Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra ochrany rostlin

Biologická ochrana proti houbovému patogenu *Verticillium longisporum* v polních podmínkách

Diplomová práce

Bc. Monika Halbrštatová

Výživa a ochrana rostlin

Ing. Marie Maňasová, Ph.D.

© 2021ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Biologická ochrana proti houbovému patogenu *Verticillium longisporum* v polních podmínkách" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové 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 diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 25. 04. 2021 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé diplomové práce, paní Ing. Marii Maňasové, Ph.D. za její odborné a cenné rady a poskytnutí důležitých informací pro dokončení mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Evě Zuskové za vedení a pomoc při praktických pokusech a obětavou spolupráci při tvorbě mé práce.

Biologická ochrana proti houbovému patogenu *Verticillium longisporum* v polních podmínkách

Souhrn

Verticiliové vadnutí způsobené patogeny rodu *Verticillium,* hlavně *Verticillium longisporum,* patří k nejvýznamnějším chorobám řepky ozimé a může působit velmi významné ztráty na výnosech. Předložená diplomová práce má za cíl vyhodnotit možnosti biologické ochrany řepky ozimé proti patogenu *Verticillium longisporum* v polním maloparcelkovém pokusu. Polní pokus byl založen na šlechtitelské stanici SELGEN, a. s. v Chlumci nad Cidlinou dne 31. 8. 2019 na odrůdách Alicante a Kicker. Rostliny byly ošetřeny vybranými biologickými přípravky ve stanovných termínech formou moření či postřiku.

Parcelky u variant 1 a 2 byly ošetřeny již před založením porostu přípravkem Contans. Následně bylo provedeno setí do připravené půdy. Aplikace přípravků proběhla během pokusu po založení porostu v pěti různých termínech. Každá varianta byla ošetřena jiným přípravkem či jinou kombinací účinných látek. Po sklizni byl spočítán poměr zelených a suchých stonků z 2 m^2 a bylo náhodným odběrem z každé parcelky sebráno 5 stonků, které byly dál využity při laboratorním hodnocení *V. longisporum* a celé skupiny *Verticillium* pomocí diagnostické metody qPCR.

Pokus byl veden na odrůdě Alicante, která se z pozorování SPZO jeví jako senzitivní vůči patogenu *V. longisporum*. Na tuto odrůdu bylo aplikováno 8 variant vybraných biologických přípravků. Další variantou je odrůda Kicker, u které se zjišťovalo, zda vykáže odolnost proti patogenu *V. longisporum,* jež tuto vlastnost prokázala při pozorování SPZO. Desátou variantou je neošetřená kontrola Alicante.

Během finálního hodnocení byl zjištěn poměr zelených a suchých stonků na strništi a pokusnou stanicí vyhodnocen výnos, HTS, olejnatost. Bylo zjištěno množství patogenu u variant v jednotlivých opakováních. Nejlepší výsledky z poměru zelených stonků byly zjištěny u odrůdy Kicker a u bioagens s účinnými látkami *Bacillus amyloliquefaciens, Coniothyrium minitans a Bacillus subtilis.* Výnos řepky byl nejvyšší po použití *Trichoderma asperellum*, dále u *Bacillus spp*. a u kombinace přípravků Serenade, Contans a Propulse. Nejvyšší olejnatost byla zjištěna u varianty Kicker a hodnota HTS byla zjištěna nejvyšší u kombinace přípravků Serenade, Contans a Propulse. Nejvyšší množství patogenu *Verticillium* bylo zjištěno v prvním opakování u varianty Contans a ve druhém opakování u varianty s použitím přípravků Contans, Serenade a Propulse. Celkově v průměru všech hodnocení dosazovala opakovaně nejlepších hodnot varianta Kicker.

Klíčová slova: *V. longisporum,* řepka ozimá, biologické přípravky bakteriální, biologické přípravky na bázi hub, biologická ochrana, maloparcelkové polní pokusy

Biological control against fungal pathogen *Verticillium longisporum* in field conditions

Summary

Verticillium wilt caused by the pathogen *Verticillium longisporum* is one of the most important diseases of winter oilseed rape and can cause a very significant loss of yield. This diploma thesis aims to evaluate the possibilities of biological protection of winter oilseed rape against the pathogen *Verticillium longisporum* in a small field plot experiment. From each plot were randomly collected 5 samples. A portion of the selected plants was removed for qPCR analysis and the total amount of pathogen DNA was isolated. The field experiment was established in breeding station SELGEN, a. s. in Chlumec nad Cidlinou 31.8. 2019 on species Alicante and Kicker. The plants were treated with selected biological preparations in specified dates by pickling or spraying.

The plots in variants 1 and 2 were treated with Contans before the seeding. Subsequently, seeding was performed in the prepared soil. The application of the preparations took place during the experiment after the establishment of the stand on five different dates. Each variant was treated with a different preparation or combination of preparations. After harvest, the ratio of green and dry stems was calculated from 2 m^2 and 5 stems were collected from each plot by random sampling, which were further used in the laboratory evaluation of *V. longisporum* and the whole *Verticillium* group.

The experiment was conducted on the Alicante variety, which from SPZO observations appears to be sensitive to the pathogen *V. longisporum*. 8 variants of selected biological preparations were applied to this variety. Another variant is the Kicker variety, in which it was determined whether it would show resistance to the pathogen *V. longisporum*, which proved this property when observing SPZO. The tenth option is an untreated Alicante control.

During the final evaluation, the ratio of green and dry stems on the stubble was determined and the yield, HTS, oil content were evaluated by the experimental station. The amount of pathogen in the variants in individual interation was determined. The best results from the ratio of green stems were found in the Kicker species and in bioagents with the active ingredients *Bacillus amyloliquefaciens*, *Coniothyrium minitans* and *Bacillus subtilis*. The rapeseed yield was the highest after the use of *Trichoderma asperellum*, then in *Bacillus spp*. and a combination of Serenade, Contans and Propulse. The highest oil content was found in the Kicker variant and the HTS value was found highest in the combination of Serenade, Contans and Propulse. The highest amount of the pathogen Verticillium was found in the first iteration in the Contans variant and in the second iteration in the variant using Contans, Serenade and Propulse. Overall, on average in all evaluations, the Kicker variant repeatedly achieved the best results.

Keywords: *V. longisporum*, winter oilseed rape, biological bacterial preparates, biological preparates based on fungi, biological protection, small-plot (of land) field experiments

Obsah

1 Úvod **1**

2 Vědecká hypotéza a cíle práce **2**

3 Literární rešerše **3**

3.1 Řepka ozimá **3**

3.1.1 Botanická charakteristika 3

3.1.2 Technologie pěstování 4

3.1.3 Klimatické podmínky 4

3.1.4 Hnojení řepky olejné 4

3.1.5 Současné využití řepky 5

3.1.6 Odrůdy řepky ozimé 5

3.2 Houbové patogeny řepky ozimé **6**

3.2.1 Bílá hniloba řepky (*Sclerotinia sclerotiorum*) 6

3.2.2 Fómové černání stonků řepky 8

3.2.3 Padlí brukvovitých *(Erysiphe cruciferarum)* 10

3.2.4 Nádorovitost kořenů brukvovitých *(Plasmodiophora brassicae)* 10

3.2.5 Šedá plísňovitost brukvovitých 11

3.3 Verticiliové vadnutí řepky (*Verticillium longisporum*) **11**

3.3.1 Příznaky a projevy verticiliového vadnutí řepky 12

3.3.2 Životní cyklus *V. longisporum* 12

3.3.3 Hostitelský okruh 13

3.4 Možnosti ochrany řepky olejné proti patogenu *V. longisporum* **13**

3.4.1 Biologická ochrana proti patogenu *V. longisporum* 14

3.4.2 Mechanismy biologické ochrany 15

4 Metodika **18**

4.1 Polní maloparcelkové pokusy **18**

4.1.1 Charakteristika lokality 18

4.1.2 Agrotechnické zásahy 18

4.1.3 Biologický materiál 19

4.1.4 Termíny a dávky aplikovaných přípravků 22

4.1.5 Metodika hodnocení 23

4.2 Laboratorní diagnostika **23**

4.2.1 Příprava vzorků 23

4.2.2 Izolace celkové DNA pomocí CTAB 23

4.2.3 Real Time PCR 25

4.2.4 Zpracování dat 25

5 Výsledky **26**

5.1 Polní maloparcelkové pokusy 26
5.1.1 Poměr zelených a suchých stonků na strništi 26
5.1.2 Výnos, HTS a olejnatost 27
5.2 Laboratorní diagnostika 31
5.3 Statistické hodnocení 33
5.3.1 Hodnocení výnosu 33
5.3.2 Hodnocení obsahu patogenů rodu *Verticillium* 36
6 Diskuze 38
7 Závěr 41
8 Literatura 43
9 Seznam tabulek 51
10 Seznam zkratek 52

1 Úvod

Využití biologických přípravků má v dnešní době nezanedbatelný význam. Jednak z důvodu zvyšujícího se tlaku veřejnosti na udržitelné hospodaření, nicméně nejzávažnější je každoroční úbytek účinných přípravků na ochranu plodin. Bioagens se tak stává vhodnou a účinnou alternativou chemických přípravků na ochranu proti houbovým patogenům, škůdcům i jako účinný přípravek k hubení plevelů a invazních rostlin. Je to šetrná metoda ochrany rostlin, která nezatěžuje životní prostředí. V usnesení Evropského parlamentu ze dne 15. února 2017 se přímo zdůrazňuje, že iniciativa k podpoře přípravků biologického původu nesmí vést ke snížení standardů v oblasti zdraví, bezpečnosti potravin a ochrany životního prostředí. Dále se zdůrazňuje, že je nutná podpora vývoje a povolování bioagens a jejich uvádění na trh EU. Usnesení též konstatuje, že stávající povolovací řízení pro pesticidy biologického původu není optimální a zvažuje se zavedení zrychleného postupu posouzení, povolování a registrace těchto přípravků (Navrátilová 2019).

Pesticidy, které zahrnují insekticidy, herbicidy a fungicidy, se používají v moderním zemědělství k hubení škůdců a ke zvýšení výnosu plodin. V rozvinutých i rozvojových zemích se používání chemických prostředků během posledních několika desetiletí dramaticky zvýšilo. Kontrola škůdců a chorob syntetickými chemikáliemi má za následek několik problémů. Zbytky těchto syntetických insekticidů mají toxické účinky na zvířata (např. ptáky, užitečný hmyz). Tyto chemické postřiky také vyvolávají škodlivé projevy na necílových organismech. Mohou být škodlivé pro člověka a domácí zvířata. Dalším problémem pro životní prostředí je kontaminace podzemních vod (Lacey & Siegel 2000).

Konvenční plodiny, u kterých se biologická ochrana jeví jako perspektivní jsou například olejniny. Jsou totiž významnou skupinou tržních plodin. I přes meziroční kolísání osevních ploch, dochází k překračování 15% zastoupení na pěstované ploše. V posledních letech dochází i k pozvolnému narůstání ploch máku setého. Nelze opomenout ani hořčici setou, která se pěstuje na semeno, nebo častěji jako meziplodina pro greening. Intenzita pěstování olejnin vyžaduje dostatečné množství účinných látek na potlačování chorob, škůdců a plevelů. Vzhledem ke každoročnímu úbytku chemických postřiků je vhodné použití bioagens (Vaněk et al. 2016). Brukev řepka olejka (*Brassica napus var. napus*) je v České republice nejpěstovanější olejninou. Obliba jejího pěstování sebou nese však i negativa k podobě zvyšujícího se tlaku chorob a škůdců. Verticilliové vadnutí je jednou z nejvýznamnějších chorob řepky. Napadá kořeny rostlin a při silném výskytu dokáže negativně ovlivnit výnos. Je proto žádoucí zaměřit pozornost na biologické přípravky působící v půdě a zhodnocovat jejich účinnost v boji s houbovými patogeny.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hlavním cílem práce bylo testování vlivu biologických přípravků na omezení výskytu patogenu *V. longisporum* v polních maloparcelkových pokusech.

Dílčími cíly práce bylo:

1) Otestovat rozdílný vliv patogenu *V. longisporum* na odrůdu řepky ozimé (Kicker) proti odrůdě bez rezistence (Alicante).

2) Zjistit výnos, HTS a olejnatost u odrůd Kicker a Alicante v závislosti na použitých biogens.

3) Zjistit přítomnost patogenu v rostlinách pomocí diagnostické metody Quantitative polymerase chain reaction (qPCR).

Hypotéza: Existují biologické přípravky, které při aplikaci mají přímý dopad na vývoj patogena *Verticillium longisporum*.

3 Literární rešerše

3.1 Řepka ozimá

Říše: Rostliny (Plantae)
Oddělení: Rostliny krytosemené (Magnoliophyta)
Třída: Vyšší dvouděložné rostliny (Magnoliopsida)
Řád: Brukvotvaré (Capparales)
Čeleď: Brukvovité (Brassicaceae)
Rod: Brukev (*Brassica* L.*)*
Druh: Brukev řepka (*Brassica napus* L.)
(USDA-ARS 2017)

Řepka olejná *(Brassica napus L. var. napus)* patří do čeledi brukvovitých. Je to jednoletá, dvouděložná rostlina a pěstují se ozimé i jarní odrůdy (Diepenbrock et al. 1999). Z historického hlediska jde patrně o kříženec brukve řepice a brukve zelné. Důvodem pro volbu pěstování této plodiny je několik. Je to zlepšující plodina, která je široce využívaná v osevním postupu. Její výnosy jsou dlouhodobě stabilní (Baranyk et al. 2010).

Díky kořenovému systému rostlina půdu provzdušňuje. Rostlinný pokryv zabraňuje vysychání půdy a rostlinné zbytky zlepšují její strukturu. Bohužel její oblíbenost v zařazovaní do osevního postupu sebou nese také negativní aspekty. Nejdůležitější je možný rozvoj virových a houbových chorob, jež způsobují značné problémy při pěstování plodiny. Dále rozvoj plevelů, které je nutno hubit i při pěstování následné plodiny. Sama řepka se může stát také zaplevelující rostlinou. Jelikož se interval zařazování řepky v osevním sledu zúžil z 6 let na 3-4 roky, jsou potíže s těmito stavy stále častější (Baranyk et al. 2010).

3.1.1 Botanická charakteristika

Rostlina dosahuje výšky okolo 150 centimetrů. Květy jsou žluté a plodem je šešule. Zde se nacházejí semena, která se zralá sklízejí (Škaloud 1960). Řepkové semeno obsahuje 35-40 % tuku, dále asi 20 % dusíkatých látek. Obsah hrubé vlákniny je 7-12 % a minerálních látek 2-3 %. Dále je zde nezanedbatelný obsah antinutričních látek. Nejvýznamnější jsou glukosinoláty, sinapiny a například antinutriční polysacharidy (Vašák 2000).

Kořenový systém je málo rozvětvený a skládá se z hlavního kůlového kořene, který dosahuje hloubky 60-70 cm. Rostlina kvete od dubna do května. Při dozrávání šešulí porost zasychá a je tak vhodný ke sklizni. Lodyha je přímá, větvená, lysá, nedřevnatějící. Listy jsou sivozelené, silně ojíněné. Dolní lodyžní listy lyrovitě peřenosečné, řapíkaté. Horní listy naopak jednoduché a přisedlé. Květy jsou v řídkých hroznech, kališní lístky úzce eliptické až kopinaté, koruna je světle žlutá až bílá. Šešule jsou od vřetene květenství odstálé v úhlu minimálně 45°. Kořenový krček je 8-12 mm široký. Rostlina je fakultativně cizosprašná (Baranyk et al. 2007).

3.1.2 Technologie pěstování

Důležitým faktorem pro správné pěstování řepky je zvolení vhodné předplodiny a také pozemku, kde budeme zakládat porost. Vhodné je zvolení takové předplodiny, která je sklizená v dostatečném předstihu pro přípravu pozemku na vysetí řepky. Zde nastává problém, neboť řepka bývá většinou přerušovačem obilních sledů. Pak se vzhledem k rannějšímu termínu sklizně hodí jako předplodina ozimý ječmen. Zde je ale riziko růstu výdrolu, který je nutný odstranit. Pokud jde o pozemek, nejvhodnější jsou pozemky hlinité, neslévavé s průměrným úhrnem srážek cca 600 mm. Předseťová příprava zahrnuje, pokud je to možné, středně hlubokou orbu, zapravení hnojiv a pečlivou úpravu půdy, která musí být nezaplevelená a bez posklizňových zbytků na povrchu (Baranyk et al. 2010).

Doba založení porostu se v průběhu let mírně změnila. Zažité datum 25. srpen v této době neplatí a pěstitelé dnes sejí již v polovině srpna. Musí pak sice počítat s použitím regulátorů růstu, aby rostlina nepřerostla a přes zimu nebyla náchylná k vymrzání, přesto se takovýto postup vyplatí a rostlina do zimního období vstupuje silná a dobře zakořeněná. Hlubka setí se pohybuje kolem 2-3 cm (Mašek & Novák 2011).

3.1.3 Klimatické podmínky

Řepka ozimá je poměrně náročná a roční úhrn srážek. Před zimou není vhodné zamokření pozemku, jelikož rostlina hůře přijímá živiny a kyslík. Projevem je typické fialovění listů, které je možné zaměnit za nedostatek fosforu. Vyhovuje jí tedy v tomto období spíše sušší počasí. Nicméně dostatečné srážky jsou nutné pro dobré vzejití porostu (Baranyk et al. 2010).

