), které jsou nerozpustné ve vodě a jejich koncentrace tak může být extrémně nízká. Tato velice nízká koncentrace není schopná podpořit růst mikroorganismů. Pro přežití v takto extrémních podmínkách mikroorganismy produkují železo vážící ligandy zvané sideriofory, které mají vysokou schopnost získat železo z dalších mikroorganismů (Shahraki et al. 2009). Téměř všechny mikroorganismy produkují sideriofory katecholového nebo hydroxamátového typu (Kageyama & Nelson 2003).

3.6 Biologické přípravky na bázi mikroorganismů

Za biologické přípravky se dají komerčně označit takové výrobky, které obsahují živé organismy (či viry) a aktivně či pasivně působí proti patogenickému organismu nebo stimulují růst a vývoj rostlin. Mezi efekty působení nemusí spadat přímý kontakt s patogenem, může se jednat například o stimulaci hostitelské rostliny a tím vyvolanou vyšší odolnost vůči patogenu. Mezi biologické přípravky na bázi organismů se považují takové, kde většinou složku tvoří bakterie, houby nebo viry. Většina takovýchto produktů obsahuje více mikroorganismů se společným či podobným efektem. (Helyer et al. 2014)

3.6.1 Přípravky použité v rámci předložené bakalářské práce

3.6.1.1 Serenade ASO

V tomto biologickém přípravku je obsažen kmen bakterií *Bacillus subtilis*. Tento kolonizuje kořenový systém a díky čerpání kořenových exudátů vytváří konkurenční prostředí omezující vstup případných fytopatogenních organismů do kořenů rostlin. Dále také napomáhá

rozkladu organických látek v půdě a napomáhá lepšímu růstu ošetřených rostlin. Proti houbovým chorobám však působí také aktivně, a to produkcí lipopeptidů, které narušují buněčné membrány a způsobují kompletní destrukci buněk. (Bayer 2017)

3.6.1.2 Polyversum

Účinnou bioagens obsaženou v tomto přípravku je řasovka *Pythium oligandrum*. Tento mikroorganismus je schopen pronikat do buněk patogenních hub a čerpá z nich potřebné látky. Jedná se tak tedy o mycoparasitismus a navrch produkuje enzymy, které redukují další šíření a výskyt patogena. (Bio Agens Research and Development 2019)

3.6.1.3 Gliorex

Gliorex je biologický přípravek obsahující spóry hub rodu *Clonostachys* a *Trichoderma*, které se přirozeně vyskytují v půdě a rostlinných zbytcích a podílejí se na saprofytických procesech v nich. Spóry těchto bioagens vyklíčí a mycelium se rozrůstá v rhizosféře plodiny a díky kompetici brání vstupu patogenních hub. Napomáhá rozkladu organických zbytků a tím zvyšuje jejich příjem rostlinou. Jakožto mykoparazit také může pomocí rozkladu buněčných stěn redukovat fytopatogenní houby v půdě (např. *Rhizoctonia solanii*; *Sclerotinia sclerotiorum*; *Botrytis cinerea*; *Bipolaris sorokiniana*...). (Fytovita 2015)

3.6.1.4 Hirundo

Přípravek Hirundo je registrovaný v kategorii hnojiv a je aplikován do porostů řepky olejky. Jako účinný bioagens se zde nachází buňky bakterií rodu *Bacillus* v tekutém médiu.

Díky produkci fytoalexinů je přípravek schopen aktivně cílit na patogenní organismy nalézající se v půdě a pasivně také napomáhá odolnosti díky stimulaci růstu. Tento princip je založen na volné symbióze mezi bioagens a rostlinou. Jedná se o oboustranně prospěšný vztah podporující růst rostliny. Bakterie chrání kořeny rostlin před patogenními organismy jejich rychlou kolonizací a pomáhá tak potlačovat houbové choroby vyskytující se v půdě. Podle polních pokusů se prokázalo, že výskyt patogenních hub (*Sclerotinia*, *Phoma lingam*, *Verticillium* a *Botrytis cinerea*) je prokazatelně nižší než u neošetřených variant.

Díky mineralizaci organické hmoty a zvýšení přístupnosti živin rostlinám také přípravek aktivně napomáhá k lepšímu růstu, což vede k následnému zvýšení výnosu. Přípravek se hodí k použití v půdách s vyšším obsahem organických látek, půdách neutrálních a slabě zásaditých a je možné ho aplikovat jak v podzimním, tak v jarním termínu. (Monas technology 2019)

3.6.1.5 Clonoplus

Přípravek Clonoplus obsahuje spóry kmenů hub rodu *Clonostachys*. Tyto kmeny byly vybrány vzhledem k jejich prospěšnému působení na rostliny. Jedná se o houby přirozeně se vyskytující v půdě, které napomáhají rozkládání organických zbytků a napomáhají tak zvýšenému příjmu těchto živin rostlinami. Dále také působí aktivně proti patogenním houbám (např. *Rhizoctonia solanii*; *Sclerotinia sclerotiorum*; *Botrytis cinerea*; *Bipolaris sorokiniana*;

Verticillium dahliae; některé druhy fusarií ...), jejichž zárodky roskládají a chrání před nimi pěstované plodiny. (Fytovita 2015)

3.6.1.6 Prometheus

Jedná se o biologický přípravek, jehož možné použití je v porostech (*Brassica napus*), máku (*Papaver somniferum*) a slunečnice (*Helianthus annuus*). Bioagens je v tomto produktu tvořeno bakteriemi rodu *Pseudomonas* v tekutém médiu.

Přípravek aktivně chrání rostliny před houbovými patogeny přirozeně se vyskytujícími v půdě. Účinek je založen na volné symbióze bakterií s rostlinami. Bakterie aktivně chrání kořeny rostlin před škodlivými organismy za pomoci kompetice a produkce látek zabraňujících růstu houbových patogenů. Bakterie jsou schopny udržovat v odstupu běžné patogeny (*Sclerotinia*, *Phoma lingam*, *Verticillium* a *Botrytis cinerea*) a jsou tak schopny zabránit jejich vstupu do rostlin. Jak polní pokusy, tak provozní podmínky dokázaly, že je zásadně potlačen výskyt primárních infekcí těchto patogenů. Dále je schopná inhibovat životnost sklerocií.

Díky mineralizaci a zpřístupňování živin z půdy tak přípravek pomáhá jejich příjmu rostlinami a zvyšuje tak výnos a olejnatost semen.

Díky metabolické aktivitě bioagens je přípravek Prometheus schopen zvyšovat pH půdy, což napomáhá lepšímu růstu a vývoji plodin a jejich odolnosti vůči chorobám. Změna pH závisí na původní kyselosti půdy, kdy v kyselejších půdách dochází k výraznějšímu navýšení pH než u půd spíše neutrálních. V řepkových porostech došlo k průměrnému nárůstu pH o 0.4 stupně.

Díky spolupráci s Vysokou školou chemicko-technologickou se také prokázalo, že tento přípravek je schopen odbourávání reziduí pesticidů v půdě. (Monas technology 2019)

4 Metodika

4.1 Skleníkové pokusy

Praktické pokusy provedené na odrůdě řepky ozimé Inspiration byly založeny 15. 4. 2018 v prostorech pokusných a demonstračních skleníků ČZU. Pomocí namáčení kořínků v suspenzi spor (8×10^7 spor v 1 ml) byly týden staré rostliny inokulovány patogenem *V. longisporum*. Biologické přípravky byly aplikovány ve formě postřiku, a to dle doporučeného dávkování výrobce v doporučené koncentraci. Pro kontrolu nebyly využity pouze rostliny inokulovány *V. longisporum*, ale i rostliny, na kterých inokulace sporama patogenu neproběhla.



Obrázek 2 – Skleníkový pokus

4.1.1 Použitý materiál

Odrůda řepky ozimé

Při skleníkových pokusech bylo využito odrůdy řepky Inspiration, která nemá deklarovanou rezistenci k patogenu *V. longisporum*.