Během zimy jsou vhodné průměrné až vyšší srážky a teploty maximálně do -10 °C. Aby byla schopna vypořádat se i s nižšími teplotami, kořenový krček by měl být silný minimálně 8 mm. Nevhodné je také výrazné kolísání denních a nočních teplot. Optimální úhrn srážek pro řepku činí 550-750 mm. Pokud je úhrn srážek vyšší, dochází ke zvýšenému riziku houbových infekcí (Bečka et al. 2007).

3.1.4 Hnojení řepky olejné

Řepka je jednou z nejnáročnějších plodin na výživu a hnojení. Oproti ostatním konvenčně pěstovaným plodinám však zjistíme, že má řepka ve výsledku podobně vysoké nároky na živiny. Pšenice s výnosem přes 8 t/ha má obdobnou spotřebu N a P jako řepka při výnosu kolem 4 t/ha. Naproti tomu například cukrová řepa a kukuřice mají dokonce vyšší spotřebu těchto živin. I přes vysokou finanční náročnost pořízení a aplikace hnojiv se jejich použití pro správnou výživu řepky stále vyplatí (Baranyk et al. 2007)

Nejvhodnějším hnojivem je pro žádanou úpravu půdních vlastností chlévský hnůj v dávce 20–30 t/ha. Ten můžeme buď zaorat či zapravit kypřením. Tímto úkonem dojde k dobrému rozvrstvení hnoje v půdním profilu a vyšší efektivity využitelného dusíku. Hnůj je podle legislativních nařízení nutné zapravit od aplikace na pozemek do 48 hodin. Hnůj se před setím řepky zapravuje ideálně na konci července či počátkem srpna. Další vhodnou alternativou organického hnojení je kejda, močůvka a digestát. Aplikují se v průměrné dávce 15-25 t/ha. Zde je opět nutné hnojivo zapravit do stanoveného termínu. Aplikací těchto živin obohatíme řepku zejména o dusík a draslík. Ostatní živiny je nutné dodat v minerálních

hnojivech. K dalším přednostem organického hnojení patří zvýšení využitelnosti fosforu z půdy, zvýšení obsahu organických látek v půdě, pozitivní ovlivnění mikrobiální aktivity a působení na sorpční a pufrační vlastnosti půdy (Baranyk et al. 2010)

Před setím je na kyselých půdách vhodné vápnění. Na přímé vápnění řepka reaguje zvýšením výnosu. Dále tvorbou kořenů a celkově lepší vitalitou rostlin. Zajímavostí je, že řepka je vlivem kořenových exudátů schopna upravit pH. Kyselé půdy mají nepříznivý vliv na další půdní vlastnosti, zejména nižší přístupnost živin (P, S, Mg, B) a též na přeměnu a využitelnost dusíku. Půdy s nízkým pH mají nízký obsah Ca v půdním roztoku. Řepka je přitom poměrně náročná na přísun Ca a její potřeba je 5–8krát vyšší než u obilnin. Podle pH půdy se doporučuje aplikace vápence (dolomitický vápenec či dolomit) v dávce 1–3 t/ha. Na velmi kyselých půdách s pH nižší něž 5, je však nutné vápnění zopakovat. Vápenec musí být zapraven do orničního profilu. Jeho nezapravením by nedošlo k dostatečnému rozpouštění účinné složky, tj. uhličitanu vápenatého. U mletých granulovaných vápenců je postup stejný. Granulované vápence bývají v menší dávce vhodnou alternativou udržovacího vápnění. Hlavně pokud se v podniku pro hnojení dusíkem nevyužívá LAV/LAD, ale převažuje močovina, DAM, síran amonný (DASA) apod (Bečka et al. 2010).

Řepka z jednoho hektaru půdy vyčerpá přibližně 200–236 kg N, 150–200 kg K, 120–150 kg Ca, 40–70 kg P, 15–25 kg Mg a 50–60 kg S. Tento deficit je nutné dodat jak organickými, tak i minerálními hnojivy v aplikacích na podzim a na jaře (Baranyk et al. 2007).

3.1.5 Současné využití řepky

Řepka patří mezi jednu z nejpěstovanějších olejnin na světě. Původně byla využívána výhradně pro technické účely. K výrobě maziv, olejů na svícení a mýdel (Vrkoč & Vach 2005). V současnosti je užívána v potravinářském průmyslu na výrobu oleje, jako součást krmných směsí (pokrutiny, extrahované šroty), v oleochemii, k výrobě bionafty či k výrobě pelet na vytápění staveb (Baranyk et al. 2007). Přičemž výroba metylesteru řepkového eleje (MEŘO) zaujímá až polovinu vypěstované produkce. Glycerin se získává jako sekundární surovina při výrobě bionafty a využívá se v oleochemi. Glycerin je však v dnešní době v nadprodukci a jeho výroba již není příliš rentabilní (Kuchtová et al. 2008).

Dále se rozkladem olejů získávají vyšší mastné kyseliny, které se využívají v kosmetice, jako přídavek do laků, emulgátorů, maziv a k výrobě plastů. Pro mazání řetězů motorových a stacionárních pil se používají biooleje, které ve významné míře nahradili ropná maziva. Dále je možné využít řepku k výrobě tenzidů, které se přidávají do pracích a mycích prostředků. V poslední době jsou stále oblíbenější lisované granule z řepky na vytápění budov. Výhřevnost pelet závisí na množství celulózy a ligninu. Výhřevnost je u pelet vyšší než u dřeva a stává se tak zajímavou a levnou alternativou. Nicméně pořízení kotle na pelety je nákladné (Kuchtová et al. 2008).

3.1.6 Odrůdy řepky ozimé

Výběr vhodné odrůdy je klíčový pro dobrý výnos stejně jako hnojení a předseťová příprava (Bečka & Vašák 2007). Ve Státní odrůdové knize je přibližně 60 odrůd řepky. V evropském katalogu odrůd a druhů je přes 600 odrůd. Z těchto čísel vyplývá, že došlo k velkému rozšíření nabízených odrůd řepky. Současně dochází k rychlé obměně nabídky a není

výjimkou, že opravdu uspěšná odrůda vydrží v oblibě pěstitelů méně něž 5 let. V průměru je sortiment každý rok rozšířen o více jak 10 odrůd. Odrůdy s vysokou tolerancí k houbovým chorobám jsou velmi vyhledávané. Lze totiž ušetřit za fungicidní postřik a zvýšit tak výnosový potenciál. U nízkých odrůd lze zase vynechat použití morforegulátoru růstu. Při výběru odrůdy je kromě dosaženého výnosu vhodné znát i možnou odolnost k houbovým patogenům, ranost či pozdnost a optimální termín výsevu (Bečka et al. 2010). Intenzifikace v pěstování řepky má vliv na výběr vhodné odrůdy. Vhodné jsou v tomto ohledu hybridní odrůdy. Liniové odrůdy jsou přesto schopné dosahovat obdobných výsledků (Horák 2007).

Pro účel této diplomové práce jsme využili dvě odrůdy. Diplomová práce je vedená na odrůdě Alicante, jež není odolná proti *V. longisporum*. Druhou odrůdou, na které byla testována odolnost proti patogenu *V. longisporum* je odrůda Kicker. Ta vykazuje odolnost vůči patogenu *V. longisporum* na základě dlouhodobých pozorování Svazu pěstitelů a zpracovatelů olejnin.

3.2 Houbové patogeny řepky ozimé

Nejvýznamějšími původci nemocí je v dnešní době většina houbových chorob. Nejzávažnější je však *Verticillium longisporum, Sclerotinia sclerotiorum, Leptosphaeria maculans* (Odstrčilová & Plachká 2007). Při napadení houbovými patogeny může dojít významným ztrátám na výnosu až o 20-50 % (Bečka et al. 2007).

3.2.1 Bílá hniloba řepky (*Sclerotinia sclerotiorum*)

Říše: Fungi
Třída: Leotiomycetes
Čeleď: Sclerotiniaceae
Rod: *Sclerotinia*
Druh: *Sclerotinia sclerotiorum*
(CABI 2019)

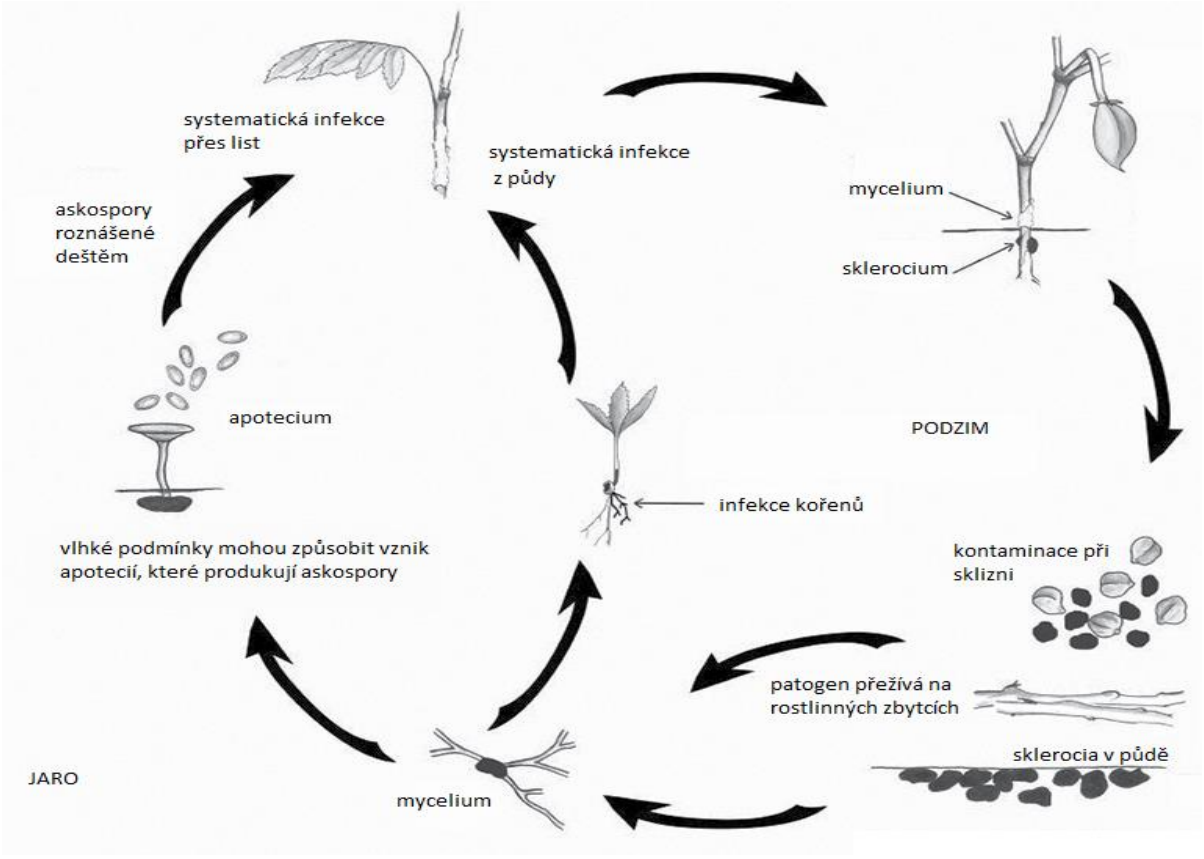
Je to půdní patogen, který napadá stonky, listy, květy a šešule. Projevem je žloutnutí a vadnutí rostliny. Světle hnědé léze jsou na větvičkách dobře ohraničené. Napadá řadu kulturních a planých druhů. Nenapadá však obilniny. Dispozičními faktory je vysoká vlhkost v porostu v průběhu dubna a první polovině května. Dále nadměrné hnojení dusíkem či dlouhodobá zamokřenost pozemku. Hlízenka obecná se projevuje jako měkká rychle se rozšiřující hniloba. Napadená pletiva jsou pokryta charakteristickým vatovitým myceliem. Původce přetrvává ve formě sklerocií, na kterých se tvoří plodničky s vřecky a askosporami. Ty jsou roznášeny vzduchem. Zdrojem infekce je půda. Životnost sklerocia bývá 8-10 let (Baranyk et al. 2007).

Podle Prokinové (2014) půdní patogen *Coniothyrium minitans* parazituje na sklerociích patogenu a změnšuje jejich zásobu v půdě. Další povolený přípravek, jež napadá sklerocia obsahuje účinnou složku *Pythium oligandrum*. Je zde možné využít i chemickou fungicidní

ochranu, která je nejúčinější na počátku kvetení. Biologická ochrana však bývá adekvátní náhradou.

V jarním období, koncem dubna či začátkem května, vyrůstají ze sklerocií plodničky (viz obr. 1). V nich se tvoří spóry a dochází k infikaci hostitelské rostliny v době květu. Zvýšení tlaku této choroby napomáhá minimalizace ve zpracování půdy, kdy zůstanou sklerocia na pozemku a v optimálních podmínkách pro svůj rozvoj v dalším roce. Infekce půdy je často způsobená napadeným osivem. Rostina je infikovaná v době kvetení. Houba napadá celou rostlinu (Purdy 1979).

Vývojový cyklus *Sclerotinia sclerotiorum*



Obr. 1 – Životní cyklus S. sclerotiorum na ozimé řepce (Rollins et al. 2014, upraveno)

U silně napadených rostlin se stonky lámou. K lámání dochází i na postranních větvích. Při napadení šešulí dochází k jejich žloutnutí a zasychání. I uvnitř šešule můžeme najít mycelium houby se sklerocii. Rostlina postupně odumírá. Příznaky choroby na stonku se podobají příznakům napadení patogenem *Leptosphaeria maculans*. Rozdílem je nicméně šedobílé zabarvení infikovaných stonků a přítomnost sklerocií (Baranyk et al. 2007)

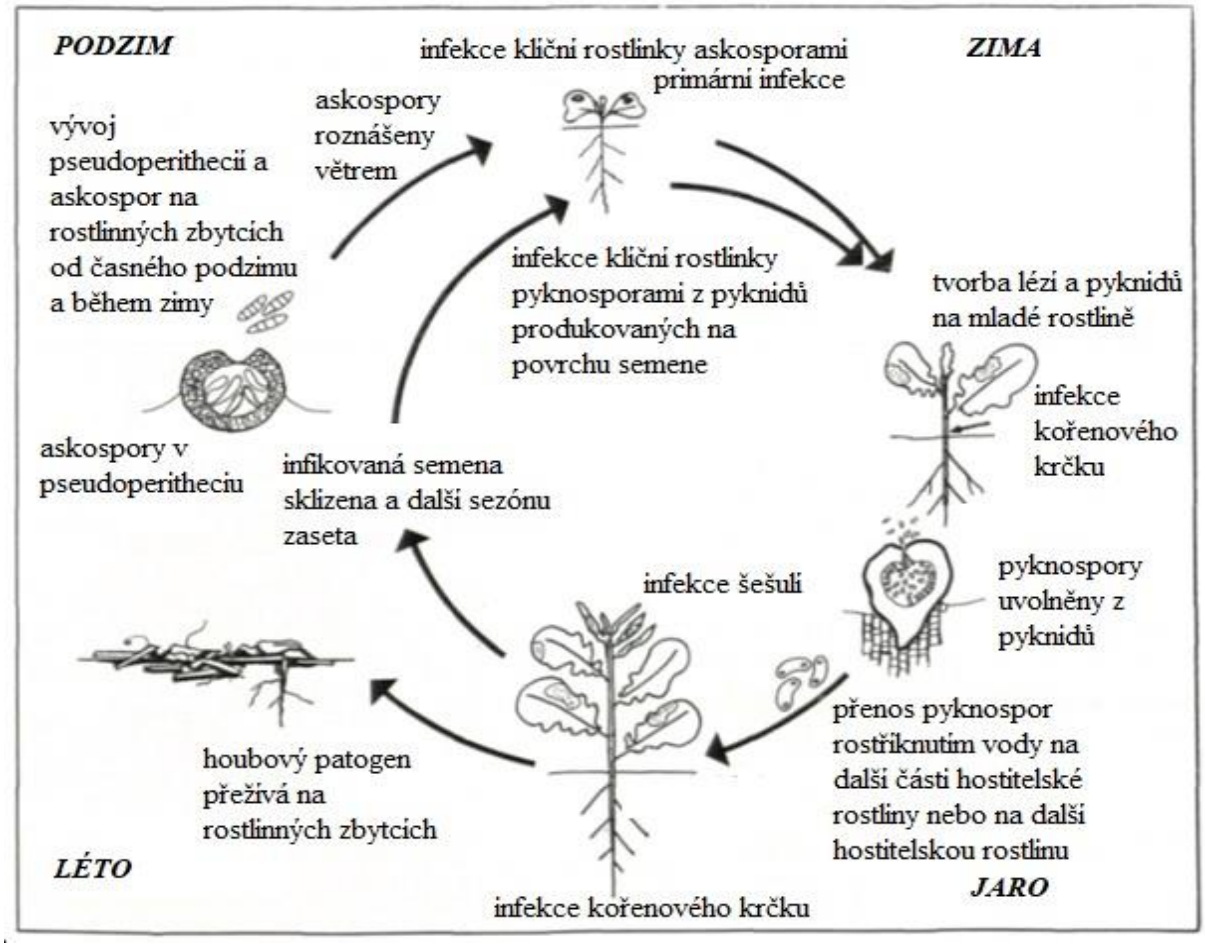
3.2.2 Fómové černání stonků řepky

Říše: Fungi
Oddělení: Ascomycota
Třída: Dothideomycetes
Řád: Pleosporales
Čeleď: Leptosphaeriaceae
Rod: *Leptosphaeria*
Druh: *Leptosphaeria maculans*
(Rouxel & Balesdent 2005)

Leptosphaeria maculans je jednou z nejzávažnějších chorob řepky. Původcem je houba *L. maculans*, nepohlavní stádium *P. lingam*, přičemž askospory hub způsobují infekci řepky. Při napadení rostliny se tvoří na listech léze, ve kterých jsou patrné pyknidy. U starších rostlin nacházíme šedé skvrny s tmavým okrajem na kořenovém krčku. Napadené pletivo trouchniví, nekrózy napadají i kořeny. Při silném napadení rostlina nouzově dozrává. Semena v šešulích jsou nedostatečně vyzrálá a deformují. Ztráty na výnosu mohou být 20–50 % (Prokinová 2014). Zdrojem infekce je půda, posklizňové zbytky a osivo. *L. maculans* napadá převážně rostliny čeledi Brassicaaceae. Je možné ji nalézt i na zelenině (květák, kapusta) dále na hořčici a kukuřici. Napadá též některé plevele, jako je penízek rolní či kokoška pastuší tobolka. Dispozičními faktory je mírná zima s dlouhodobým nadměrným úhrnem srážek. Děštivé a chladné jaro také napomáhá k rozvoji choroby (Kužma et al. 1996).

Původce produkuje pseudoperithecia. Z nich se uvolňují askospory. Při styku s rostlinou řepky vzniká nekrotrofní fáze a askospora prorůstá epidermis (viz obr. 2) (Rouxel et Balesdent, 2005).

Vývojový cyklus *L. maculans*



Obr. 2: Vývojový cyklus L. maculans na řepce ozimé (Rouxel & Balesdent 2005, upraveno).

Velmi podobná tomuto patogenu je *Leptosphaeria biglobosa*. *L. biglobosa* vyrůstá zpod epidermis. Houba infikuje rostlinu askosporami uvolněnými z předchozího vegetačního roku. Infekce může působit až po dobu 5 let. Askospory jsou schopny přemisťování po pozemku v průměru do vzdálenosti 50 metrů. K prvním projevům nákazy dochází již v dubnu (Toscano-Underwood et al. 2003).

Vhodnou preventivní ochranou je výsev ošetřeného osiva, odstup v pěstování řepky minimálně tři roky. V letech, kdy se řepka nezařazuje do osevního postupu, je vhodné zasít obilniny, luskoviny či jetelotravní směsi. Důkladné zapravení posklizňových zbytků a volba odolných odrůd. Důležitá je také likvidace výdrolu. Jeho nezapravení do půdy či nezničení vhodným herbicidem poskytuje vhodné podmínky pro vývoj patogenu. Ten může být zdrojem infekce pro sousední pole. Důležité je udržovat pole bezplevelné. Plevel v tomto případě funguje též jako hostitel patogenů mimo vegetační období a zvyšuje vlhkost vzduchu (Prokinová 2003).

Chemické ošetření se preventivně provádí obvykle již na podzim. Účinné jsou morforegulátory s fungicidním účinkem. Jarní ošetření se provádí podle stavu porostu. Postřiky s aktivní složkou fluquinconazol či hnojivo s účinnou látkou flutriafol, je další vhodnou

alternativou. Preventivní použití chemické ochrany je žádoucí, pokud v období vysokých teplot dochází zároveň vyšším úhrnům srážek. Je však nutné mít na paměti, zda se vyplatí aplikovat fungicid, pokud na porostu nejsou znatelné příznaky choroby. Prevence je jistě důležitá, vhodné je ale uváženě volit postřiky na ochranu rostlin, aby nedocházelo k nadměrně vysokým nákladům, které by razantně snížili finanční prospěch z pěstované plodiny (Málek et al. 2011).

V biologické ochraně je povolen přípravek s deklarovanou účinnou složkou *Pythium oligandrum* (Prokinová 2014).

3.2.3 Padlí brukvovitých *(Erysiphe cruciferarum)*

Říše: Fungi
Třída: Leotiomycetes
Čeleď: Erysiphaceae
Rod: *Erysiphe*
Druh: *Erysiphe cruciferarum*
(ÚKZÚZ 2014 a)

Hostitelskými rostlinami jsou všechny rostliny čeledi brukvovité i např. mákovité. Příznakem napadení jsou bílé pavučinové skvrny na listech, stonku i šešulích. K infekci většinou dochází již na podzim. Je-li během vegetace teplota okolo 15-20 °C s vysokou vzdušnou vlhkostí, patogen má optimální podmínky pro vývoj a napadení (Pfeufer et al. 2017).

Původcem *Erysiphe cruciferarum* jsou jednobuněčné soudkovité konidie. Symptomy se projevují na vrchní i spodní straně listů. Na vrchní straně se objevují pavučinové skvrny, které postupně překryjí většinu plochy listu. Příznaky jsou stejné i na stonku a šešulích, později se skvrny vybarvují béžově hnědě, někdy až do růžova. U semen v infikovaných šešulích nedochází k dozrávání. Houba přežívá ve formě kleistothecií. Patogen se šíří vzduchem pomocí konidií (Pfeufer et al. 2017).

3.2.4 Nádorovitost kořenů brukvovitých *(Plasmodiophora brassicae)*

Říše: Protozoa
Řád: Plasmodiophorales
Čeleď: Plasmodiophoraceae
Rod: *Plasmodiophora*
Druh: *Plasmodiophora brassicae*
(ÚKZÚZ 2014 b)

Patogen napadá brukvovité zeleniny, olejniny i brukvovité plevele. Rostlina hůře přijímá živiny a vodu, vadne a netvoří šešule (Ryšánek et al. 2018). Preventivním opatřením je udržování optimálního pH vápněním. Dále není vhodné využívat pozemek náchylný k zamokření (Baranyk et al. 2007). Zdrojem infekce je půda. Životnost patogenu bývá minimálně pět let. Příznakem napadení je nedostatečný růst, rostliny usychají a listy mají nafialovělou barvu. Projevem onemocnění jsou nádory na postranních kořenech a později na centrální části. V počáteční fázi vývoje rostlin nejsou příznaky zřetelně viditelné. První

příznaky lze rozpoznat od fáze pěti pravých listů. Silné napadení kořenů rostlin na podzim nemusí nutně znamenat výnosou depresi a odumírání rostlin. Problém nastává, pokud jsou příznaky viditelné již na podzim u nadzemních částí rostlin. Dispozičními faktory je teplota nad 18 °C v době vzcházení rostlin, vysoká vlhkost a nízké pH půdy (Prokinová 2014).

Dle Prokinové (2014) je nejlepší prevencí volba vhodné odrůdy, správný osevní sled s odstupem pěstování řepky alespoň tři roky, výsev spíše v pozdějším termínu a důkladné zapravení posklizňových zbytků. Chemické ošetření se provádí preventivně na podzim. Osvědčila se též aplikace dusíkatého vápna, která musí být dodána ve vysokém množství a zapravena do půdy. Biologická ochrana není k dispozici.

3.2.5 Šedá plísňovitost brukvovitých

Dle Prokinové (2014) je původcem *Botrytis cinerea*. Zdrojem infekce je půda a hostitelské rostliny. Houba napadá mnoho kulturních i planých druhů. Šíří se vzduchem a přežívá na rostlinných zbytcích. Chladnější počasí s teplotami okolo 10–15 °C s dlouhodobým vyšším úhrnem srážek podporuje infekci. Dispozičními faktory je dlouhodobé souvislé ovlhčení porostu, nadměrné hnojení dusíkem či přílišné zahuštění porostu. Patogen snadněji infikuje rostliny poškozené mrazem, kroupami či po primárním napadení jiným houbovým patogenem. Příkladem je častý výskyt tohoto patogenu na pletivech poškozených *S. sclerotiorum*. *B. cinerea* napadá celou rostlinu. Příznakem jsou šedobílé až béžové okrouhlé skvrny s šedohnědým myceliem, které silně práší. Objevují se na listech, stoncích a nakonec i na poupatech a šešulích. Napadení se šíří po celém obvodu stonku, rostlina se nevyvíjí. Postupně vadne, žloutne a odumírá.

Preventivní ochranou je důkladné zapravení posklizňových zbytků orbou či hlubším kypřením. Dále optimální dávka dusíku, která zabrání polehnutí porostu. Biologická ochrana není možná. Chemická ochrana též není dostupná, aplikace fungicidů proti ostatním chorobám má však přesto tlumivý účinek i na tento patogen (Prokinová 2014).

3.3 Verticiliové vadnutí řepky (*Verticillium longisporum*)

Říše: Fungi
Oddělení: Ascomycota
Pododdělení: Pezizomycotina
Třída: Sordariomycetes
Podtřída: Hypocreomycetidae
Řád: Glomerellales
Čeleď: Plectosphaerellaceae
Rod: *Verticillium*
Druh: *Verticillium longisporum* (C. Stark)
(MycoBank 2019)

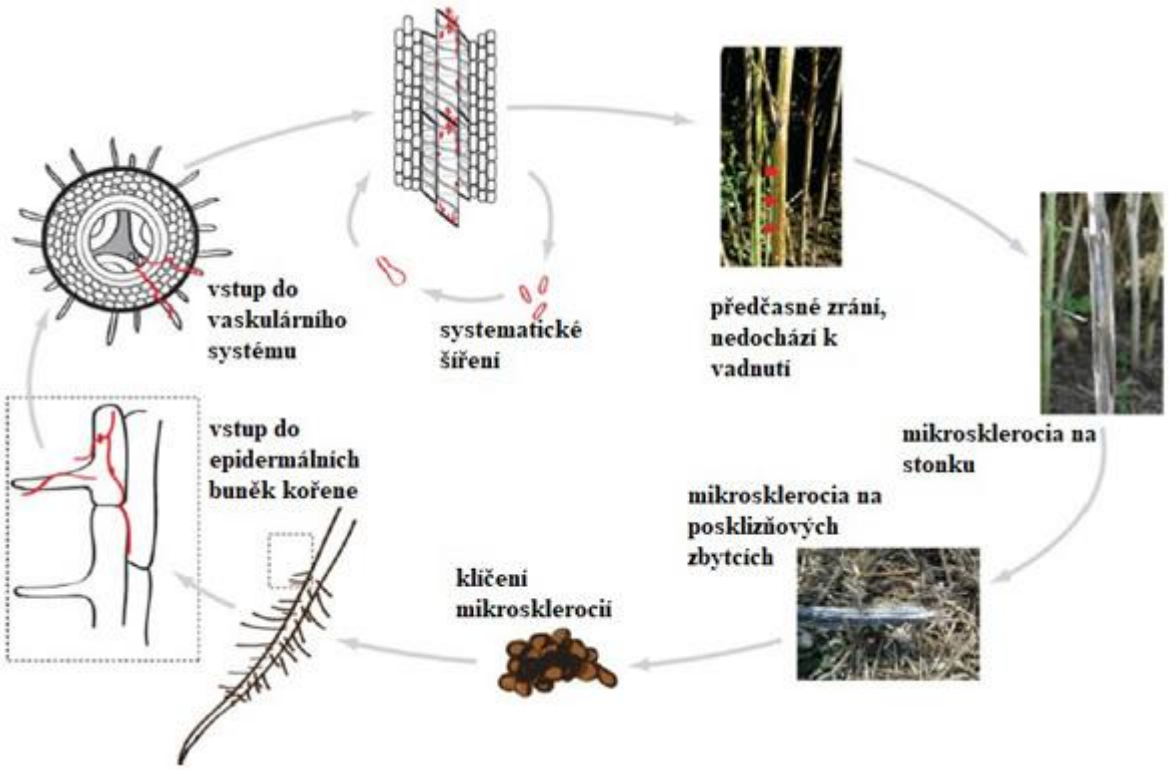
Verticilliové vadnutí je způsobeno celým komplexem hub rodu *Verticillium* (*V. longisporum, V. dahliae, V. albo-atrum*). Přičemž *V. longisporum* způsobuje spíše předčasné dozrávání rostlin (Hornig 1987). Je to vřeckovýtrusá houba, která se vlivem nárustu

ploch pro pěstování stává poměrně významným problém v posledních letech (Baranyk et al. 2007).

3.3.1 Příznaky a projevy verticiliového vadnutí řepky

První příznaky jsou pozorovány na listech. Nejstarší listy v době květu a tvorby šešulí podélně žloutnou. Konkrétně žloutne jedna polovina listů. Stonek je v místě napadení zbarven tmavošedě až černě. Kořenový systém je slabý (Heale & Karapapa 1999). Během odumírání rostlin dochází k tvorbě drobných černých mikrosklerocií. Rostliny nouzově dozrávají a poléhají. Transport vody v rostlině je ovlivněn tvorbou vaskulárních okluzí. Napadené rostliny lze lehce vytáhnout z půdy. Počáteční příznaky choroby lze snadno zaměnit s patogeny jiných rodů. Nejviditelnější příznaky jsou pozorovatelné až ve fázi dozrávání. Patogen po napadení xylému hostitele postupně prorůstá až do primární kůry. Vzniká podélná léze na stonku, ve které se tvoří mikrosklerotia (Depotter et al. 2016).

3.3.2 Životní cyklus *V. longisporum*



Obr. 3: Životní cyklus Verticillium longisporum (Knüfer 2011, upraveno)

Zdrojem infekce patogenu *V. longisporum* jsou mikrosklerocia přežívající v půdě, osivo a infikované posklizňové zbytky. Za vhodné podmínky napadení se považuje suché a teplé počasí s teplotami 20–25 °C, kdy patogen infikuje rostlinu přes kořeny v oblasti dlouživého růstu a dále se rostlinou šíří akropetálně. Xylem je napaden myceliem a vytváří konidie. Do

cévního systému celé rostliny se dostává transportem vody. Houba dále tvoří mikrosclerocia, která se z rostliny uvolňují a přežívají v půdě až 8 let (Heale & Karapapa 1999).

V. longisporum se může nacházet ve třech fázích vývoje. V saprofytické, dormantní a parasitické. Mikrosclerocia klíčí na kořenech hostitelské rostliny (viz Obr. 3). Patogen do epidermálních buněk kořene hostitelské rostliny vstupuje díky penetraci kořenových epidermálních buněk. Průnik probíhá hyfálními špičkami do vaskulárního systému (Eynck et al. 2007). Zde se patogen šíří cévními svazky stonku. Později patogen přechází z xylému do parenchymatických buněk a dochází k tvorbě mikrosklerocií (Knüfer 2011).

3.3.3 Hostitelský okruh

Zástupci hub rodu *Verticillium* napadají mnoho druhů plodin (řepka, slunečnice, brambory, bavlník, olivovník, rajče, salát, vodní meloun). Nicméně nejzásadnější škody způsobují právě na plodinách čeledi brukvovité. Dva hlavní zástupci rodu *Verticillium*-*V. longisporum* a *V. dahliae* jsou patogeny vyskytující se na řepce (Ralhan et al. 2013).

3.4 Možnosti ochrany řepky olejné proti patogenu *V. longisporum*

Patogen *Verticillium longisporum* byl poprvé objeven v Německu v roce 1960. Od té doby se houba šíří po celém světě a je nyní celosvětově označována jako vysoce rizikový patogen (Depotter et al. 2016). *V. longisporum* způsobuje tracheomykózu. Příznaky na listu jsou často pozorovány jako chlorotické a nekrotické skvrny mezi žilkami (Karapapa et al. 1997). Toto onemocnění ohrožuje agroekonomickou udržitelnost produkce řepky v mnoha částech světa, zejména v Evropě (Zeise a von Tiedemann 2001, 2002; Zhou et al. 2006).

Kvůli kolonizaci rostlinného xylému chemické fungicidy nekontrolují nemoc. Se zvětšováním plochy řepky při rotaci, problémy s *V. longisporum* získávají další význam. Protože je chemická kontrola nemožná, existuje několik metod, které jsou aplikovány ke snížení závažnosti infekce patogenem *Verticillium*. Do těchto metod je zahrnuto dlouhodobé střídání plodin, solarizace a úprava půdy ligninem (Heale & Karapapa 1999; Tjamos et al. 2004; Debode et al. 2005). Jednou z nejvhodnějších možností kontroly je vývoj odolných kultivarů plodin. V současné době dostupné komerční odrůdy jsou obecně náchylné nebo vykazují nízkou toleranci k *V. longisporum* (Rygulla et al. 2008).

Použití biologického kontrolního činidla (BCA) se jeví jako slibný přístup (Berg 1996; Kurze et al. 2001; Whipps 2001; Lugtenberg et al. 2002; Tjamos et al. 2004). Mechanismy působení BCA proti chorobám rostlin zahrnují antibiózu, parazitismus a sekreci enzymů, jako je glukózooxidáza, chitináza a glukanáza, stejně jako indukce rezistence vůči chorobám v hostitelských rostlinách (Whipps 2001).

Výhody používání biopesticidů jsou tyto:

- Ekologický přínos; ze své podstaty méně škodlivé a menší zatížení životního prostředí.
- Účinnost na cílovou skupinu; navrženy tak, aby ovlivňovaly pouze jednoho konkrétního škůdce nebo v některých případech několik cílových organismů.
- Přínos pro životní prostředí; často účinné ve velmi malém množství, rychle se rozkládají, což vede k nižší expozici.

- Vhodnost; v některých případech je biologická ochrana jedinou možnou volbou (Canan Usta 2013).