Biologické přípravky

Bylo využito biologických přípravků na bázi bakterií a hub: Prometheus (*Pseudomonas sp.*), Hirundo (*Bacillus sp.*), Serenade (*Bacillus subtilis*), Gliorex (*Clonostachys sp. a Trichoderma sp.*), Polyversum (*Pythium oligandrum*) a Clonoplus (*Clonostachys sp.*)

Kultivace patogena *Verticillium longisporum*

V laboratorních podmínkách byla připravena suspenze spor.

Pro přípravu houbových patogenních kultur byly použity výřezy z agaru porostlého patogenem *V. longisporum*, které byly převedeny do 150 ml PDA broth (tekuté živné médium), a po dobu jednoho týdne ponechány při 23 °C za neustálého míchání. Po sedmidenní inkubaci bylo mycelium přefiltrováno přes síto, a tak byla získána suspenze spor (8×10^7 spor v 1 ml.) (Eynck 2008)

4.1.2 Design experimentu

Při skleníkových pokusech byl po dobu 4 týdnů od ošetření sledován a hodnocen zdravotní stav rostlin (pomocí uvedené stupnice viz tab. č. 1) ošetřených jednotlivým biologickými přípravky (3 opakování po 16 rostlinách – randomizované rozdělení).

4.1.3 Hodnocení experimentu

Při hodnocení zdravotního stavu řepky ozimé odrůdy Inspiration, které byly založeny 15. 4. 2018 v prostorech pokusných a demonstračních skleníků ČZU bylo využito hodnocení popsané v následující tabulce. Výsledky byly zpracovány v programu MS Excel.

Stupeň hodnocení	Symptomy
1	Bez symptomů
2	Žloutnutí nejstarších listů
3	Slabé symptomy na mladých listech
4	Méně jak 50 % listů má symptomy
5	Více jak 50 % listů má symptomy
6	Méně jak 50 % listů je mrtvých
7	Více jak 50 % listů je mrtvých
8	Pouze vzrostný vrchol je živý
9	Mrtvá rostlina

Tabulka 1 – Stupně zdravotního stavu viz Eynck 2008

Během konečného hodnocení po uplynutí 4 týdnů byla kromě zdravotního stavu zjišťována i výška rostlin od kořenového krčku k nejdelšímu listu a tloušťka kořenových krčků.

4.2 Laboratorní diagnostika

Byly shromážděny stonky po ukončení vegetace v roce 2018. Vzorby byly rozřazeny do 3 skupin podle současné polní diagnostiky (hrnatý stonek, černé léze v pletivu v oblasti kořenového krčku a kořene). Skupina 1 obsahovala nejméně napadené vzorky, skupina 3 vzorky napadené nejvíce. Vzorby pocházely z poloprovozních pokusů na území České a Slovenské republiky (viz Tabulka 2).

Vzorby byly zamraženy na - 80 °C a následně lyofilizovány.

Bylo hodnoceno 30 vzorků ze 3 skupin dle vizuálních příznaků, část vzorků byla pro velký objem materiálu hodnocena jako směsné vzorky.

Číslo vzorku	Skupina	Počet stonků
1	1	1
2	1	1
3	1	1
4	1	1
5	1	1
6	1	5
7	1	5
8	1	4
9	2	1
10	2	1
11	2	1
12	2	1
13	2	1
14	2	5
15	2	5
16	2	4
17	2	4
18	2	4
19	3	1
20	3	1
21	3	1
22	3	1
23	3	1
24	3	1
25	3	5
26	3	5
27	3	5
28	3	5
29	3	5
30	3	5

Tabulka 2 – Vzorky pro laboratorní diagnostiku

4.2.1 Izolace celkové DNA

Pro izolaci DNA byly využity dvě metody: CTAB a Extrakce DNA

4.2.1.1 Izolace celkové DNA pomocí CTAB

1. Biologický materiál (kořeny řepky) byly důkladně omyty pod tekoucí vodou a následně rozdrceny ve třecí misce pomocí tekutého dusíku na drobný prášek, který byl převeden pomocí sterilní špachtle do mikrozkušavky (navážka 100 mg). Mikrozkušavka byla umístěna do tekutého dusíku a následně buď uskladněna v mrazicím boxu (-70 °C) nebo ihned použita pro izolaci totální DNA.

2. Ke vzorku byly přidány tři drtící koule (o průměru 3 mm) a 100 µl CTAB pufru (těsně před použitím byl do pufru přidán 2-merkaptetanol v poměru 1ml/1,56 µl).

3. Vzorek byl homogenizován pomocí oscilačního mlýna po dobu 1,5 min. rychlostí 30 kmitů za sekundu. Poté bylo do mikrozkušavky přidáno 400 µl CTAB pufru a vzorek byl po dobu 2 min. třepán stejnou rychlostí.

4. Poté bylo do mikrozkušavky přidáno 400 µl CTAB pufru a vzorek byl inkubován 1h. při 64 °C.

5. Ke vzorku bylo přidáno 900 µl 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 mikrozkušavky 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 mikrozkušavky a ke směsi bylo přidáno stejné objemové množství chloroform-izoamylalkoholu (24:1). Vzorek byl třepán (2200 RPM, 10 min.), poté centrifugován (7000xg, 10 min.).

8. Vodní fáze byla převedena do nové mikrozkušavky, 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 3x3 min. v tekutém dusíku.

9. Poté byl vzorek centrifugován (10 000xg, 10 min.) a vodní fáze byla odstraněna. Peleta byla promyta v 70 % chlazeném etanolu a centrifugována (10 000xg, 10 min.).

10. Po odstranění vodní fáze byla mikrozkušavka ponechána při laboratorní teplotě inkubovat 10 min. Peleta byla rozpuštěna v 50 µl TE pufru a vzorek byl uskladněn v mrazicím boxu (-28 °C) či hned použit pro další analýzy.

Roztoky použité při extrakci

CTAB pufr

2% CTAB (cetyltrimetylamonium bromid)

0,1 M Tris (pH 8,0)

20 mM EDTA

0,7 M NaCl

2-merkaptoetanol

Fenol pH 8,0

Roztok fenol (pH 8,0) : **chloroform-asoamylalkohol** (1:1)

Chloroform-isoamylalkohol (24:1)

Isopropanol

70 % ethanol

TE pufr (pH 8,0)

10 mM Tris

1 mM EDTA

ddH₂O

4.2.1.2 Extrakce DNA (Brandfass,2004)

1. Navážit 50 mg vzorku, rozemlít na jemný prášek (např. v tekutém N) a převést do 2 ml zkumavek
2. Přidat 1 ml CTAB bufferu - 1 μ l Proneinázy K a promíchat (vortex)
3. Inkubovat vzorek po dobu 5 sekund v ultrazvukové čističce
4. Inkubovat po dobu 10 minut při 42 °C
5. Inkubovat po dobu 10 minut při 65 °C, dvakrát až třikrát promíchat
6. Přidat 800 μ l Chloroform/isoamylalkoholu (24:1) a promíchat (vortex)
7. Inkubovat po dobu 10 minut na ledu
8. Centrifugovat po dobu 10 minut při 13000 rpm
9. Připravit 1,5 ml Eppendorfovy zkumavky s 200 μ l PEG (30%, Polyethylenglycol PEG 6000 ve vodě) a 100 μ l 5M NaCl
10. Převést 600 μ l supernatantu po centrifugaci do zkumavek s PEG a promíchat (vortex)
11. Centrifugovat po dobu 15 minut (maximální rpm) při pokojové teplotě pro peletování DNA
12. Opatrně odstranit supernatant pro uchování DNA pelet
13. Přidat 600 μ l EtOH (70%) pro očištění DNA pelet
14. Centrifugovat po dobu 5 minut (maximální rpm)
15. Opatrně odstranit EtOH (pipetováním)
16. Vysušit peletu v koncentrátoru po dobu 10 minut při 30 °C
17. Rozpustit peletu v 100 μ l TE (1x), inkubovat aspoň po dobu 30 minut, nemíchat
18. Uložit vzorky při -20 °C