3.4.1 Biologická ochrana proti patogenu *V. longisporum*

Tento způsob ochrany nebyl dříve konvenčně příliš využíván, nicméně v poslední době bývá adekvátní náhradou za klasické syntetické prostředky. Jde o podporu antagonistů vůči škodlivým organismům (Cook 1993). Dochází k inhibici růstu, infekci či rozmnožování jednoho organismu pomocí jiného organismu. Biologická kontrola je jednou z alternativ k použití širokospektrálních pesticidů, které ničí užitečný hmyz i škůdce. Pro výběr úspěšné biologické kontroly je zásadní určit škůdce spolu s jeho populační úrovní a okolnostmi napadení. Na rozdíl od chemických přípravků, nezanechávají biologická kontrolní činidla, nazývaná také bioagens, žádná dlouhodobá rezidua, která zůstávají v životním prostředí a také neprosakují do podzemních vod. Biologická kontrola minimalizuje obavy o životní prostředí, právní předpisy a veřejnou bezpečnost (Csanyi 2021).

Ve fytopatologii se tento termín vztahuje na použití mikrobiálních antagonistů k potlačení chorob, jakož i na použití hostitelsky specifických patogenů k potlačení populací plevelů. Organismus, který potlačuje škůdce nebo patogeny, označuje jako prostředek biologické kontroly (BCA). Obecněji se pojem biologická kontrola používá pro extrahované přírodní produkty z různých zdrojů. Těmito formulacemi mohou být velmi jednoduché směsi přírodních složek se specifickými aktivitami nebo komplexní směsi s více účinky na hostitele i na cílového škůdce nebo patogena (Pal & McSpadden Gardener 2006).

Houbové rostlinné patogeny patří mezi nejdůležitější faktory, které každoročně způsobují vážné ztráty na zemědělské produkci. Během svého životního cyklu rostliny a patogeny vzájemně působí s širokou škálou organismů. Tyto interakce mohou významně ovlivnit zdraví rostlin různými způsoby. Způsoby působení biokontrolně aktivních mikroorganismů při kontrole houbových chorob rostlin zahrnují hyperparazitismus, predaci, antibiózu, kompetici a vyvolanou rezistenci. Mezi různé metody aplikace biokontrolních látek patří: aplikace přímo na infikovanou oblast k zaplavení patogenu, aplikace na jednom místě, kde se mikroorganismy aplikují na jedno místo (každý rok) s nižší populací, které se pak množí a rozšiřují do dalších částí rostlin a poskytují ochranu proti patogenům a jednorázovou nebo příležitostnou aplikaci, která udržuje populace patogenů pod prahovými hodnotami. Budoucí vyhlídky biokontroly chorob rostlin jsou slibné a s rostoucí poptávkou pěstitelů po těchto produktech je možné použít bioagens jako účinnou strategii pro zvládání chorob rostlin, zvýšení výnosu, ochranu životního prostředí a biologických zdrojů a přistupovat tak k udržitelnému zemědělskému hospodaření (Heydari & Pessarakli 2010).

Dřívější studie (kultivar Talent) ukázaly, že například antagonistická bakterie *S. plymuthica* (kmen HRO-C48) a *P. chlororaphis* (kmen MA 342) byly schopny potlačit *V. longisporum* jak ve skleníkových, tak v polních experimentech (Hammoudi 2007). Gramnegativní *P. chlororaphis* (MA 342) byl izolován z kořenů *Empetrum nigrum* (Hökeberg et al. 1997; Johnsson et al. 1998) a je aktivním organismem v registrovaných produktech Cedomon a Cerall (BioAgri AB, Uppsala, Švédsko), které byly použity na více než 1,5 milionu hektarů proti semenným a půdním houbovým patogenům ječmene a pšenice. Obě

antagonistické bakterie byly testovány na několika kultivarech řepky ke snížení infekce *P. lingam* (Hökeberg 2006).

Müller & Berg (2008) zdokonalili techniky ošetření semen pro kontrolu *V. longisporum* s *S. plymuthica* ve skleníkových pokusech a vykazovaly nejvyšší účinnost, když aplikace *S. plymuthica* proběhla bio-primováním na semena řepky. Bio-primování je nová technika ošetření semen, která kombinuje inokulaci semen prospěšnými biologickými organismy společně s hydratací semen. Cílem této studie bylo vyhodnotit citlivost různých kultivarů proti infekci *V. longisporum* a otestovat, zda *S. plymuthica* (HRO-C48) a *P. chlororaphis* (MA 342) aplikovaná samostatně nebo v kombinacích poskytuje kontrolu proti *V. longisporum* v různých kultivarech řepky. Obě antagonistické rhizobakterie dokázaly snížit infekci *V. longisporum* výrazně. Bakterie se usazují v rhizosféře a poskytují ochranu v rozmezí od 46 % do 75 %. Procento zdravých rostlin bylo významně vyšší než u neošetřených kontrol. Procentní snížení se významně nelišilo mezi antagonisty *S. plymuthica* a *P. chlororaphis* nebo jejich kombinací.

Vývoji bioagens je věnována zvýšená pozornost v posledních dvaceti letech. V České republice je registrováno 16 biopreparátů, 28 bioagens a vhodné je zmínit i tzv. pomocné přípravky, které však nejsou vedeny jako přípravky na ochranu rostlin, nýbrž jako hnojiva. Hrají však významnou roli v boji s houbovými patogeny a zlepšují celkovou vitalitu pěstovaných plodin (Ondráčková et al. 2019).

3.4.2 Mechanismy biologické ochrany

Do biologické ochrany je zařazována celá řada interakcí mezi organismy. K jejich odlišení a klasifikaci se charakterizovaly jednotlivé mechanismy biologické ochrany. Ve výsledku však každý mechanismus zahrnuje určitý antagonismus patogenu přítomností a účinkem jiných mikroorganismů se kterými je konfrontován (Heydari et al. 1997).

Dojde k fyzickému kontaktu patogenu s mikroorganismem, který se projeví přímým antagonismem. Z tohoto pohledu se jedná o hyperparasitismus rostlinných patogenů. Opakem je nepřímé působení mikroorganismů na patogen – nepřímý antagonismus (Harman et al. 2004).

Antibióza

Mnoho mikroorganismů produkuje antibiotické toxiny, které jsou schopny při různé koncentraci způsobit otravu či smrt jiným mikroorganismům. Z výzkumů bylo prokázáno, že antibiotický účinek mikroorganismů má vliv na regulaci růstu napadeného patogena. V několika studiích byla zkoumána produkce antibiotických toxinů vybraných bioagens. Bylo prokázáno, že spousta biologických preparátů je schopná produkce antibiotik, které omezují růst a vývoj patogenů (Thomashow et al. 1990).

Mykoparasitismus

Definice mykoparasitismu je přímé napadení patogenu parazitem (vybrané bioagens). Tento stav může fungovat k rozpoznání hostitele, dále řízeným růstem k jeho hyfám, penetrací a nakonec opuštěním hostitele. Při mykoparasitismu lze určit čtyři typy hyperparazitů. Hypoviry, predátory, fakultativní parazity a obligátní patogeny. V případě řízeného růstu hyf

rodu *Trichoderma* k hyfám *Rhizoctonia solani* se buď parasitismus může projevovat přímou penetrací hostitele, či omotáváním kolem hostitelských hyf infekčním myceliem (Milgroom & Cortesi 2004).

Kompetice

Přepokládá se, že mikroorganismy si konkurují, pokud jde o živiny, vodu, vzduch a prostor. V souvislosti s antagonismem v biologické ochraně se zdá, že kompetice o živiny je významnou složkou ochrany rostlin, tudíž má značný význam. Výzkum prokázal, že je snaha nepatogenních organismů o kolonizaci rostliny za účelem její ochrany. Došlo k odčerpání substrátů, které by mohly být dostupné pro růst patogenů (Anderson et al. 1988).

Produkce metabolitů

Biologické přípravky často produkují vedlejší metabolity, které jsou schopny ovlivnit rostlinný patogen. Mezi tyto metabolity patří například enzymy. Schopnost narušit například bílkoviny, celulózu, chitin a dokonce i DNA mají lytické enzymy. Využití metabolitů v boji proti nežádoucím rostlinným patogenům je účelné a studiemi prokázané (Bull et al. 2002).

Příklady různých účinných organismů využitelných pro ochranu rostlin

Trichoderma harzianum je mykoparazitická půdní houba, která dokáže mnoha způsoby potlačovat škodlivé patogeny v půdě. Antibióza neboli potlačování růstu jiných organismů je jedním z příkladů. Trichoderma je také nutričním konkurentem v půdě a je svými enzymy schopna rozkládat buněčnou stěnu patogenů. Výzkum prokázal účinky například proti *Botrytis cinerea* či Fusariozám (D'Ercole et al. 2000).

Dalším příkladem organismu je *Pythium oligandrum*. Houba žije jako saprofyt, ale chová se také jako parazit vůči mnoha patogenním houbám (*Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea,* Fusaria atd.). *P. oligandrum* má přímé účinky (mycoparasitismus, antibióza, kompetice) a nepřímé účinky (stimulace rostlin pro účinné obranné reakce a podpora růstu rostlin). Hyfy pronikají do buněk patogenních hub a čerpají z nich důležité živiny. Z výzkumů vyplývá, že dochází k různým interakcím, v závilosti na podmínkách prostředí (Al-Rawahi & Hancock 1998).

Hyfy půdních hub rodu *Clonostachys* využívané u mnoha biologických přípravků mohou napadat škodlivé organismy (*Fusarium, Pythium, Sclerotinia* atd.) a způsobují degradaci buněčných stěn patogenů. Tento účinný organismus také produkuje sekundární metabolity, které se projevují antibiózou (Ondráčková et al. 2019).

Dalším příkladem je bakterie rodu *Bacillus*. Tato bakterie je schopná vytvářet film na kořenech a zároveň produkovat látky, které znemožní napadení kořenů patogeny. Dále vykazuje se projevuje antibiózou vůči patogenům (*Botrytis cinerea, Alternaria brassicicola* atd). Intenzita tohoto účinku je závislá na podmínkách prostředí (Hall et al. 1986).

Bakterie rodu *Pseudomonas* produkují antifungální látky, které narušují vývoj velké skupiny patogenů (*Rhizoctonia, Fusarium* atd.). Produkují i látky podporující růst rostlin. Dobře snáší výkyvy vnějších podmínek (Erdogan & Benlioglu 2010).

Výpis přípravků použitých v předložené diplomové práci:

- Polyversum (*Pythium oligandrum*)
- Contans (*Coniothyrium minitans*)
- Xilon GR *(Trichoderma asperellum)*
- Serenade ASO (*Bacillus subtilis*)
- Integral Pro *(Bacillus amyloliquefaciens)*
- Hirundo (*Bacillus* spp.)
- Prometheus (*Pseudomonas* spp.)

4 Metodika

4.1 Polní maloparcelkové pokusy

4.1.1 Charakteristika lokality

Pokus byl založen 31. 8. 2019 v Chlumci nad Cidlinou. Vzorky byly odebrány 2 dny po sklizni náhodným odběrem z celé parcelky.

Charakteristika lokality, na které byl založen pokus:

SELGEN, a. s. Chlumec nad Cidlinou
Půdní druh: jílovitý
Zkuš. oblast: teplá oblast
Nadmořská výška: 240 m.n.n
Průměrná roční teplota: 8.7 °C
Roční srážky: 642 mm
Předplodina: pšenice ozimá

4.1.2 Agrotechnické zásahy

Pozemek, na němž byl založen pokus byl připraven obvyklým konvenčním způsobem. Kvůli stíženým klimatickým pomínkám byl pozemek před setím místo jedné přípravy kompaktorem Verso použit na pozemku dvakrát.

Pro hnojení pozemku byly použity klasická hnojiva, síran amonný, ledek amonný s vápencem, dusičnan amonný v kombinaci se síranem amonným a jako poslední hnojivo opět ledek amonný s vápencem.

Pro ošetřování porostu bez použití fungicidů byla využita běžná praxe. Bylo aplikováno 6 pesticidů, některé opakovaně, v devíti různých termínech.

Příprava pokusného pozemku proběhla dle standardů běžné agrotechnické praxe – viz Tab. 1.

Tab. 1: Mechanická příprava pozemku před setím

Datum	**Úkon**
02.08.2019	diskování strnitě
25.08.2019	hluboké podrývání Terraland
27.08.2019	2× příprava kompaktorem Verso

Pokus byl hnojen v uvedených termínech viz Tab. 2. Hnojivy SA, LAV 27, DASA a opět LAV 27.

Tab. 2: Seznam použitých hnojiv na pokusném pozemku

Datum aplikace	Druh hnojiva	Obsah živin v %		
			N	SO_4
25.08.2019	SA	24 N + 24 S	24	24
05.03.2020	LAV 27	27 N	40	
05.03.2020	DASA	26 N + 13 S	52	26
26.03.2020	LAV 27	27 N	67	

Během vegetace byl pokus ošetřen dle běžné praxe (viz Tab. 3) bez použití fungicidů a stimulantů růstu.

Tab. 3: Seznam použitých přípravků na ochranu rostlin bez fungicidního ošetření

Datum	Přípravek	Dávka/koncentrace
12.09.2019	Butisan Star	2,5 l/ha
20.09.2019	Nurelle D	0,6 l/ha
01.10.2019	Agil 100EC	0,5 l/ha
01.10.2019	Galera autumn	0,3 l/ha
3., 10.10.2019	Axcela	6 kg/ha
14.10.2019	Proteus 100 OD	0,65 l/ha
08.04.2020	Nurelle D	0,6 l/ha
06.05.2020	Proteus 110 OD	0,75 l/ha

4.1.3 Biologický materiál

Pokus byl na lokalitě založen ve třech opakováních na pozemku o rozměrech 30 × 70 metrů. Na této ploše byly rozmístěny jednotlivé parcelky. Sklizňová plocha parcelek byla 10 m^2 (viz Tab. 4).

Tab. 4: Rozměry parcelek v pokusu

Délka (m)	8,7
Šířka (m)	1,15
Sklizňová plocha (m^2)	10
Počet řádků	10
Meziřádková vzdálenost	11,5
Počet opakování	3

Do pokusů byla vybrána polopozdní odrůda Kicker a raná odrůda Alicante. Kicker vykazuje odolnost vůči patogenu *V. longisporum* na základě dlouhodobých pozorování Svazu pěstitelů a zpracovatelů olejnin, zatímco odrůda Alicante se z dosavadních pozorování SPZO jeví jako senzitivní vůči patogenu *V. longisporum*.

Kicker

Odrůda Kicker je středně raný až polopozdní hybrid odolný proti poléhání. Rostlina je středně vysoká – průměrně 165 cm. Vyznačuje se vysokým výnosem semene. Středně vysoký až vysoký je i obsah oleje. Společnost Rapool při zkouškách vyzdvihla vysokou odolnost vůči hlavním houbovým chorobám řepky. Odrůda má geneticky podmíněnou rezistenci vůči *Phoma lingam* a vykazuje odolnost proti patogenu *Verticillium longisporum*. Rostlina má velmi rychlý start, přesto výrazně nepřerůstá. Listová růžice je na podzim usazená. Odrůda také velmi dobře přezimuje. Kořeny jsou rozvětvené a významně obohacené o vyšší podíl jemného kořenového vlášení. Zvládá proto lépe přijímat živiny a je odolnější ke stresu na těžkých a studených jílovitých půdách (Štěpánek 2020).

Alicante

Odrůda Alicante je raný hybrid, který se vyznačuje vysokými výnosy a dobře se přizpůsobuje podmínkám prostředí a různým oblastem pěstování. Má geneticky podmíněnou odolnost proti pukání šešulí. Jde o středně vysokou rostlinu s průměrnou výškou 160 cm. Tato odrůda je vhodná pro včasné výsevy i výsevy v obvyklém agrotechnickém termínu. Na podzim vytváří přisedlé listové růžice s mohutným kořenovým systémem. Dobře přezimuje. Poměrně brzy se sklizí, přesto je její výnos srovnatelný s pozdními odrůdami. ÚKZÚZ využívá Alicante jako kontrolní odrůdu v registračním procesu (OSEVA, a. s. 2016).

Použité biologické preparáty:

Polyversum

Tento přípravek se používá na ochranu proti plísním (Chromista) ve formě smáčitelného prášku. Jeho hlavní účinnou složkou je *Pythium oligandrum*. Přípravek obsahuje oospory tohoto organismu v koncentraci 1×10^6 spór na 1 g přípravku. Ošetřuje se jím nejen řepka, ale i další polní plodiny jako je např. pšenice, mák, brambory, sója ad. Přípravek nenapadá

rostliny, ale pouze plíseň na nich. *P. oligantrum* proniká svými vlákny do buněk hostitele a čerpá z něho živiny a potřebné látky. Pomocí enzymu rozkládá jejich těla (mycelia) a některé rozmnožovací orgány (sklerocia). Jde o takzvaný mykoparazitismus. Je určen k využití proti antraknóze, fuzarióze, rzi, stéblolamu, helmintosporióze, verticiliovému vadnutí, sklerotiniové hnilobě a fomové hnilobě (Biopreparáty, s. r. o. 2021).

Contans

Je biologický přípravek, který obsahuje spory parazitické houby *Coniothyrium minitans*. Aplikací tohoto postřiku dojde ke zničení sklerócií patogena *(Sclerotinia sclerotiorum)*. Spory této houby po aplikaci do půdy infikují a parazitují na přítomných sklerociích, která se následně rozloží. Při zamrznutí půdy *C. minitans* pozastavuje svůj růst a po zvýšení teploty začíná houba opět parazitovat sklerocia. Přípravek je možné použít na podzim i na jaře. Odstranění zdrojů infekce z povrchové vrstvy půdy se pohybuje okolo 95–100 % (Bayer S. A. S. 2017).

Xilon GR

Xilon GR je biologický fungicid, který obsahuje účinnou složku kmen T34 aktivní houby *Trichoderma asperellum.* Distribuuje se ve formě mikrogranulátu a po smíchání s vodou zapravuje do půdy. Využívá se k ochraně kukuřice, řepky, slunečnice a sóji proti širokému spektru houbových chorob. Hlavně proti kořenomorce (*Rhizoctonia spp.),* fuzariózám (*Fusarium spp*.), Hlízence obecné (*Sclerotinia sclerotiorum*) a verticiliovému vadnutí (*Verticilium albo-atrum a V. longisporum*). Kromě potlačení těchto chorob, zajišťuje rostlinám lepší dostupnost vody z půdy, významně snižuje obsah škodlivých mykotoxinů, zlepšuje fotosyntetickou aktivitu rostlin a zvyšuje mobilitu fosforu a železa (Kuthan 2021).

Serenade

Tento přípravek je relativně nový biologický fungicid, určený k ochraně nejen polních plodin, ale i zeleniny, ovocných stromů atd. Působí proti houbovým chorobám a celkově k posílení odolnosti rostlin. Dále účinkuje na fuzariózy, padlí, hlízenku, černě či fomu. Přípravek je také vhodný pro ekologické zemědělství. Serenade obsahuje přírodní antibiotikum, které se běžně vyskytuje v půdě. Jedná se o nepatogenní bakterii *Bacillus subtilis* a to v koncentraci 1000 milion CFU/g. Přípravek aplikujeme před výskytem choroby. Pokud aplikujeme až při zjištění prvních příznaků choroby, můžeme tím snížit účinnost fungicidu. Je nutné dodržet odstup od srážek minimálně 3–4 hodiny. V případě rozvoje choroby na napadené rostlině, je nezbytné zkrátit intervaly mezi jednotlivými aplikacemi (Bioagens 2019).

Integral Pro

Integral Pro je biologické fungicidní mořidlo s fungicidním a fungistatickým účinkem. Jeho účinný organismus po kontaktu s patogenem ničí vlákna hub. Slouží k ochraně rostlin ve formě kapalného suspenzního koncentrátu. Využívá se pro moření osiva řepky proti fómové hnilobě brukvovitých a stimuluje rostliny řepky k přirozené obraně rostlin před napadením

dřepčíky rodu *Psylliodes* a *Phyllotreta*. Účinnou látkou v tomto přípravku je *Bacillus amyloliquefaciens* kmen MBI 600 v koncentraci 2,2 × 1010 CFU/ml (Agrofert, a. s. 2019).

Hirundo

Obsahuje bakterie rodu *Bacillus* v tekuté formě. Jde o biologický přípravek, který je určen do porostů řepky olejky, hořčice seté, máku setého a pro pěstování všech druhů zeleniny. Slouží k ochraně kořene proti houbovým chorobám, preventivnímu ošetření proti hlízence, mineralizaci organické hmoty, zlepšení dostupnosti živin. Dále také dovede potlačovat patogeny v půdě a zároveň stimuluje růst rostliny. Bakterie je velmi odolná. Dostane se až ke kořenům, které chrání před houbovými chorobami. Zvládá vysychání půd, vysoké a nízké teploty a pesticidy. Přípravek se využívá hojně v oblastech s vysokým obsahem humusu, s pH půdy neutrálním nebo slabě zásaditým. Je vhodný i pro ekologické zemědělství (MONAS technology 2019 a).

Prometheus

Preparát Prometheus s obsahem bakterie rodu *Pseudomonas*, které se usadí na kořenech řepky a máku a vytváří s nimi symbiózu. Rostlina získá minerální látky a je chráněna proti stresovým faktorům. Přípravek je vhodný do středně těžkých půd se slabě kyselým, nebo kyselým pH. Slouží k ošetření řepky olejky, máku, slunečnice a zeleniny. Používá se do ozimé i jarní řepky. Plodiny po aplikaci dosahují vyšších výnosů. Aplikace se provádí na podzim, nebo na jaře (MONAS technology 2019 b).

4.1.4 Termíny a dávky aplikovaných přípravků

Aplikace přípravků proběhla v šesti termínech na odrůdě Alicante, z toho jedna varianta je neošetřená kontrola Alicante. Odrůda Kicker je devátá varianta. Pokus byl veden na odrůdě Alicante, která se z pozorování SPZO jeví jako senzitivní vůči patogenu *V. longisporum*. Na tuto odrůdu bylo aplikováno 8 variant vybraných biologických přípravků. Další variantou je odrůda Kicker, u které se zjišťovalo, zda vykáže odolnost proti patogenu *V. longisporum*, jež tuto vlastnost prokázala při pozorování SPZO. Desátou variantou je neošetřená kontrola Alicante.

U první varianty byl před setím 30. 08. 2019 použit přípravek Contans, který se aplikoval 2 kg/ha formou postřiku na povrch mělce nakypřené půdy. Následně se kompaktorem zapravil do hloubky 5 cm.

U druhé varianty byl před setím 30. 08. 2019 použit též přípravek Contans, který se aplikoval ve dvou 2 kg/ha formou postřiku. Druhá varianta byla 12. 03. 2019 ošetřena přípravkem Serenade v množství 1l/ha a 05. 05. 2020 přípravkem Propulse v množství 1l/ha.

Přípravek Polyversum byl aplikován 11. 10. 2019 pouze u varianty 3 v množství 100 g/ha.

U čtvrté varianty byl použit pro moření osiva před setím 31. 08. 2019 přípravek Integral pro v množství 1,6 l/t osiva. 11.10. 2019 byl porost ošetřen postřikem BAS 750 11F v množství 1 l/ha a 05. 05. 2020 přípravkem BAS 762 02F opět v množství 1 l/ha.

Páta varianta byla 11.10. 2019 ošetřena pouze přípravkem TOPSIN M 500 SC. v dávce 1,2 l/ha.

Přípravek Xilon se aplikoval preventivně u šesté varianty 31. 08. 2019 při výsevu do hloubky 2 cm.

Sedmá varianta byla opakovaně ošetřována přípravkem Hirundo v dávce 1 l/ha v termínech 11. 10. 2019, 16. 03. 2020 a v poslední aplikace byla provedena 05. 05. 2020.

Osmá varianta byla v termínech 11. 10. 2019, 16. 03. 2020 a 05. 05. 2020 aplikována ve stejných dávkách 1l/ha postřikem Prometheus.

Devátá varianta je odrůda Kicker.

Desátá varianta je jako kontrola neošetřená odrůda Alicante.

4.1.5 Metodika hodnocení

Na lokalitě byly zadané varianty ve třech opakováních. Na strništi byl spočítán poměr zelených a suchých stonků z 2 m^2 a bylo náhodným odběrem z každé parcelky sebráno 5 stonků, které byly dál využity při laboratorním hodnocení *V. longisporum* a celé skupiny *Verticillium*.

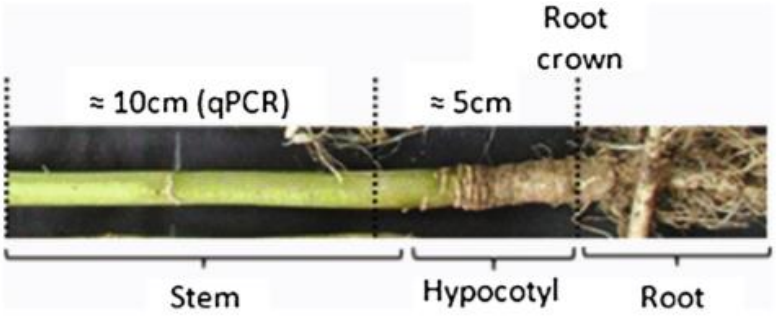
Hodnotil se výnos, HTS a olejnatost na vzorcích z jednotlivých parcelek.

Všechna data byla zpracována v programu MS Excel a následně byla některá data zpracována v programu STATISTICA 12. Byla použita statistická metoda jednofaktorová ANOVA.

4.2 Laboratorní diagnostika

4.2.1 Příprava vzorků

Z každé pokusné parcelky bylo odebráno po sklizni na strništi 5 rostlin. Z rostliny byla odebrána vybraná část pro qPCR analýzu (viz Obr. 4).



Obr. 4: Část stonku nejvhodnější pro metodu qPCR (Knufer at al. 2016, upraveno).

Následně byly odebrané vzorky rostlin z každé parcelky vysušeny v lyofilizátoru a rozdrceny v kulovém mlýně. Tyto vzorky byly smíchány do směsného vzorku pro každou parcelku, z nichž byla izolována celková DNA.

4.2.2 Izolace celkové DNA pomocí CTAB

1. Biologický materiál byl lyofilizován a následně v kulovém mlýně rozdrcen na drobný prášek, který byl převeden do mikrozkumavky (navážka 100 mg).

2. Ve vzorku byly přidány drtící koule (o průměru 3 mm) a 400 µl CTAB pufru (těsně před použitím byl do pufru přidán 2- merkaptoetanol v poměru 1ml/1,56 µl).

3. Proběhla homogenizace vzorku pomocí kulového mlýna po dobu 1,5 min rychlostí 30 kmitů za sekundu. Poté bylo do mikrozkumavky přidáno 500 µl CTAB pufru a vzorek byl po dobu 2 min třepán stejnou rychlostí.

4. 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). Následně centrifugován (7000×g, 10 min).

6. Poté byla do nové mikrozkumavky převedena vodní fáze a tento krok se opět opakoval [přidáno stejné množství směsi fenol (pH 8): chloroform-izoamylalkoholu (24:1) v poměru 1:1, třepání, centrifugace].

7. Vodní fáze byla převedena do další mikrozkumavky, kam bylo přidáno rovnocené množství ledového izopropylalkoholu. Směs byla promíchána a ponechána 24 h v mrazicím boxu (-24 °C).

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

10. Odstraněním vodní fáze byla mikrozkumavka vystavena při teplotě 30 °C po dobu 20 minut inkubaci. Peleta byla rozpuštěna v 50 µl TE pufru a vzorek byl uskladněn v mrazicím boxu (-28 °C).

Složení CTAB pufr:

2 % CTAB (acetyltrimethylamonium bromid)
0,1 M Tris (pH 8,0)
20 mM NaCL
2-merkaptoethanol

Přístrojové vybavení:

Termoblok: Bio TDB-120, firma Biosan
Vortex-třepačka: IKA-VIBRAX-VXR, firma IKA
Centrifuga: Universal 320 R, firma Hettich
Rael Time PCR cycler: CFX Connect, Real-Time system, firma BioRad

4.2.3 Real Time PCR

Po získání celkové DNA byly vzorky použity pro qPCR analýzu, která stanovila množství patogenů rodu *Verticillium* v g patogenu na 1 g rostlinného materiálu.

Pro analýzu určení množství patogenu v rostlině (metoda Real Time PCR – qPCR) byl použit primer:

OLG 70	Forward	CAGCGAAACGCGATATGTAG	261 bp
OLG 71	Reverse	GGCTTGTA GGGGTTTAGA	

Jedná se o primer, který není zcela specifický pouze pro patogen *V. longisporum*, může detekovat i jiné *Verticillium* (*V. dahliae, V. albo-atrum*) (Knüfer et al. 2016, upraveno).

Reakční směs pro analýzu qPCR: (Knüfer et al. 2016, upraveno)

Master mix 5 µl (Applied Biosystems, Syber Select Master Mix)
Primer mix 0,2 µl
ddH2O 3,8 µl
DNA 1 µl

Program:

Krok 1: počáteční denaturace 95 °C 3 minuty
Krok 2: denaturace při 95 °C 30 sekund
Krok 3: annealing při 58 °C 30 sekund
Krok 4: amplifikace při 72 °C 30 sekund.
Opakování od kroku 2 proběhlo 40 ×

4.2.4 Zpracování dat

Množství DNA jednotlivých vzorků bylo spočítáno pomocí předem stanovené koncentrační řady. Data byla zpracována v programu MS Excel a následně vyhodnocena v programu STATISTICA 12 pomocí statistické metody jednofaktorová ANOVA.

5 Výsledky

5.1 Polní maloparcelkové pokusy

5.1.1 Poměr zelených a suchých stonků na strništi

Po sklizni byl hodnocen poměr zelených a suchých stonků na strništi (viz Tab. 5), jelikož patogeny rodu *Verticillium* mohou způsobovat předčasné dozrávání, byl sledován tento parametr 2 dny po sklizni na všech parcelkách. Data jsou uvedena v průměru za všechna tři opakování
na lokalitě.

Tab. 5: Poměr zelených stonků na strništi

Var.	Odrůda	Použité přípravky	Poměr zelených stonků na strništi %
1	Alicante	Contans	13,46
2	Alicante	Contans, Serenade, Propulse	21,26
3	Alicante	Polyversum	10,57
4	Alicante	Integral Pro, 2× BAS 750 11F, BAS 76202F	21,1
5	Alicante	TOPSIN M 500 SC	9,01
6	Alicante	Xilon	8,49
7	Alicante	3× Hirundo	11,35
8	Alicante	3× Prometheus	14,95
9	Kicker	bez ošetření	23,73
10	Alicante	bez ošetření	6,86

Z výsledků této tabulky vyplývá, že první varianta ošetřená pouze přípravkem Contans měla pátý nejvyšší zjištěný poměr zelených stonků na strništi ze všech variant.

U druhé varianty byl zjištěn druhý nejvyšší poměr z měřených variant, což prokazuje účinnost použité kombinace přípravků. Zde byl použit též přípravek Contans, dále přípravek Serenade a Propulse.

Třetí varianta ošetřená přípravkem Polyversum měla zjištěný čtvrtý nejnižší poměr zelených stonků na strništi.

U čtvrté varianty je zjištěný poměr zelených stonků 21,1 %. Je to třetí nejvyšší výsledek, který dokládá dobrou účinnost použitého mořidla Integral Pro a přípravků BAS 750 11F a BAS 762 02F.

Páta varianta byla ošetřena pouze přípravkem TOPSIN M 500 SC. a její zjištěný poměr byl třetí nejnižší.

Přípravek Xilon se aplikoval preventivně u šesté varianty a poměr stonků je druhý nejnižší.

Sedmá varianta byla opakovaně ošetřovaná přípravkem Hirundo. Změřená hodnota je pátá nejnižší ze všech variant.

U osmé varianty byl zjištěn čtvrtý nejvyšší poměr zelených stonků. Tato varianta byla opakovaně ošetřena postřikem Prometheus.

Devátá varianta Kicker vykázala největší zastoupení zelených stonků na strništi v poměru 23,73 %. U odrůdy nebylo pozorováno nouzové dozrávání rostlin.

Desátá varianta jako kontrola neošetřená odrůda Alicante měla nejnižší procentuální zastoupení zelených stonků na strništi.

5.1.2 Výnos, HTS a olejnatost

Výnos

Stanice Chlumec nad Cidlinou provedla výnosové hodnocení jednotlivých parcelek (viz Tab. 6), zde jsou uvedena data získaná z jednotlivých opakování procentuálně vyjádřená vůči kontrole Alicante. U výnosu byl ze tří opakování spočítán průměr v t/ha.

Tab. 6: Výnosové hodnocení

	Výnos				
	1.opak.	2.opak.	3.opak.	průměr	% vůči kontrole Alicante
1	5,93	5,63	5,94	5,83	103,96
2	6,44	6,4	5,9	6,24	111,29
3	5,86	5,84	5,39	5,7	101,54
4	6,42	5,84	6,14	6,13	109,27
5	5,48	5,73	6,1	5,77	102,8
6	6,21	6,67	6	6,29	112,11
7	6,51	6,5	5,79	6,27	111,65
8	6,08	5,99	5,47	5,84	104,12
9	5,78	6,39	5,77	5,98	106,52
10	5,62	5,37	5,85	5,61	100

Výsledky a hodnocení výnosu:

Z výsledků výnosu výše uvedené tabulky vyplývá, že první varianta ošetřená pouze přípravkem Contans měla průměrný výnos 5,83 t/ha. V procentuálním zastoupení vůči kontrole to je 103,96 %.

U druhé varianty byl zjištěn průměrný výnos 6,24 t/ha. Vůči kontrole je to nárust 11,29 %. Tento výsledek je třetí nejvyšší z měřených variant, což prokazuje účinnost použité kombinace přípravků. Zde byl použit též přípravek Contans, dále přípravek Serenade a Propulse.

Třetí varianta ošetřená přípravkem Polyversum měla zjištěný průměrný výnos 5,70 t/ha. V procentuálním zastoupení vůči kontrole to je pouze nárust o 1,54 %. Toto je nejnižší výsledek z ošetřených variant a celkově druhý nejnižší výsledek. Aplikace tohoto přípravku měla na výnos nejnižší vliv.

U čtvrté varianty je zjištěný průměrný výnos 6,13 t/ha. Procentuálně vůči kontrole je to 109,27 %. Toto je čtvrtý nejlepší výsledek, který dokládá volbu použitého mořidla Integral pro a přípravků BAS 750 11F a BAS 762 02F.

Páta varianta byla ošetřena pouze přípravkem TOPSIN M 500 SC. Její zjištěný průměrný výnos činí 5,77 t/ha. Vůči kontrole je to nárust pouze o 2,80 %.

Preventivní aplikace přípravku Xilon u šesté varianty měla průměrný zjištěný výnos 6,29 t/ha. Vůči kontrole je to nárust o 12,11 %. Toto je nejvyšší zjištěný výnos ze všech variant a dokládá vysokou účinnost tohoto přípravku při použití v řepce ozimé.

Sedmá varianta opakovaně ošetřovaná přípravkem Hirundo měla zjištěný průměrný výnos 6,27 t/ha což je opět velmi vysoká hodnota. Vůči kontrole je to nárust o 11,65 %. To je druhá nejvyšší změřená hodnota ze všech variant.