Roztoky

CTAB buffer

Proteináza K

Živné médium 20 mg/ml v TE bufferu, zředit 1:10 s TE před použitím

TE Buffer

10 mM TE, 1 mM EDTA, pH 8,0

Merkaptoethanol

Další roztoky

5 M NaCl

70% EtOH

Chloroform/isoamylalkohol 24:1

30% PEG 6000 (Polyethylenglykol) v H₂O

4.2.2 PCR (Debode et al. 2011)

Název	Směr	Cíl	Sekvence (5' → 3')	Velikost produktu PCR
VITubF2 ^a	Popředu	β-tubulin	GCAAAACCCTACCGGGTTATG	142 bp
VITubR1 ^a	Pozpátku	β-tubulin	AGATATCCATCGGACTGTTCGTA	142 bp

Tabulka 3 – Použité primery vit Debode et al. 2011

Reakční směs (25μM):

18,8 μl ddH₂O

2,5 μl bufferu pro Taq polymerázu

0,5 μl dNTP (25 mM/10 mM)

0,5 μl primeru R

0,5 μl primeru F

0,2 μl Taq polymerázy (5U/ μl)

2 μl templátové DNA

Program:

Aktivační krok 15 minut při 95 °C následován 40 cykly po 10 sekundách při 95 °C, 15 sekundách při 60 °C a 15 sekundách při 72 °C. Konečná elongace po dobu 15 sekund při 72 °C.

4.2.3 Gelová elektroforéza

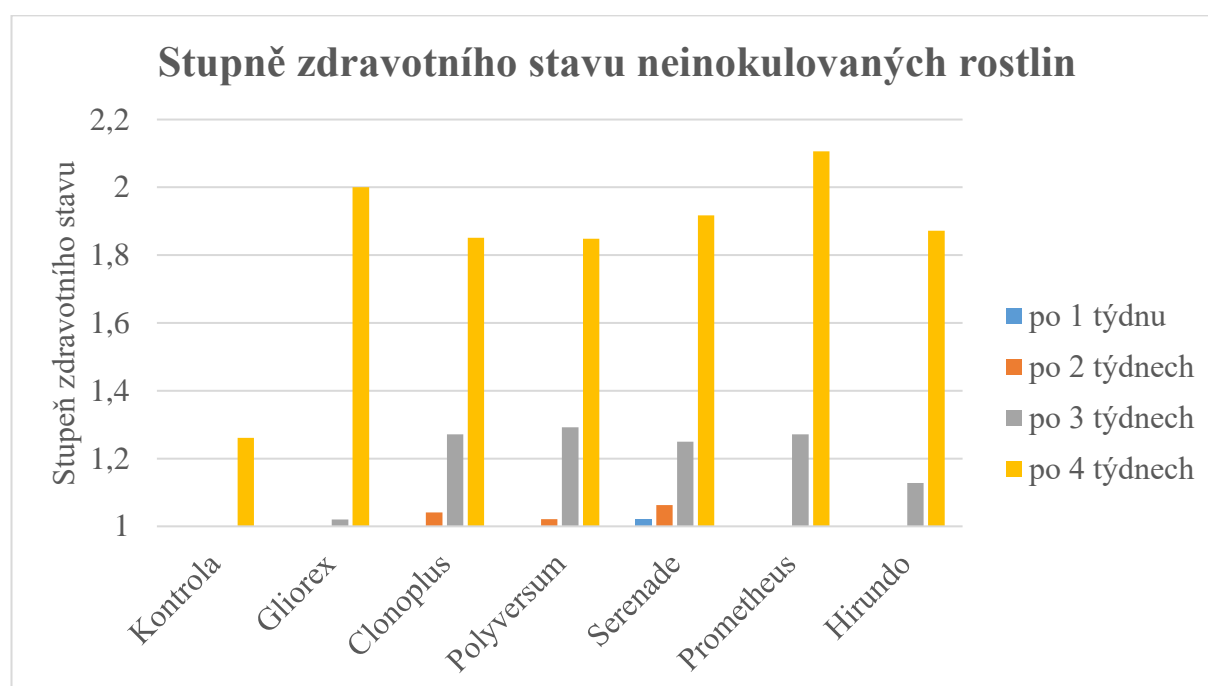
Byl připraven roztok z 1,5 % agarózy v TBE1x pufru. Roztok byl převeden do Erlenmayerovy baňky, promíchán a v mikrovlnné troubě rozvařen. Poté zchlazen. Do směsi byla přidána polovina objemu zásobního roztoku etidiumbromidu v μl (do 100 ml objemu gelu bude přidáno 50 μl zásobního roztoku etidiumbromidu). Vše bylo promícháno a poté byl obsah baňky nalit do vaničky. Zasunutím hřebíků do tekuté agarózy bylo umožněno vytvoření jamek pro nanášení jednotlivých vzorků. 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 100 V.

5 Výsledky

5.1 Skleníkové pokusy

Skleníkové byly založeny 15. 4. 2018 v prostorech pokusných a demonstračních skleníků ČZU. Zdravotní stav rostlin byl postupně hodnocen v týdenních intervalech a při termínu posledního hodnocení bylo také provedeno měření délky rostlin a šířky kořenového krčku.

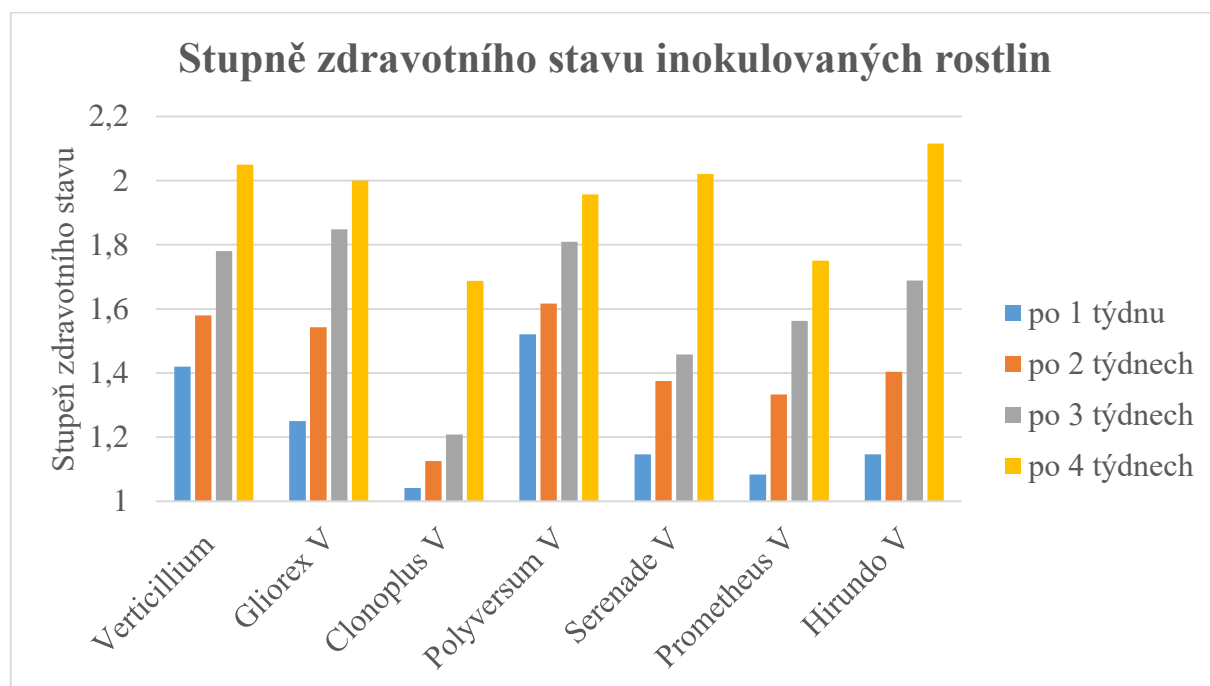
5.1.1 Stupně zdravotního stavu neinokulovaných rostlin