U osmé varianty byl zjištěn průměr výnosu 5,84 t/ha. Vůči kontrole je to nárust o 4,12 %. Toto je čtvrtá nejnižší změřená hodnota vůči kontrole. Tato varianta byla opakovaně ošetřena postřikem Prometheus.

Devátá varianta Kicker vykázala průměr výnosu v hodnotě 5,98 t/ha s procentuálním rozdílem vůči kontrole Alicante 6,52 %. Je to pátý nejvyšší výsledek. Přesto by bylo vhodné zlepšit vitalitu této odrůdy použitím vhodného biologického přípravku.

Desátá varianta jako kontrola neošetřená odrůda Alicante měla nejnižší průměrný výnos 5,61 t/ha.

Olejnatost

Stanice Chlumec nad Cidlinou dále provedla hodnocení olejnatosti jednotlivých parcelek pro 1. opakování (viz Tab. 7).

Tab. 7: Hodnocení olejnatosti

Varianty	Olejnatost		
	1. opakování		% vůči kontrole Alicante
1	40,87		101,59
2	41,33		102,73
3	41,23		102,49
4	40,95		101,79
5	40,23		100
6	39,93		99,25
7	40,7		101,17
8	40,4		100,42
9	42,27		105,07
10	40,23		100

Výsledky a hodnocení olejnatosti:

Z výsledků olejnatosti vyplývá, že první varianta ošetřená pouze přípravkem Contans měla zjištěnou olejnatost 40,87 %. V procentuálním zastoupení vůči kontrole to je 101,59 %.

U druhé varianty byla zjištěna olejnatost 41,33 %. Vůči kontrole je to nárust o 2,73 %. Tento výsledek je druhý nejvyšší z měřených variant, což prokazuje účinnost použité kombinace přípravků. Zde byl použit též přípravek Contans, dále přípravek Serenade a Propulse.

Třetí varianta ošetřená přípravkem Polyversum měla olejnatost 41,23 %. V procentuálním zastoupení vůči kontrole to je nárust o 2,49 %. Toto je třetí nejvyšší výsledek z ošetřených variant. Aplikace tohoto přípravku měla na olejnatost vysoký vliv.

U čtvrté varianty je zjištěná olejnatost 40,95 %. Procentuálně vůči kontrole je to 101,79 %. Toto je čtvrtý nejlepší výsledek, který dokládá správnou volbu použitého mořidla Integral pro a přípravků BAS 750 11F a BAS 762 02F.

Páta varianta byla ošetřena přípravkem TOPSIN M 500 SC. Její zjištěná olejnatost činí 40,23 %. Stejná hodnota připadá i na neošetřenou kontrolu Alicante. Z výsledku vyplývá, že aplikace tohoto přípravku namá na olejnetost výrazný vliv.

Šestá varianta ošetřená přípravkem Xilon měla průměrnou olejnatost 39,93 %. Vůči kontrole je to zhoršení o 0,75 %. Toto je nejhorší zjištěná hodnota olejnatosti. Zde je nutné uvést, že i přes nejnižší výsledek olejnatosti byl však výnos této varianty nejvyšší.

Sedmá varianta opakovaně ošetřovaná přípravkem Hirundo měla zjištěnou olejnatost 40,7 %. Vůči kontrole je to nárust o 1,17 %.

U osmé varianty byla zjištěna hodnota olejnatosti 40,4 %. Vůči kontrole je to nárust pouze o 0,42 %. Toto je třetí nejnižší změřená hodnota vůči kontrole. Tato varianta byla opakovaně ošetřena postřikem Prometheus.

Devátá varianta Kicker vykázala nejvyšší olejnatost 42,27 % a s procentuálním nárustem vůči kontrole Alicante 5,07 %. Je to nejvyšší výsledek. Z tohoto výsledku vyplývá, že nepoužití biologické ochrany nemělo negativní vliv na růst a vývoj plodiny.

Desátá varianta jako kontrola neošetřená odrůda Alicante měla hodnotu olejnatosti 40,23 %. Z tohoto výsledku vyplývá, že aplikace biologických přípravků by měla kladnou odezvu na růst a vývoj plodiny.

HTS

Jako poslední ukazatel byla změřena hodnota HTS jednotlivých parcelek pro 1. opakování (viz Tab. 8).

Tab. 8: HTS

Varianty	**HTS**		
	1. opakování		% vůči kontrole Alicante
1	4,04		103,06
2	4,17		106,38
3	3,97		101,28
4	4,02		102,55
5	3,9		99,49
6	3,96		101,02
7	4,01		102,3
8	3,89		99,23
9	4,14		105,61
10	3,92		100

Výsledky a hodnocení HTS:

Výsledky HTS dokazují, že existují významné rozdíly v použití různých biologických preparátů.

První varianta ošetřená přípravkem Contans měla zjištěnou hodnotu HTS 4,04 g. V procentuálním zastoupení vůči neošetřené kontrole Alicante to je 103,06 %.

U druhé varianty byla zjištěna HTS 4,17 g. Vůči kontrole je to nárust o 6,38 %. Tento výsledek je nejvyšší z měřených variant, což prokazuje účinnost použité kombinace přípravků. Zde byl použit též přípravek Contans, dále přípravek Serenade a Propulse.

Třetí varianta ošetřená přípravkem Polyversum měla HTS 3,97 g. V procentuálním zastoupení vůči kontrole to je nárust o 1,28 %. Toto je čtvrtý nejnižší výsledek z ošetřených variant.

U čtvrté varianty byla zjištěná HTS 4,02 g. Procentuálně vůči kontrole je to 102,55 %. Toto je čtvrtý nejlepší výsledek, který dokládá správnou volbu použitého mořidla Integral pro a přípravků BAS 750 11F a BAS 762 02F.

Páta varianta byla ošetřena přípravkem TOPSIN M 500 SC. Její zjištěná HTS činí 3,9 g. Vůči kontrole je to zhoršení o 0,51 %. Toto je druhý nejhorší výsledek ze všech variant.

Šestá varianta ošetřená přípravkem Xilon měla hodnotu HTS 3,96 %. Vůči kontrole je to nárust o 1,02 %. V průměru jde o nejčastější procentuální nárust po aplikaci bioagens vůči kontrole.

Sedmá varianta opakovaně ošetřovaná přípravkem Hirundo měla zjištěnou HTS 4,01 g. Vůči kontrole je to nárust o 2,03 %. Jr to pátá nejvyšší hodnota HTS.

U osmé varianty byla zjištěna hodnota HTS 3,89 g. Vůči kontrole je to zhoršení o 0,77 %. Toto je nejnižší změřená hodnota HTS. Tato varianta byla opakovaně ošetřena postřikem Prometheus.

Devátá varianta Kicker vykázala druhou nejvyšší hodnotu HTS 4,14 g s procentuálním nárustem vůči kontrole Alicante 5,61 %. Z tohoto výsledku vyplývá, že nepoužití biologické ochrany nemělo negativní vliv na růst a vývoj plodiny.

Desátá varianta jako kontrola neošetřená odrůda Alicante měla hodnotu HTS 3,92 g. Je to třetí nejnižší hodnota zjištěné HTS. Z tohoto výsledku vyplývá, že aplikace biologických přípravků by měla kladnou odezvu na růst a vývoj plodiny.

5.2 Laboratorní diagnostika

Výsledky jsou uvedeny pro směsný vzorek (5 rostlin) z každé varianty v každém opakování. Udaná hodnota představuje množství patogenu (g) v 1 g rostlinného materiálu (viz Tab. 9).

Tab. 9: množství patogenu (g) v 1 g rostlinného materiálu v jednotlivých variantách a opakováních

opak.	var.	obsah patogenu	opak.	var.	obsah patogenu	opak.	var.	obsah patogenu
A	1	0,0000908	b	1	0,000000943	c	1	0
	2	0		2	0,0000913		2	0
	3	0		3	0		3	0
	4	0,00000095		4	0		4	0
	5	0		5	0		5	0
	6	0,00000904		6	0		6	0
	7	0		7	0		7	0
	8	0,000000929		8	0		8	0
	9	0,000000915		9	0		9	0
	10	0,000000892		10	0		10	0

Výsledky a hodnocení množství patogenu:

První varianta ošetřená přípravkem Contans měla zjištěné množství patogenu 0,0000908 g v 1 g rostlinného materiálu. V prvním opakování jde o nejvyšší nárust patogenu. Zároveň je to nejvyšší naměřená hodnota ze všech tří opakování.

U druhé varianty v prvním opakování bylo zjištěné nulové množství patogenu. Zde byl použit přípravek Contans, Serenade a Propulse.

Nulové množství patogenu bylo zjištěno i u třetí varianty ošetřené přípravkem Polyversum.

U čtvrté varianty byl zjištěn obsah patogenu 0,00000095 g v 1 g rostlinného materiálu. Toto je třetí nejvyšší naměřené množství patogenu ze všech variant. Varianta byla ošetřena mořidlem Integral pro a přípravky BAS 750 11F a BAS 762 02F.

Nulové množství patogenu bylo zjištěno dále u páté varianty ošetřené přípravkem TOPSIN M 500 SC.

Šestá varianta ošetřená přípravkem Xilon měla zjištěné množství patogenu 0,00000904 g v 1 g rostlinného materiálu. Je to druhá nejvyšší naměřená hodnota.

U sedmé varianty opakovaně ošetřené přípravkem Hirundo bylo zjištěné nulové množství patogenu.

Osmá varianta měla zjištěné čtvrté nejvyšší množství patogenu 0,000000929 g v 1 g rostlinného materiálu. Tato varianta byla opakovaně ošetřena postřikem Prometheus.

U deváté varianty Kicker byl zjištěn obsah patogenu 0,000000915 g v 1 g rostlinného materiálu. Toto je pátý nejvyšší nárust patogenu ze všech variant.

V desáté variantě (kontrola neošetřená odrůda Alicante) byl zjištěn obsah patogenu 0,000000892 g v 1 g rostlinného materiálu. Toto je šestá nejvyšší hodnota a zároveň nejnižší zjištěný obsah patogenu. Z tohoto výsledku vyplývá, že aplikace biologických přípravků by měla kladnou odezvu na eliminaci patogena.

První varianta ošetřená přípravkem Contans měla zjištěné množství patogenu 0,000000943 g v 1 g rostlinného materiálu. V druhém opakování jde o druhý nejvyšší nárust patogenu.

U druhé varianty v druhém opakování byl oproti prvnímu opakování, kde bylo zjištěné nulové množství patogenu, zjištěný obsah patogenu 0,0000913 g v 1 g rostlinného materiálu. Je to zároveň nejvyšší naměřená hodnota. Zde byl použit přípravek Contans, Serenade a Propulse.

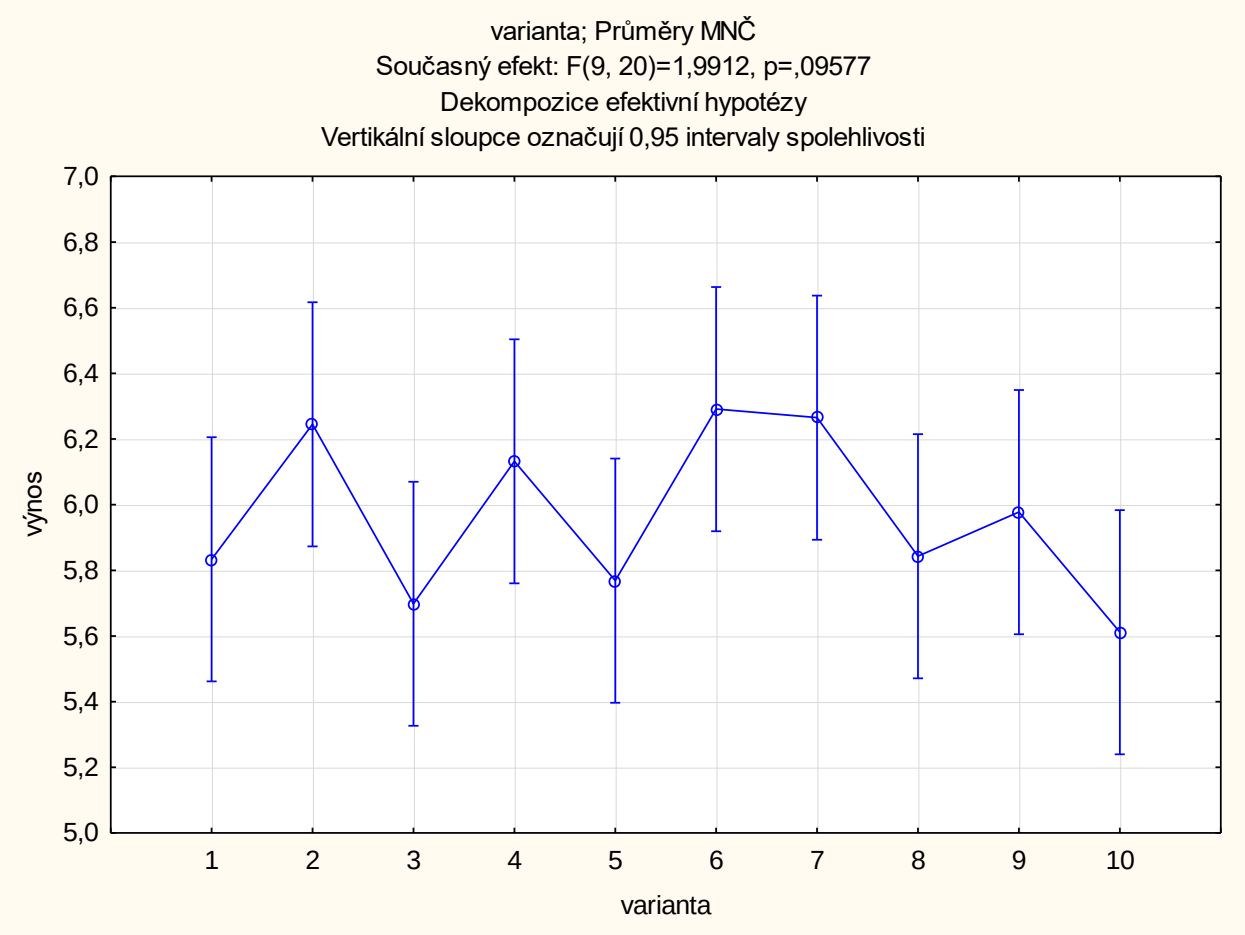
Nulové množství patogenu ve druhém opakování bylo zjištěno u zbylých osmi variant.

V posledním opakování nebyla zjištěna přítomnost patogenu v žádné z testovaných variant. První varianta, kde byl zjištěn obsah patogenu v prvním a druhém opakování, též neprokázala jeho přítomnost ve třetím opakování.

5.3 Statistické hodnocení

5.3.1 Hodnocení výnosu

Byl hodnocen možný statistický rozdíl ve výnosech jednotlivých variant všech tří opakování. Statistické hodnocení bylo zjištěno pomocí programu STATISTICA 12 (STAT SOFT).



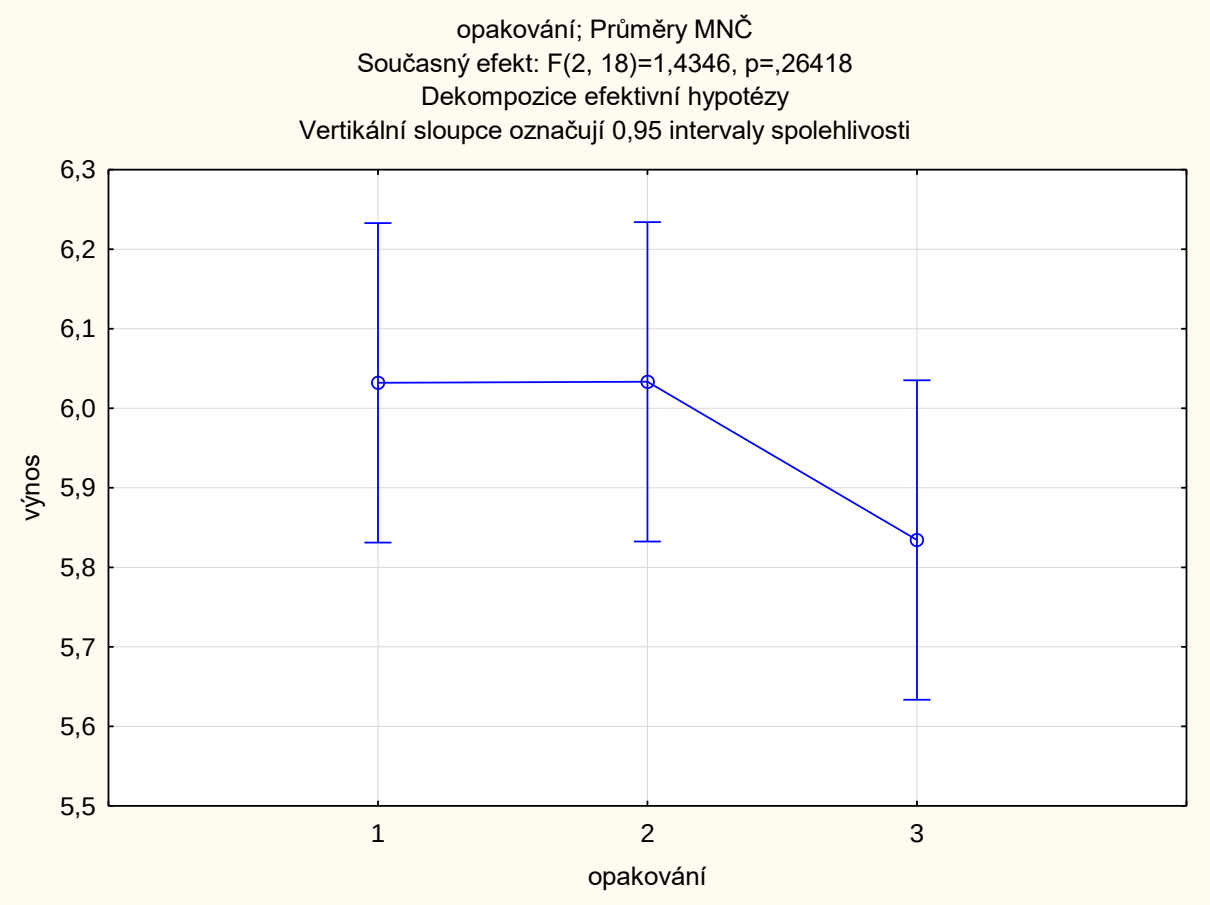
Graf 1: Statistické hodnocení výnosu jednotlivých variant

Tab. 10: Jednorozměrné testy významnosti na výnos

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro výnos (Tabulka1) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SČ	Stupně Volnosti	PČ	F	p
Abs. člen	1068,008	1	1068,008	11201,87	0,000000
varianta	1,709	9	0,190	1,99	0,095773
Chyba	1,907	20	0,095		

Ze získaných dat byla provedena v programu STATISTICA 12 jednofaktorová ANOVA pomocí, které byly zjištěny rozdíly mezi jednotlivými variantami. Hodnota p byla 0,095773 a je tudíž větší než 0,05. Hodnota-p je nejmenší hladina významnosti, na níž bychom nulovou hypotézu zamítli. Mezi výnosy jednotlivých variant nebyl zjištěn významný statistický rozdíl (viz Graf 1 a Tab. 10). Vzhledem k neprůkaznosti rozdílů nebyl aplikován na získaná data post-hoc test.