Graf 1 – Stupně zdravotního stavu neinokulovaných rostlin

Výsledky této části pokusu by mohly napovídat, že případná aplikace biologických přípravků by mohla zhoršovat zdravotní stav rostlin. Jelikož však většina bioagens obsažených v těchto přípravcích pochází z říše hub, případně z domény bakterií, jedná se o přirozený biologický proces. Vzhledem k tomu, že je tato stupnice sestavena k hodnocení rostlin napadených *V. longisporum*, nedá se předpokládat, že by reálně odpovídala u jiných přípravků škodám patogenem způsobeným. Mikroorganismy a nosiče, na kterých jsou v přípravcích navázány, mají také určitý, prozatím nezhodnocený, vliv na zdravotní stav rostlin. V poslední řadě se na zdravotním stavu rostlin podepsaly limitované podmínky skleníků ČZU, které byly bohužel neovlivnitelné. V čase posledního hodnocení byly rostliny řepky přerostlé, což vedlo k tak výraznému zhoršení zdravotního stavu oproti předchozím týdnům.

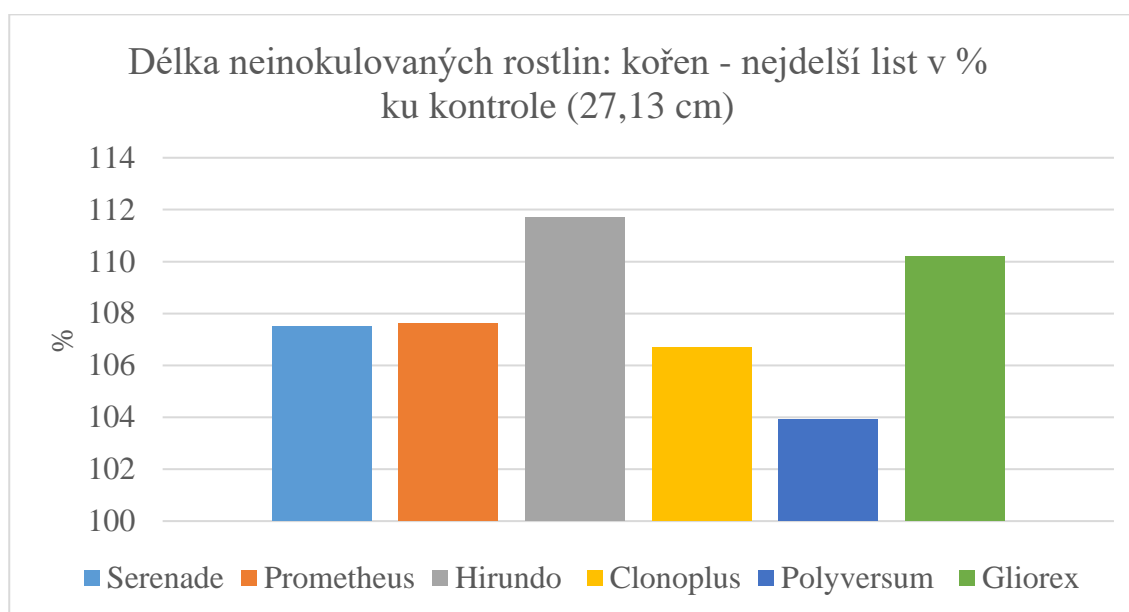
5.1.2 Stupně zdravotního stavu inokulovaných rostlin



Graf 2 – Stupně zdravotního stavu inokulovaných rostlin

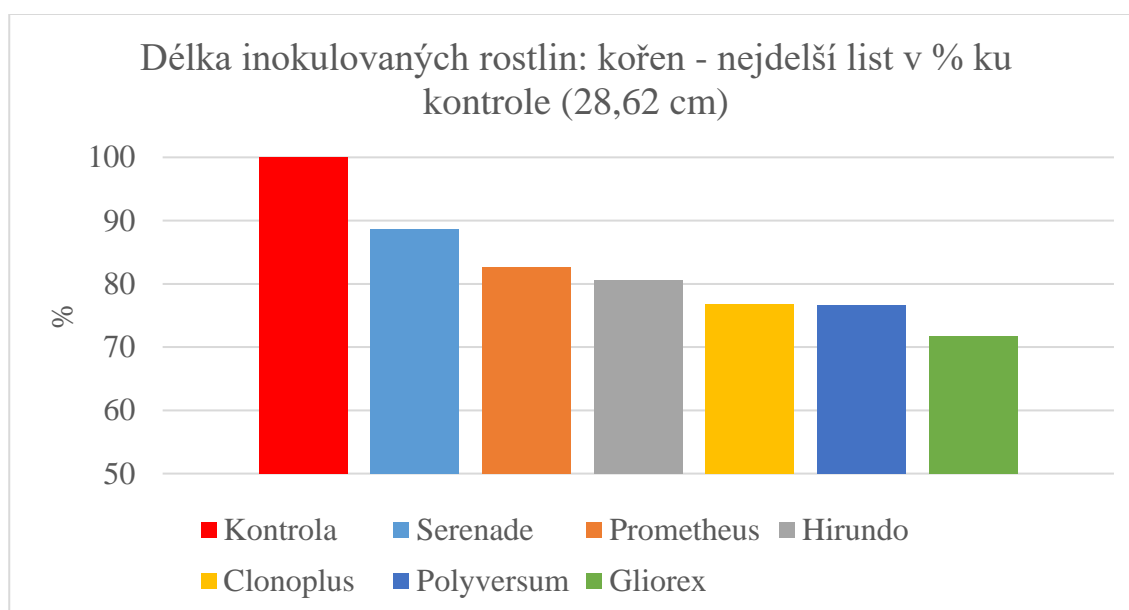
Ve zjištěných výsledcích jde ve většině případů pozorovat jisté zákonitosti. Zlepšený zdravotní stav v prvních týdnech hodnocení napovídá, že biologické přípravky zpomalily vstup patogena do kořenového systému rostlin. Toto by odpovídalo procesu kompetice, kdy je patogenní organismus nucen soutěžit o živiny s bioagens obsažených v přípravcích a jeho vývoj je tak značně zpomalen. Kořeny rostlin byly důkladně infikovány a pokud se patogenní organismus dostal do vnitřních pletiv rostliny, vyrovnává po čase rozdíl oproti neošetřené kontrole a dostává se do srovnatelných hodnot. Z tohoto hlediska dosáhly nejlepších výsledků přípravky Clonoplus a Prometheus. U všech variant je však oproti výsledkům z neinokulovaných rostlin vidět postupné, přibližně lineární zhoršování zdravotního stavu a z tohoto pohledu se žádný z použitých přípravků oproti ostatním neliší.