Byl hodnocen možný statistický rozdíl v jednotlivých opakováních bez ohledu na variantu.



Graf 3: Statistické hodnocení množství patogenu v jednotlivých opakováních

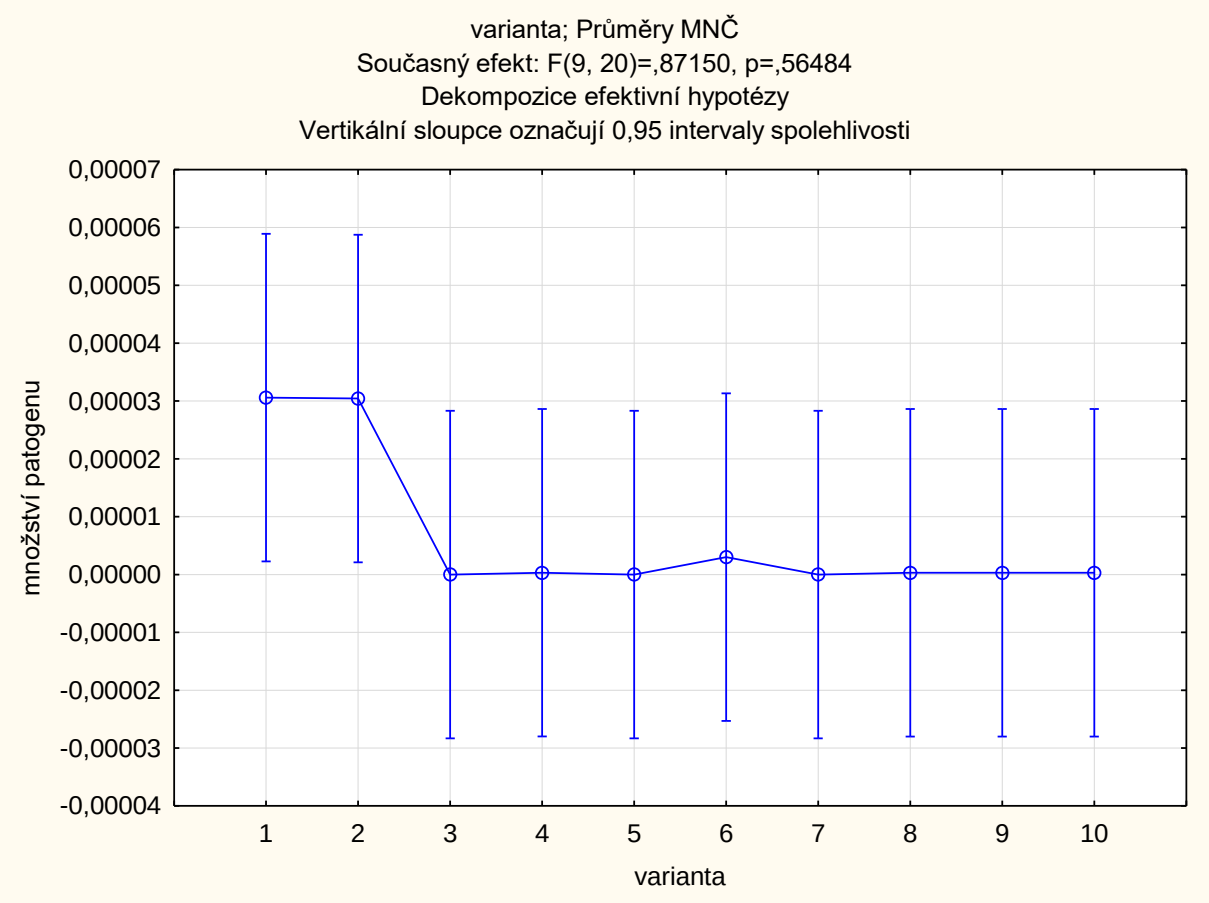
Tab 11: Jednorozměrné testy významnosti pro výnos

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro výnos (Tabulka1) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SČ	Stupně Volnosti	PČ	F	P
Abs. Člen	1068,008	1	1068,008	11688,68	0,000000
Varianta	1,709	9	0,190	2,08	0,089238
Opakování	0,262	2	0,131	1,43	0,264184
Chyba	1,645	18	0,091		

Hodnota p dosáhla hodnoty 0,264184 a je tudíž větší než 0,05. Mezi výnosy jednotlivých opakování nebyl zjištěn významný statistický rozdíl (viz Graf 3 a Tab. 11). Vzhledem k neprůkaznosti rozdílů nebyl aplikován na získaná data post-hoc test.

5.3.2 Hodnocení obsahu patogenů rodu *Verticillium*

Dále byl zjištěn možný statistický rozdíl v obsahu patogenu *V. longisporum* jednotlivých variant všech tří opakování.



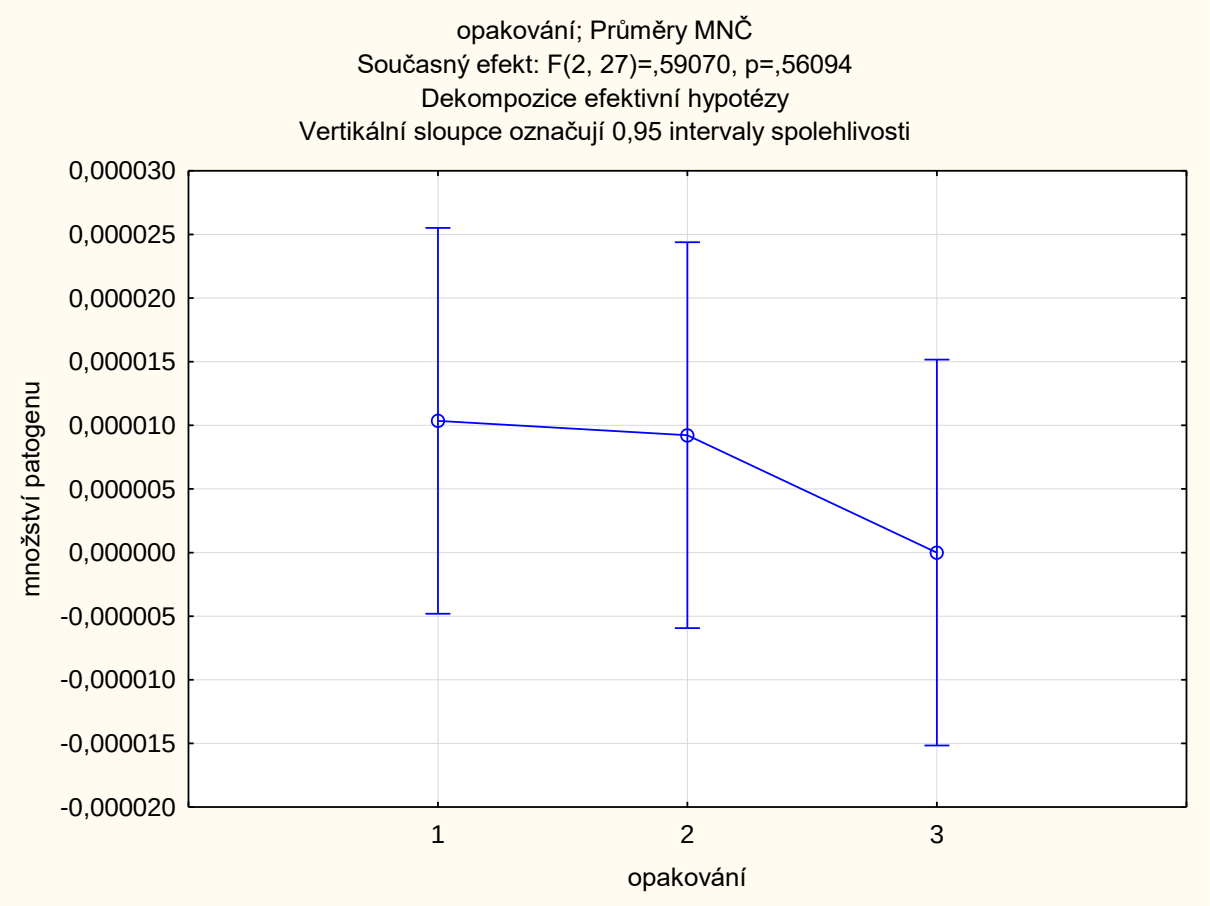
Graf 4: Statistické hodnocení množství patogenu u jednotlivých variant

Tab. 12: Jednorozměrné testy významnosti pro množství patogenu

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro množství patogenu (Tabulka1) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SČ	Stupně Volnosti	PČ	F	P
Abs. Člen	0,000000	1	0,000000	2,311450	0,144077
Varianta	0,000000	9	0,000000	0,871497	0,564844
Chyba	0,000000	20	0,000000		

Hodnota p dosáhla hodnoty 0,564844 a je tudíž větší než 0,05. V obsahu patogenu *V. longisporum* v jednotlivých opakování nebyl zjištěn významný statistický rozdíl (viz Graf 4 a Tab. 12). Vzhledem k neprůkaznosti rozdílů nebyl aplikován na získaná data post-hoc test.

Byl hodnocen možný statistický rozdíl v obsahu patogenu *V. longisporum* jednotlivých opakování bez ohledu na variantu pokusu.



Graf 5: Statistické hodnocení množství patogenu v jednotlivých opakováních

Tabulka 13: Jednorozměrné testy významnosti pro množství patogenu

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro množství patogenu (Tabulka1) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	P
Abs. člen	0,000000	1	0,000000	2,339505	0,137762
opakování	0,000000	2	0,000000	0,590705	0,560937
Chyba	0,000000	27	0,000000		

Hodnota p dosáhla hodnoty 0,560937 a je tudíž větší než 0,05. V obsahu patogenu *V. longisporum* v jednotlivých opakování nebyl zjištěn významný statistický rozdíl (viz Graf 5 a Tab. 12). Vzhledem k neprůkaznosti rozdílů nebyl aplikován na získaná data post-hoc test.

6 Diskuze

Chemická ochrana je stále nejčastější volbou pěstitelů při ochraně pěstovaných plodin. Nicméně lze pozorovat společenský i politický tlak na odstranění nejvíce škodlivých látek z prodeje. Vyvstává pak otázka, čím nahradit chemické pesticidy, aby byla udržena podobná účinnost přípravků na ochranu rostlin. Negativní postoj veřejnosti k chemikáliím v tomto oboru, kdy dochází ke znečištění přírodních zdrojů, k přítomnosti reziduí pesticidů ve vodě i v konzumovaných produktech a možná karcinogenita, nutí i pěstitele uvažovat o jiných alternativách ošetření. Biologická ochrana je v tomto ohledu možnou náhradou. Podstatnější využívání biologické ochrany se řadí od poloviny 20. století. Biologická ochrana využívá k eradikaci přirozené nepřátele škůdců a patogenů. Většinou se tak ale dosáhne převážně jejich kontroly (Bleša 2019).

U hodnocení výnosu nejsou statisticky významné rozdíly. Přesto je pro pěstitele důležité, aby dosáhl co nejlepších hodnot, a i rozdíl 0,5 t/ha je z hlediska celkového výnosu nezanedbatelný. Zde se proto jeví jako nejlepší biologická ochrana použití přípravku Xilon při setí. Výnos z průměru tří opakování je 6,29 t/ha, což je o 0,68 t vyšší než neošetřená kontrola. Biofungicid Xilon se úspěšně používá například při pěstování kukuřice. Houba *Trichoderma asperellum,* použitá v sezónách negativně ovlivněných suchem, výrazně zvyšovala výnos zrna kukuřice (Kuthan 2021). Mnoho izolátů patřících do Trichodermy bylo hodnoceno z hlediska jejich schopnosti kontrolovat verticiliové vadnutí s různými úspěchy. Bylo testováno deset izolátů Trichoderma. Izoláty *Trichoderma viride* T46 a T117 vedly k nejlepší ochraně se snížením výskytu onemocnění u lilku o 30 %. Tři kmeny zmírňovaly onemocnění o více než 80 % u rajčat, lilku a pepře (Dutta 1981; Narisawa et al. 2002; Ślusarski & Pietr 2009). V případě *Trichoderma asperellum* B35 a *Trichoderma harzianum* T-35 závisela účinnost kontroly na několika faktorech, jako je umístění experimentů v terénu a typ formulace (Ordentlich et al. 1990; Ślusarski & Pietr 2009). U oliv snížily izoláty *T. asperellum* T25 a Bt3 a aplikace BIOTEN® (*T. asperellum* + *T. gamsii*) závažnost onemocnění Verticilliového vadnutí (Carrero-Carrón et al. 2018). Provedené pokusy dokazují účinnost přípravku Xilon a potvrzují správnost výsledku z našeho testování.

Výnos 6, 13 t/ha byl změřen u varianty s použitím přípravku mořidla Integral Pro s účinnou složkou *Bacillus amyloliquefaciens*. To je čtvrtý nejvyšší výsledek. Rod *Bacillus* je dobře prozkoumáván při hledání BCA za účelem kontroly *V. longisporum*. Více než dvě třetiny testovaných kmenů Bacillus patří k druhům *Bacillus amyloliquefaciens* a *Bacillus subtilis*. Je pozoruhodné, že na různých hostitelských rostlinách byl testován pouze kmen *Bacillus amyloliquefaciens* 5-127, izolovaný z kořenů rajčat. Snížil procento nemocných listů o 40–70 % u lilků napadených *V. dahliae* ve skleníku a snížil výskyt onemocnění o více než 50 % při polním experimentu s bramborami (Tjamos et al. 2004). Podle Hall et al. (1986) v jedné z mála studií týkajících se biologické kontroly verticiliového vadnutí na stromech bylo ve skleníku testováno několik izolátů *B. subtilis* proti *V. dahliae* u javoru. Tyto izoláty byly získány ze zdravé tkáně javorového kmene a snížily výskyt onemocnění *V. dahliae* u javorů o 34–51 %. Bylo také prokázáno, že kmeny Bacillus chrání řepku olejku, bavlník a jahody proti verticiliovému vadnutí. Z výsledků fungicidních pokusů v máku setém v roce 2017 vyšlo, že biofungicid Serenade s účinnou složkou *Basillus spp*. zvýšil výnos máku o 12,2 % vůči

kontrole (Plachká 2018). Z těchto pokusů je patrné, že aplikace mořidla Integral Pro má významný vliv na kontrolu choroby a podílí se na vyšším výnosu plodiny.

Statisticky významný rozdíl nebyl prokázán u hodnocení obsahu patogenu rodu *Verticillium*. Patogen *Verticillium longisporum* je velmi různorodě rozložen na pozemku a záleží i na množství inokula z hlediska možného napadení rostliny.

Olejnatost řepky závisí na počtu semen v každé šešuli, počtu šešulí na jedné rostlině a množství rostlin na dané ploše (YARA 2021). Zjištěná olejnatost byla nejvyšší u varianty 9, což je kontrola Kicker. V průměru je ale olejnatost ve variantách srovnatelná.

Hmotnost tisíce semen (HTS) je jeden ze tří hlavních výnosových prvků u olejnin. Patří mezi ně i počet klasů na m² a počet zrn v klasu. Obecně lze říci, že vyšší HTS znamená vyšší výnos plodiny (Bečka et al. 2007). Hodnota HTS je nejvyšší u druhé varianty, kde byly použity přípravky Contans, Serenade a Propulse. V pokusech o možnosti využití biologického přípravku Contans v podmínkách konvenčního zemědělství byl přípravek použit na deseti lokalitách v letech 2002-2006. Z průměru výsledků vyplývá, že proti kontrole se výnos u řepky po použití Contans zvýšil o 12,6 %. Při použití ve slunečnici se výnos oproti kontrole zvýšil o 13,6 % (Svoboda 2007).