5.1.3 Délka rostlin



Graf 3 – Délka neinokulovaných rostlin

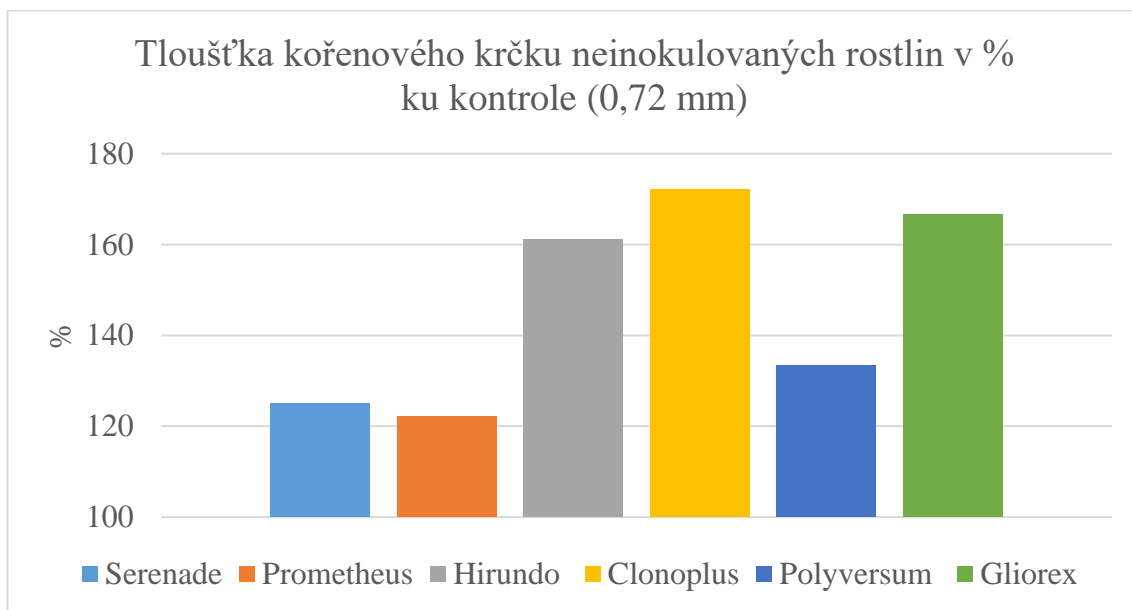
Vzhledem k tomu, že primárním účelem aplikovaných biopreparátů je podpora růstu ošetřených rostlin, není překvapující, že všechny neinokulované varianty ošetřené biologickými přípravky svým průměrem převyšují neinokulovanou kontrolu. Lze tedy tvrdit, že aplikované biologické přípravky zvyšují délku rostlin řepky. Nejlépe v tomto hodnocení dopadly přípravky Hirundo a Gliorex.



Graf 4 – Délka inokulovaných rostlin

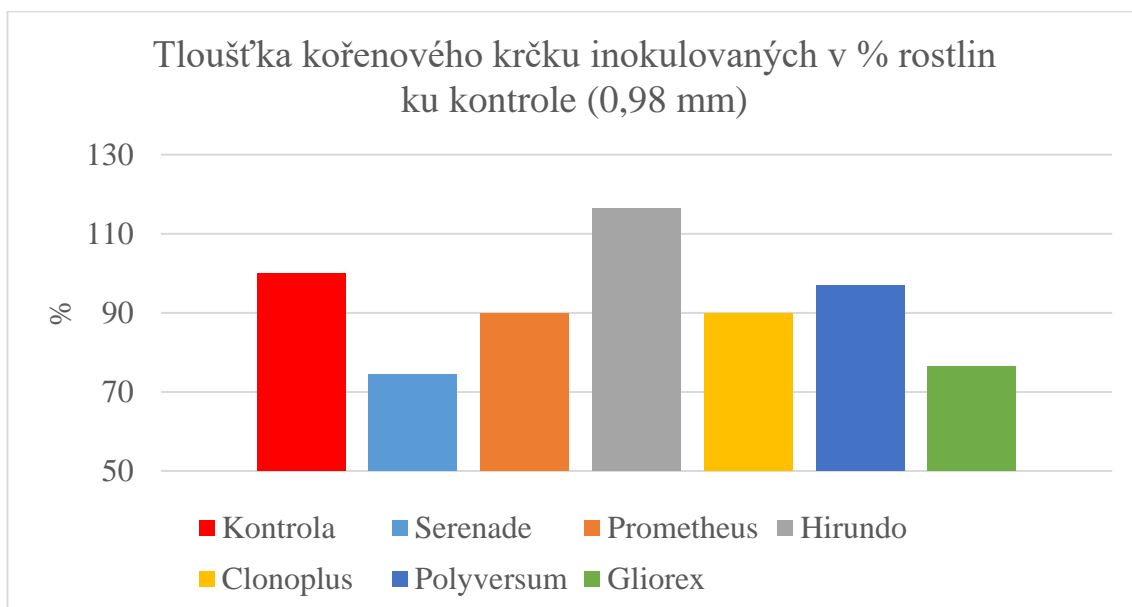
Nejvyšší průměr délky rostlin měla v této variantě inokulovaná kontrola. Z velké části se to dá přisuzovat efektu, kdy rostlina svůj zhoršený zdravotní stav kompenzuje nadměrným růstem. U všech přípravků lze sledovat stejný trend snížení průměrné délky rostlin. V případě délky inokulovaných rostlin je však rozptyl výrazně vyšší než u rostlin neinokulovaných.

5.1.4 Tloušťka kořenového krčku



Graf 5 – Tloušťka kořenového krčku neinokulovaných rostlin

Výsledky měření šířky kořenového krčku neinokulovaných rostlin z velké části odpovídají měřením délky neinokulovaných rostlin. Také v tomto případě všechny rostliny ošetřené biologickými přípravky dosáhly v průměru vyšších hodnot než neinokulovaná kontrola. Průměrná šířka kořenového krčku koreluje s průměrnou délkou rostliny. Výjimkou je v tomto část rostlin ošetřená přípravkem Clonoplus, která zde dosáhla nejlepšího výsledku, ačkoliv se v měření délky rostlin pohybovala spíše na průměrných hodnotách.



Graf 6 – Tloušťka kořenového krčku inokulovaných rostlin

Stejně jako u délky rostlin inokulovaných variant většina rostlin ošetřená biologickými přípravky nedosáhla vyšší průměrné hodnoty než inokulovaná kontrola. Výjimkou je v tomto

případě skupina rostlin ošetřena přípravkem Hirundo, která výrazně předčila všechny ostatní hodnocené varianty rostlin ošetřených biologickými přípravky.

5.3 Laboratorní diagnostika

Laboratorní diagnostika byla využita pro hodnocení 30 vzorků shromážděných po konci vegetace v roce 2018, které pocházely z poloprovozních pokusů na území České a Slovenské republiky.

5.3.1 Izolace celkové DNA

Pro správné proběhnutí reakce PCR při měření čistoty izolované DNA je podstatné, aby se množství DNA pohybovalo v optimu.

Ideálními hodnotami při poměru absorbancí 260/280 jsou hodnoty mezi 1,7 a 1,9.

1. Vzorek	260/280 CTAB	260/280 Extrakce DNA
1	1,76	2,62
2	1,68	2,53
3	1,89	2,41
4	1,87	2,12
5	1,83	2,53
6	1,76	2,23
7	1,91	0,49
8	1,72	2,21
9	1,87	1,61
10	1,87	2,41
11	1,74	1,69
12	1,78	2,08
13	1,82	2,3
14	1,79	2,28
15	1,92	2,28
16	1,83	2,66
17	1,8	2,07
18	1,77	2,43
19	1,87	2,94
20	1,75	2,23
21	1,89	2,27
22	1,76	2,31
23	1,81	2,86
24	1,83	1,73
25	1,87	2,42
26	1,78	2,01
27	1,76	1,48
28	1,92	3,06
29	1,67	2,49
30	1,82	2,21

Tabulka 4 – Výsledky izolace celkové DNA

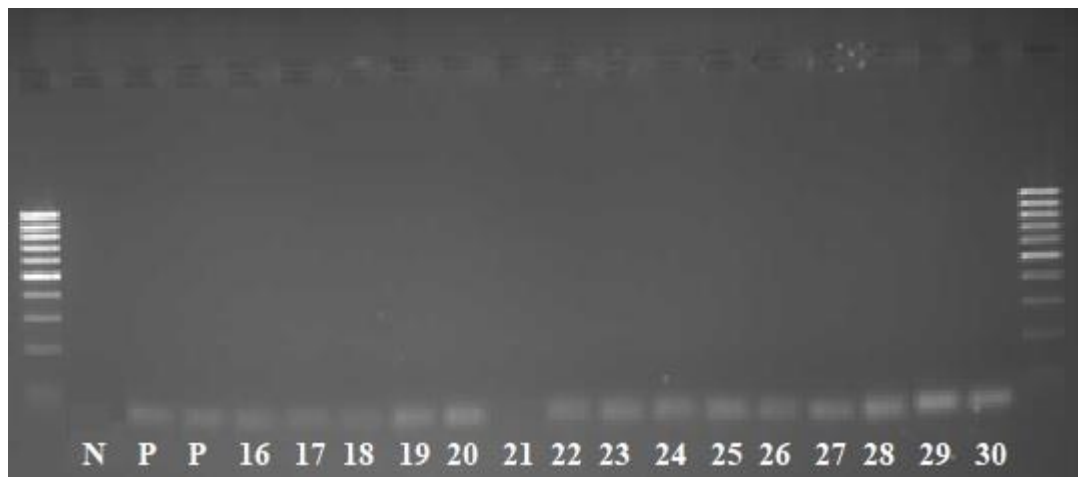
Z výsledků metody CTAB je patrné, že metoda se jeví jako vhodná pro izolaci z lyofilizovaných vzorků. Naopak z výsledků metody Extrakce DNA dle Brandfass 2004 vyplývá, že se nejedná o vhodnou metodu pro izolaci z lyofilizovaných stonků (viz Tabulka 4).

5.3.2 Gelová elektroforéza

Z vyizolovaných vzorků pomocí metody CTAB byla zjištěna přítomnost patogenu *V. longisporum*.



Obrázek 3 – Výsledky Gelové elektroforézy, vzorky 1-15



Obrázek 4 – Výsledky Gelové elektroforézy, vzorky 16-30

Negativní kontrola byla negativní v obou případech a obě pozitivní kontroly pozitivní, tím pádem proběhl program PCR v pořádku a gelová elektroforéza byla úspěšná. Bez ohledu na rozřazení do jednotlivých skupin podle současných metod polní diagnostiky jsou všechny vzorky pozitivní kromě vzorků číslo 4 (ze skupiny 1) a číslo 21 (ze skupiny 3). Výsledky gelové elektroforézy tedy neodpovídají hodnocením současné polní diagnostiky.

6 Diskuze

Biologická ochrana rostlin se stává čím dál tím důležitější strategií v rámci integrované ochrany rostlin. Je považována za účinnou alternativní metodu ochrany rostlin. Biologická ochrana je šetrná k životnímu prostředí a v některých případech se jedná o jedinou možnost, jak ochránit plodiny proti patogenním organismům (Cook 1993)

Rostlinnému patogenu *Verticillium longisporum* je věnováno čím dál více pozornosti a z hlediska možných škod působených na rostlinách řepky olejky (Depotter et al. 2016; Dunker et al. 2008). Vzhledem k náročnosti detekce tohoto patogena (Novakazi et al. 2015) je třeba věnovat se možným metodám jeho diagnostiky a zhodnotit stávající postupy sloužící k detekci patogenu *Verticillium longisporum*. Vzhledem k nedostatečné chemické ochraně je přistupováno k metodám integrované ochrany rostlin, a to zejména biologické ochraně rostlin (Marín et al. 2018).

Pseudomonády produkující DAPG navozují obranu hostitele. (Kloepper et al. 1980; Lafontaine & Benhaniu 1996; Leeman et al. 1995; Maurhofer et al. 1994; Silva et al. 2004). Nadále mají schopnost agresivně kolonizovat rhizosféru, což napomáhá jejich schopnosti redukovat výskyt půdních patogenních organismů pomocí kompetice o organické živiny (Heydari & Pessarakli 2010)

V práci byl využit přípravek Prometheus, který obsahuje rod bakterií *Pseudomonas*. Přípravek Prometheus prokazatelně zpomaluje vývoj patogenu *V. longisporum* a podporuje růst rostlin. Po finálním hodnocení zdravotního stavu rostlin navíc dosáhl jednoho z nejlepších výsledků.

V Kontextu biologické ochrany rostlinných chorob byly zkoumány 3 typy lipopeptidů produkovaných rodem *Bacillus* pro jejich antagonistickou aktivitu proti široké škále fytopatogenů, včetně bakterií, hub a kvasinek. Těmito látkami jsou Surfactiny, Ituriny a Fengyciny. Poslední studie prokázaly, že tyto lipopeptidy také mají vliv na fitness mikroorganismů produkujících tyto látky z hlediska kolonizace rhizosféry. Také hrají klíčovou roli při stimulaci obranných mechanismů ošetřené rostliny. (Ongena & Jacques 2008)

Rod *Bacillus* byl v této práci zastoupen přípravkem Hirundo, který dosáhl velice dobrých výsledků při měření délky rostlin a šířky kořenového krčku. Tento přípravek také prokazatelně zpomaluje vývoj patogena *V. longisporum*, při konečném měření zdravotního stavu však dosáhl nejhorších výsledků. Druhým přípravkem s rodem *Bacillus* byl přípravek Serenade, který dosáhl z hlediska podpory růstu spíše průměrných výsledků a stejně si vedl i u hodnocení stupně zdravotního stavu.

Pythium oligandrum je parazit patogenního organismu *Verticillium dahliae* schopný snížit jeho schopnost růstu a tvorby mikrosclerotií. Byly prokázány rozdíly v parazitismu u různých izolátů *P. oligandrum* a schopnost jim odolávat u izolátů *V. dahliae*. Teplota a matricový potenciál měly velký vliv na interakci mezi houbami. Populace *P. oligandrum* byly podobné u inokulovaných i neinokulovaných variant *V. dahliae*, ale populace *V. dahliae* v půdě při pěstování *Capsicum annuum* byla výrazně nižší při přítomnosti *P. oligandrum*. Při

skleníkových pokusech byla váha nadzemních částí rostlin výrazně vyšší u ošetřených variant. U neinokulovaných rostlin dosáhly nadzemní části ošetřené *P. oligandrum* až o polovinu vyšších hmotností. (AL-Rawahi & Hancock 2007)

Účinné bioagens *Pythium oligandrum* bylo ve skleníkových pokusech obsaženo v biologickém přípravku Polyversum. Z hlediska podpory růstu rostlin a šířky kořenového krčku dosahoval tento přípravek podprůměrných výsledků. Bohužel ani při hodnocení zdravotního stavu nedosáhl tento mikroorganismus předpokládaných výsledků, kdy na rozdíl od ostatních přípravků spíše podpořil vývoj patogenního organismu *V. longisporum*.

Clonostachys rosea BAFC3874 se prokázal být efektivním antagonistou agresivního půdního patogenu *S. sclerotiorum* ve skleníkových experimentech. Hlavními mechanismy biologické ochrany jsou v tomto případě produkce metabolitů a mycoparasitická aktivita (Rodríguez et al. 2011)

Přípravek Clonoplus obsahující rod *Clonostachys* byl použit ve skleníkových pokusech určených k hodnocení zdravotního stavu rostlin inokulovaných *V. longisporum* a podpoře růstu rostlin *Brassica napus* var. *Napus*. V případě podpory růstu rostlin se tento přípravek projevil jako průměrný, ovšem výrazně podporoval zvýšení šířky kořenového krčku. U hodnocení zdravotního stavu rostlin se dá Clonoplus hodnotit jako nejúspěšnější ze všech použitých přípravků. Z výsledků je patrné, že přípravek výrazně zpomalil vývoj patogenního organismu, a i při finálním měření dosáhl nadprůměrných výsledků. Druhým přípravkem s rodem *Clonostachys* byl biologický přípravek Gliorex, který výrazně podpořil délku rostlin a šířku kořenového krčku u neinokulovaných rostlin, ale zdravotní stav nebyl výrazně odlišný od rostlin pouze inokulovaných patogenem *V. longisporum*.

7 Závěr

Byla vyzkoušena a zhodnocena účinnost biologických přípravků na zdravotní stav rostlin řepky ozimé, které byly infikované patogenem *Verticillium longisporum*.

Byly otestovány tyto přípravky: Prometheus (*Pseudomonas* sp.), Hirundo (*Bacillus* sp.), Serenade (*Bacillus subtilis*), Gliorex (*Clonostachys* sp. a *Trichoderma* sp.), Polyversum (*Pythium oligandrum*) a Clonoplus (*Clonostachys* sp.) a porovnána jejich účinnost.

Pomocí diagnostické metody PCR bylo vyhodnoceno, že současná polní diagnostika zcela neodpovídá reálnému stavu přítomnosti patogenu *Verticillium longisporum* v porostu.

Bylo izolováno 30 vzorků, které byly zpracovány dvěma metodami. Metoda extrakce dle byla vyhodnocena jako nedostačující, pro další analýzy se doporučuje extrakce metodou CTAB.

Hypotéza, že by některé biologické přípravky vykazovaly účinnost proti patogennímu organismu *V. longisporum* na kořenech řepky ozimé nebyla potvrzena, ale některé biologické přípravky prokazatelně zpomalují vývoj patogenu *Verticillium longisporum* a podporují růst rostlin.

8 Literatura

- Agromanuál. 2016. Odrůdy ozimé řepky na českém trhu v roce 2016. Dostupné z <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/osivo-a-sadba-1/odrudy-ozime-repky-na-ceskem-trhu-v-roce-2016> (cit. duben 2019)
- AL-Rawahi AK, Hancock JG. 2007. Parasitism and Biological Control of *Verticillium dahliae* by *Pythium oligandrum*. *Plant Disease* **82**: 1100-1106
- Anderson AJ, Habibzadegah-Tari P, Tepper CS. 1988. Genetic studies on the role of an agglutinin-in root colonization by *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*. **54**: 375-380
- Audenaert K, Pattery T, Cornelis P, Höfte M. 2002. Introduction of systematic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas Aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin and pyocyanin. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **15**: 1147-1156
- Baranyk P & Fábry A. 2007. Řepka. Profi Press
- Baranyk P. 2010. Olejniny. Profi Press
- Bayer. 2017. Etiketa přípravku Serenade® ASO
- Bečka D et al. 2007. Řepka ozimá: Pěstitelský rádce. Česká zemědělská univerzita v Praze
- Benhamou N & Chet I. 1997. Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**: 2095-2099
- Benhamou N. 2004. Potential of the mycoparasite, *Verticillium lecanii*, to protect citrus fruit-against *Penicillium digitatum*, the casual agent of green mold: A comparison with-the effect of chitosan. *Phytopathology*, **94**: 693-705
- Bio Agens Research and Development. 2019. Chytrá houba – *Pythium oligandrum*. Dostupné z <http://www.pythium.eu> (cit. duben 2019)
- Bull CT, Shetty KG, Subbarao KV. 2002. Interactions between *Myxobacteri*, plant pathogenic fungi and biocontrol agents. *Plant Disease*. **86**: 889-896
- Chemtura Europe. 2016. Etiketa přípravku Vitavax 2000
- Cook RJ. 1993, Making greater use of microbial inoculants in agriculture. *Annual Review of Phytopathology*. **31**: 53-80
- Český statistický úřad. 2016. Osevní plochy ozimých plodin pro sklizeň v roce 2016. Dostupné z <https://www.czso.cz/csu/czso/osevni-plochy-ozimych-plodin-pro-sklizen-v-roce-2016> (cit. březen 2019)
- Danihelka J, Chrtek J, Kaplan Z. 2012. Seznam cévnatých rostlin květeny České republiky. Preslia
- Debode J, Poucke KV, França SC, Maes M, Höfte M, Heungens K. 2011. Detection of multiple *Verticillium* species in soil using density flotation and real-time PCR

- Depotter JR, Deketelaere S, Inderbitzin P, Tiedemann AV, Höfte M, Subbarao KV, Wood T A, Thomma BP. 2016. *Verticillium longisporum*, the invisible threat to oilseed rape and other brassicaceous plant hosts. *Molecular Plant Pathology*. **17**: 1004–1016
- Dunker S, Keunecke H, Steinbach P, von Tiedemann A. 2008. Impact of *Verticillium longisporum* on yield and morphology of winter oilseed rape (*Brassica napus*) in relation to systemic spread in the plant. *Journal of Phytopathology*. **156**: 698–707
- Eastburn, DM, & Paul VH 2007: Verticillium Wilt. Page 47–50. In: Rimmer SR., Shattuck, VI, Buchwaldt L. (Eds.): Compendium of brassica diseases. APS Press, St. Paul, Minnesota
- Elad Y & Baker R. 1985. Influence of trace amounts of cations and siderophore-producing pseudomonads on chlamydiospore germination of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*. **75**: 1047-1052
- Elita. 2019. Řepka ozimá. Dostupné z <http://www.elita.cz/repka-oz-rapool> (cit. duben 2019)
- Eynck C, Koopmann B, Grunewaldt-Stöcker G, Karlovsky P, Tiedemann A. 2007. Differential interactions of *Verticillium longisporum* and *Verticillium dahliae* with *Brassica napus* detected with molecular and histological techniques. *European Journal of Plant Pathology*. **118**: 259-274.
- Eynck C. 2008, Assesment key for the evaluation of the disease severity of *B. napus* plants by *V. longisporum*
- Eynck C. 2008. Identification of resistance sources and characterization of resistance factors in *Brassica* species to *Verticillium longisporum* [Dizertační práce]. Universität Göttingen
- Fytovita. 2015. Clonoplus. Dostupné z <https://fytovita.cz/clonoplus.html> (cit. březem 2019)
- Fytovita. 2015. Gliorex. Dostupné z <https://fytovita.cz/gliorex.html#> (cit. březem 2019)
- Gladders P. 2009. Relevance of verticillium wilt (*Verticillium longisporum*) in winter oilseed rape in the UK. HGCA Research Review no. 72
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. 2004, Trichoderma species-opportunistic, avirulent plant symbionts, *Nature Reviews Microbiology*. **2**: 43-56
- Heale JB & Karapapa KV. 1999. The Verticillium threat to Canada's major oilseed crop: Canola. *Canadian Journal of Plant Pathology*. **21**:1-7.
- Heydari A, Misaghi IJ, McCloskey WB. 1997. Effects of three soil applied herbicides on populations of plant disease suppressing bacteria in the cotton rhizosphere. *Plant Soil*. **195**: 75-81
- Heydari A, Pessarakli M. 2010 A Review on Biological Control of Fungal Plant Pathogens Using Microbial Antagonists, *Journal of Biological Sciences* **10**: 273-290
- Homma Y, Sato Z, Hirayama F, Konno K, Shirahama H, Suzui T. 1989. Production of antibiotic by *Pseudomonac cepacia* as an agent for biological control of soil borne pathogens. *Soil Biology and Biochemistry*. **21**: 723-728

- Howell CR & Stipanovic RD. 1980. Suppression of *Pythium ultimum* induced damping-off of cotton seedling by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic pyoluteorin. *Phytopathology* **70**: 712-715
- Howell CR, Beier RC, Stipanovic RD. 1988. Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control of *Pythium* pre-emergence damping-off by the bacterium. *Phytopathology*. **78**: 1075-1078
- Islam MT, Yasuyuki H, Abhinandan D, Toshiaki I, Satoshi T. 2005. Suppression of damping-off-disease in host plants by the rhizoplane bacterium *Lysobacter sp.* Strain SB-K88 is linked to plant colonization and antibiosis against soilborne peronosporomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**:3786-3796
- Kageyama K & Nelson EB. 2003. Differential inactivation of seed exudates stimulation of *Pythium ultimum* sporangium germination by *Enterobacter cloacae* influences biological control efficiency on different plant species. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**: 1114-1120
- Karapapa V, Bainbridge B, Heale J 1997. Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape. *Mycological Research*. **101**: 1281-1294
- Keel C, Voisard C, Berling CH, Kahir G, Defago G. 1989. Iron sufficiency is a prerequisite for suppression of tobacco black root rot by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 under gnotobiotic conditions. *Phytopathology*, **79**: 584-589
- Kloepper JW, Leong J, Teintze M, Schroth MN. 1980. *Pseudomonas* siderophores: A mechanism explaining disease suppression in soils. *Current Microbiology*. **4**: 317-320
- Knüfer J. 2011. Improvement of Winter Oilseed Rape Resistance to *Verticillium longisporum*: Assessment of Field Resistance and Characterization of Ultrastructural Plant Responses [Dizertální práce]. Universität Göttingen
- KWS. 2018. ALVARO KWS. Dostupné z <https://www.kws.cz/aw/czechia/-344-epka/rodeo/~brcm/> (cit. duben 2019)
- KWS. 2018. FACTOR KWS. Dostupné z <https://www.kws.cz/aw/czechia/-344-epka/TURAN/~dtad/> (cit. duben 2019)
- Lafontaine PJ & Benhamou N. 1996. Chitosan treatment: An emerging strategy for enhancing resistance of greenhouse tomato plants to infection by *Fusarium Oxysporum* f. sp. *Radicis-lycopersici*. *Biocontrol science and technology*. **6**: 11-124
- Leclere V, Bechet M, Adam A, Guez JS, Wathelet B et al. 2005. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**: 4557-4584
- Leeman M, van Pelt JA, den Ouden FM, Heinsbroek M, Bakker PAHM, Schippers B. 1995. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to *Fusarium wilt*, using novel bioassay, *European Journal of Plant Pathology*. **101**: 655-664

- Loper JE & Buyer JS. 1991. Siderophores in microbial interactions of plant surfaces. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **4**: 5-13
- Marín MV, Sundermann L, von Tiedemann A. 2018. Biocontrol potential by the apathogenic A1/D2 lineage of *V. longisporum* against pathogenic strains of *V. longisporum* and their interaction with roots of oilseed rape. Pages 211-212 in Cook SM, Jedryczka M, Juran I, Truman W, editors. International Organisation for Biological and Integrated Control. Zagreb
- Maurhofer M, Hase C, Meuwly P, Metraux JP, Defago G. 1994. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root colonization *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO: Influence of the *gac A* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology*, **84**: 139-146
- Mezian H, Van der Sluis I, van Loon LC, Höfte M, Bakker PAHM. 2005. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Molecular Plant Pathology*. **6**: 177-185
- Milgroom MG & Cortesi P. 2004. Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. *The Annual Review of Phytopathology*. **42**: 311-338
- Mol L & Riessen HW. 1995. Effect of plant roots on the germination of microsclerotia of *Verticillium dahlia*. *European Journal of Plant Pathology*. **101**: 673-678.
- Monas Technology. 2019. Hirundo. Dostupné z <http://www.monastechnology.cz/index.php/hirundo> (cit. březem 2019)
- Monas Technology. 2019. Prometheus. Dostupné z <http://www.monastechnology.cz/index.php/prometheus-cz> (cit. březem 2019)
- Novakazi F, Inderbitzin P, Sandoya G, Hayes RJ, von Tiedemann A, Subbarao KV, et al. 2015. The three lineages of the diploid hybrid *Verticillium longisporum* differ in virulence and pathogenicity. *Phytopathology*. **105**: 662–673.
- Odstrčilová, L., Plachká, E. 2007. Choroby řepky na jaře. Agromanuál: Profesionální ochrana rostlin. ISSN: 1801–7673
- Olsson S & Nordbring-Hertz B. 1985. Microsclerotial germination of *Verticillium dahliae* as affected by rape rhizosphere. *FEMS Microbiology Letters*. **31**: 293-299
- Ongena M & Jacques P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol, *Trends in Microbiology* **16**: 115-125
- Ordentlich A, Elad Y, Chet I. 1988. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*. **78**: 84-87
- Phillips AD, Fox TC, King MD, Bhuvaneswari TV, Teuber LR. 2004. Microbial products trigger amino acid exudation from plant roots. *Plant Physiology*. **136**: 2887-2894
- Press CM, Loper JE, Klopper JW. 2001. Role of iron in rhizobacteria mediated induced systemic resistance of cucumber. *Phytopathology*. **91**: 593-598

- Prokinová E. 2003. Choroby řepky význam v ČR a ochrana proti nim. Sborník „Řepka, mák, hořčice“. Česká zemědělská univerzita v Praze
- Ramette A, Moenne-Loccoz Y, Defago G. 2003. Prevalence of fluorescent-pseudomonads producing antifungal phloroglucinols and/or hydrogen cyanide in soils naturally suppressive or conducive to tobacco root rot. *FEMS Microbiology Ecology*. **44**: 35-43
- Rodríguez MA, Cabrera G, Gozoo FC, Eberlin MN, Godeas A. 2011. *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. *Journal of Applied Microbiology*. **110**: 1177-1186
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Kloepper JW, Pare PW. 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol*. **134**: 1017-1026
- Saatbau. 2019. Goya. Dostupné z <https://www.saatbau.com/cz/saatgut/repka-ozima/olejniny/liniova-odrud/goya-cs-cz> (cit. duben 2019)
- Selgen. 2019. Orex. Dostupné z <https://selgen.cz/olejniny/repka-ozima/orex/> (cit. duben 2019)
- Shahraki M, Heydari A, Hassanzadeh N. 2009. Investigation of antibiotic siderophore and volatile metabolites production by *Bacillus* and *Pseudomonas* bacteria, *Iranian Journal of Biology*. **22**: 71-85
- Shanahan P, O'Sullivan DJ, Simpson P, Glennon JD, O'Gara F. 1992. Isolation of 2, 4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**: 353-358
- Silva HSA, Romeiro RDS, Macagnan D, Halfeld-Vieira BDA, Pereira MCB, Munteer A. 2004. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control*. **29**: 288-295
- Syngenta. Symetra Technické informace
- Tari PH & Anderson AJ. 1988. Fusarium wilt suppression and agglutinability of *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*. **54**: 2037-2041
- Thomasow LS & Weller DM. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici*. *Journal of Bacteriology*. **170**: 3499-3508
- Thomasow LS, Weller DM, Bonsall R, Pierson LS. 1990. Production of the antibiotic phenazine 1-carboxylic acid by fluorescent pseudomonad species in the rhizosphere of wheat. *Applied and Environmental Microbiology*. **56**: 908-912
- Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. 2019. Integrovaná ochrana rostlin. Dostupné z <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/skodlive-organismy/integrovana-ochrana-rostlin/> (cit. březen 2019)
- Van Dijk K & Nelson EB. 2000. Fatty acid competition as a mechanism by which *Enterobacter cloacae* suppresses *Pythium ultimum* sporangium germination and damping-off. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**: 5340-5347

- Wilhite SE, Lumsden RD, Strancy DC. 2001. Peptide synthetase gene in *Trichoderma virens*. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**: 5055-5062
- Zemědělec.cz. 2013. Technika a technologie pro setí řepky. Dostupné z <https://www.zemedelec.cz/technika-a-technologie-pro-seti-repky/> (cit. prosinec 2018)
- Zhou L, Hu Q, Johansson A, Dixelius C. 2006. *Verticillium longisporum* and *V. dahliae*: infection and disease in *Brassica napus*. *Plant Pathology*. **55**: 137-144

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

CTAB – Cetyltrimethylamoniumbromid

PCR – Polymerázová řetězová reakce

HTS – Hmotnost tisíce semen

RAPD – Náhodná amplifikace polymorfni DNA

DAPG – 2,4-Diacetylfluoroglucinol

ČZU – Česká Zemědělská Universita

PDA – Agar s bramborovou dextrózou

RPM – Otáčky za minutu