Preparát Hirundo byl na porost řepky aplikován ve třech termínech. Výnos byl v našem pokusu zjištěn jako druhý nejvyšší. Olejnatost a HTS dosáhly průměrných hodnot. Přípravek Hirundo se využívá například v kukuřici. Z poloprovozního pokusu v Červeném Újezdu z roku 2015 vyplývá, že aplikace biofungicidu Hirundo nemá na výnos kukuřice žádný vliv. Přičemž výnos byl zároveň ze všech variant ošetření nejnižší (Tomášek & Cihlář 2016). Bylo nicméně prokázáno, že kmeny Bacillus chrání řepku olejku, bavlník a jahody proti verticiliovému vadnutí (Plachká 2018).

Druhá nejvyšší hodnota HTS je u varianty s kontrolou Kicker. Nejnižší hodnota HTS byla změřena u 8 varianty. Tato varianta byla ve třech termínech ošetřena přípravkem Prometheus. Olejnatost a Výnos dosáhly průměrných hodnot. V pokusu z Červeného Újezdu byl testován biofungicid Prometheus, fungicidy Amistar Extra, Dithane a Topsin. Dále aplikace N hnojiva. Z výnosů semen všech variant bylo prokázáno, že aplikací přípravku Prometheus došlo ke zvýšení výnosu, který byl z variant s použitím chemických postřiků nejvyšší. Je tedy adekvátní náhradou k chemickým fungicidům (Vašák et al. 2017). *Pseudomonas spp*. byly rozsáhle studovány jako BCA různých patogenů včetně *V. longisporum*. Většina testovaných potenciálních kmenů biokontroly patří do skupiny Pseudomonas. Ošetření kořenů olivových rostlin pseudomonádami potlačilo *V. longisporum* v olivách (Mercado-Blanco et al. 2004; Prieto et al. 2009). Jiné izoláty skupiny Pseudomonas mohou chránit proti *V. dahliae* v plodinách, jako jsou brambory, jahody a lilek (Leben et al. 1987; Berg et al. 2000, 2001; Malandraki et al. 2008; Uppal et al. 2008). Ošetření semen *P. chlororaphis* kmenem MA 342, aktivním organismem v biopesticidech Cedomon® a Cerall® (BioAgri AB, Uppsala, Švédsko), mělo za následek nižší infekci řepky olejné *V. longisporum* (Abuamsha et al. 2011). Studie Erdogana a Benlioglu (2010) ukázala, že kmeny Pseudomonas FP22, FP23, FP30 a FP35 jsou

dobrými kandidáty na biologickou kontrolu proti vadnutí bavlny a navíc mohou zlepšit parametry růstu na bavlníkových polích. Výsledky našeho testování zaznamenaly zvýšení výnosu po použití přípravku Prometheus a potvrzují podobné závěry z výše uvedených pokusů.

Hodnoty výnosu, olejnatosti a HTS vykazovaly po použití biologického fungicidu Polyversum spíše průměrné hodnoty. V roce 2007/2008 byl testován účinek tohoto přípravku v závislosti na výnosu na třech různých lokalitách. Přípravek se aplikoval na porost řepky ve třech termínech a porovnával se s účinností chemického standardu a s kontrolou. Rozdíly na lokalitách Klecany, Telč a Lesonice jsou hodnoceny jako nízké. Rozdíly v bonitaci houbových chorob u variant jsou nízké, což prokazuje podobnou účinnost biofungicidu a chemického standardu. Výnosový efekt se oproti kontrole zvýšil o 7,9 % a byl dokonce o 1,1 % vyšší oproti variantě s chemickým fungicidem (Procházková-Rulfová 2009). U pokusu v Červeném újezdu přípravek Polyversum vykázal spíše průměrné hodnoty výnosu oproti biofungicidu Prometheus a chemickým standardům (Vašák et al. 2017). V Srbsku byl studován výskyt patogenu *V. longisporum*. Byla zkoumána účinnost na rostlinách pepře s biofungicidem Polyversum® (*Pythium oligandrum*) a běžným fungicidem propamocarb-hydrochloridem. Na základě makroskopických a mikroskopických znaků izolátů pocházejících z osmi lokalit v Srbsku bylo zjištěno, že se Polyversum ukázalo být efektivnějším (66,6 %), když se aplikovalo před očkováním a ne po něm. Účinnost Propamokarb-hydrochlorid a přípravku Polyversum byla obdobná (Al-Rawahi & Hancock 1998).

Jako možný směr dalšího výzkumu, bylo bylo vhodné zjišťovat účinnost biologických preparátů nejen v závislosti na použitých odrůdách, ale také na způsobu hnojení. Rostlina, jež se musí potýkat s deficitem živin snáší hůře poškození nejen škůdci, ale i různými patogeny. Opačný extrém je nadbytek živin, například dusíku. V tom případě je rostlina opět náchylnější k možnému napadení patogeny. V tomto ohledu by bylo vhodné výzkum dále rozvinout. Pokus v této předložené diplomové práci by bylo do budoucna vhodné zpřesnit inokulací patogenu na rostliny v jednotlivých variant v polním pokusu. Bylo by tak prokázané, že k infekci došlo a lépe by se zjišťovala účinnost použitých biologických přípravků.

7 Závěr

V předložené diplomové práci byly testovány organismy (byly zahrnuty organismy: *Pythium oligandrum, Coniothyrium minitans, Trichoderma asperellum, Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp.) v polním maloparcelkovém pokusu proti patogenu *Verticillium longisporum.*

Aplikace přípravků proběhla v šesti termínech na odrůdě Alicante, z toho jedna varianta je neošetřená kontrola Alicante. V pokusu byla testována zároveň potenciálně odolná odrůda Kicker, jež nebyla ošetřena žádným postřikem. U ní se testovala možná odolnost k patogenu *V. longisporum*.

- V první variantě byla odrůda Alicante ošetřená pouze přípravkem Contans. U této varianty ošetření dosahovaly všechny výsledky průměrných hodnot. U výnosu došlo k nárustu oproti neošetřené kontrole Alicante což dokazuje účinnost použitého postřiku.

- Ve druhé variantě byla použita kombinace přípravků Contans, Serenade a Propulse na odrůdě Alicante. Tato kombinace se ukázala jako vhodná. Poměr zelených stonků byl druhý nejvyšší a výnos dosáhl třetí nejvyšší hodnoty. Zvolená kombinace přípravků se proto ukázala jako dostatečně účinná.

- Ve třetí variantě použití přípravku Prometheus mělo sice vliv na zvýšení výnosu, přesto jsou hodnoty dosažené u ostatních ukazatelů spíše průměrné.

- Ve čtvrté variantě kombinace přípravků BAS 750 11F, 762 02F a použití mořidla Integral Pro dosazovala ve výsledcích průměrných hodnot. Rozdíl byl pouze u poměru zelených stonků na strništi, kde byla změřena třetí nejvyšší hodnota. Tento ukazatel potvrzuje, že odrůda Alicante byla až do sklizně poměrně vitální, na čemž má podíl zvolená kombinace přípravků.

- V páté variantě byl porost ošetřen postřikem TOPSIN M500 SC. Zde byl zjištěn zajímavý výsledek u olejnatosti, která měla stejnou hodnotu jako neošetřená kontrola, a dokonce nižší hodnotu u HTS. Výsledky je možné vysvětlit tím, že zvolený postřik nebyl účinný, rostlina byla napadená patogenem *V. longisporum*, což mělo za následek snížení měřených hodnot.

- V šesté variantě měla aplikace Xilonu na odrůdu Alicante velmi dobrý vliv na výnos, který byl nejvyšší ze všech variant. Zajímavé je, že naopak olejnatost měla dokonce nižší hodnotu než neošetřená kontrola. Je to způsobeno tím, že tyto organismy mohu ovlivňovat různé pochody v rostlinách a mít tak vliv například na sníženou olejnatost v semenech.

- V sedmé variantě opakovaně ošetřené preparátem Hirundo bylo dosaženo druhého nejvyššího výnosu ze všech variant. Ostatní hodnoty ukazatelů měly průměrné hodnoty. Potvrdila se zde vhodnost použitého přípravku.

- V osmé variantě byl přípravek Prometheus na porost aplikován ve třech opakování. Výsledky u zjišťovaných ukazatelů měly spíše průměrné hodnoty a HTS byla dokonce nižší než neošetřená kontrola. Organismy ovlivňují nebo dokonce ihbibují různé pochody v rostlinách, což se může projevit například nižší HTS.

- V deváté variantě je odrůda Kicker, která nebyla fungicidy nijak ošetřena. Dosáhla velmi dobrých hodnot, zejména u poměru zelených stonků a olejnatosti. Hodnota HTS byla druhá nejvyšší. Poměr zelených stonků u varianty Kicker byl 23,73 % a u odrůdy Alicante 6,86 %. Tyto hodnoty prokázaly, že odrůda Kicker byla nejvíce vitální a nedocházelo u ní tolik k nouzovému dozrávání.

Ikdyž nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi variantami použití biologických přípravků u výnosu, byl patrný trend, že použitím bioagens došlo k procentuálnímu zvýšení výnosu u všech variant oproti kontrole (nejlepší varianta-přípravek Xilon s průměrným zjištěným výnosem 6,29 t/ha).

Výsledky potvrzují cíle a hypotézu, že existují účinné bioagens, které lze použít v ochraně proti *V. longisporum*, a bude možné dosáhnout zlepšení výnosu v daných sezónách.

Při statistickém hodnocení nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v obsahu patogenu mezi jednotlivými variantami ošetření porostu. Důvodem je pravděpodobně různé rozmístění patogenu na pozemku.

Pokus z předložené diplomové práce pokračuje i v sezóně 2020/2021 a bude tak zkoumán i vliv počasí na vývoj a napadení patogenu *V. longisporum*, který jeho výskyt významně ovlivňuje. Tento výzkum přispěje cennými radami pro pěstitele, kteří mohou nyní volit konkrétní přípravek podle parametrů zjištěných v této diplomové práci.

Na základě získaných dat bylo potvrzeno, že některé biologické přípravky mají potenciál omezit výskyt patogenu *V. longisporum* a mohou farmářům pomoci udržet stabilnější výnos v pěstování řepky. Je však důležité dbát na správný termín aplikace biologických přípravků, jejichž účinnost je velmi ovlivněna vlivy počasí. Je zapotřebí dalšího zkoumání těchto metod, poněvadž to může být do budoucna jeden z mála způsobů možné povolené ochrany rostlin. Další poznatky a potvrzení, či vyvrácení domněnek by mělo být předmětem následujícího studia.

8 Literatura

Abuamsha R, Salman M, Ehlers RU. 2011. Differential resistance of oilseed rape cultivars (Brassica napus ssp. oleifera) to *Verticillium longisporum* infection is affected by rhizosphere colonisation with antagonistic bacteria, *Serratia plymuthica* and *Pseudomonas chlororaphis*. Biocontrol **56**: 101–112.

Agrofert, a. s. 2019. Integral Pro. Agrofert, a. s., Praha. Available at https://www.agrofert.cz/sites/default/files/downloads/integral_pro_0.pdf (accessed April 10, 2021).

Al-Rawahi AK, Hancock JG. 1998. Parasitism and Biological Control of *Verticillium dahliae* by *Pythium oligandrum*. In: 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.

Baranyk P et al. 2010. Olejniny. Profi Press, Praha.

Baranyk P, Fábry A, a kol. 2007. Řepka: pěstování, využití, ekonomika. Profi Press, Praha.

Bayer S. A. S. 2017. Contans. Agromanuál Kurent, s. r. o., České Budějovice. Available at https://www.agromanual.cz/cz/pripravky/fungicidy/fungicid/contans-wg (accessed April 10, 2021).

Bečka D, Vašák J, Zukalová H, Mikšík V. 2007. Řepka ozimá: Pěstitelský rádce. Kurent. Praha.

Berg G, Kurze S, Buchner A, Wellington EM, Smalla, K. 2000. Successful strategy for the selection of new strawberry-associated rhizobacteria antagonistic to Verticillium wilt. Can. J. Microbiol **46**: 1128–1137.

Berg G, Fritze A, Roskot N, Smalla K. 2001. Evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from different host plants of *Verticillium dahliae* Kleb. J. Appl. Microbiol. **91**: 963–971.

Bioagens. 2019. Serenade. Luhačovice. Available at https://www.bioagens.eu/serenade-aso-5-l (accessed April 10, 2021).

Biopreparáty, s. r. o. 2021. Polyversum. Biopreparáty spol, s. r. o., Praha. Available at http://www.biopreparaty.eu/index.php?option=com_content&view=article&id=24&Itemid=21 (accessed April 10, 2021).

Bleša D. 2019. Úvod do problematiky biologické ochrany rostlin. Obilnářské listy **XXVII**:4.

Bull CT, Shetty KG, Subbarao KV. 2002. Interactions between *Myxobacteri*, plant pathogenic fungi and biocontrol agents. Plant Disease. **86**: 889-896.

CABI. 2019. *Sclerotinia sclerotiorum*. CAB International. Available at https://www.cabi.org/isc/datasheet/49124 (accessed April 12, 2021).

Canan Usta. 2013. Microorganisms in Biological Pest Control. Bacterial Toxin Application and Effect of Environmental Factors. Current Progress in Opps. IntechOpen.

Carrero-Carrón I, Rubio MB, Niño-Sánchez J, Navas-Cortés JA, Jiménez-Díaz RM, Monte E, Hermos R. 2018. Interactions between *Trichoderma harzianum* and defoliating *Verticillium dahliae* in resistant and susceptible wild olive clones. Plant Pathology. **67**: 1758–1767.

Csanyi C. 2021. Advantages & Disadvantages of Biological Control. Available at: https://sciencing.com/advantages-disadvantages-biological-control-8088070.html (accessed April 2021)

Cook RJ. 1993. Alternative disease management strategies. In: Buxton DR, Shibles R, Forsberg RA, Blad BL, Asay KH, Paulsen GM, Wilson RF (eds) International Crop Science. Crop Science Society of America, Madison.

Debode J, Clewes E, De Backer G, Hofte M. 2005. Lignin is involved in the reduction of *Verticillium dahliae var. longisporum* inoculum in soil by crop residue incorporation. Soil Biol. Biochem **37**: 301–309.

D'Ercole N, Nipoti P, Di Pillo L, Gavina F. 2000. "In vitro and in vivo tests of Trichoderma spp. as a biocontrol agent of *Verticillium dahliae* Kleb. in eggplants," in Advances in Verticillium Research and Disease Management. St. Paul. MN: APS Press.

Depotter JRL, Deketelaere S, Inderbitzin P, Tiedemann AV, Höfte M, Subbarao KV, Wood TA, Thomma BPHJ. 2016. *Verticillium longisporum*, the invisible threat to oilseed rape and other brassicaceous plant hosts. Molecular Plant Pathology **17**: 1004-1016.

Diepenbrock W, Fischbeck G, Heyland U, Knauer N. 1999. Spezieller Pflanzenbau. Eugen Ulmer Company Stuttgart.

Dutta BK. 1981. Studies on some fungi isolated from the rhizosphere of tomato plants and the consequent prospect for the control of Verticillium wilt. Plant Soil **63**: 209–216.

Erdogan O, Benlioglu K. 2010. Biological control of Verticillium wilt on cotton by the use of fluorescent *Pseudomonas spp*. under field conditions. Biol. Control **53**: 39–45.

Eynck C, Koopmann B, Grunewaldt-Stoecker G, Karlovsky P, Tiedemann AV. 2007. Differential interactions of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* with *Brassica napus* detected with molecular and histological techniques. Eur. J. Plant Pathol **118**: 259–274.

Hall TJ, Schreiber LR, Leben C. 1986. Effects of xylem-colonizing *Bacillus* spp. on Verticillium wilt in Maples. Plant Dis. **70**: 521.

Hammoudi O. 2007. Einfluss mikrobieller Antagonisten auf den Befall mit *Phoma lingam* und *Verticillium dahliae var. longisporum* an Raps (*Brassica napus L. var. napus*). Dissertation, Christian-Albrechts-University zu Kiel.

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 VK. 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 apllied herbicides on populations of plant disease suppressing bactieria 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.

Hökeberg M, Gerhardson B, Johnsson L. 1997. Biological control of cereal seed-borne diseases by seed bacterization with greenhouse-selected bacteria. Eur J Plant Pathol **103**: 25–33.

Hökeberg M. 2006. Development and registration of biocontrol products—experience and perspectives gained from the bacterial seed treatment products Cedomon and Cerall. In: Proceedings of the international workshop ''Implementation of biocontrol in practice in temperate regions—present and near future'', Research Centre Flakkebjerg, Denmark, November 1–3, 2005. DIAS Report **119**: 77.

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

Hornig H. 1987. Weitere Untersuchungen und Erkenntnisse zur Krankhaften Abreife. Raps. Klebahn.

Johnsson L, Hökeberg M, Gerhardson B. 1998. Performance of the *Pseudomonas chlororaphis* biocontrol agent MA 342 against cereal seed-borne diseases in field experiments. Eur J Plant Pathol **104**:701–711.

Karapapa VK, Bainbridge BW, Heale JB. 1997. Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape. Mycol. Res **101**: 1281–1294.

Knüfer J, Lopisso DT, Koopmann B, Karlovsky P, von Tiedemann A. 2016. Assessment of latent infection with *Verticillium longisporum* in field-grown oilseed rape by qPCR. European Journal of Plant Pathology **147**: 819-831.

Knüfer J. 2011. Improvement of Winter Oilseed Rape Resistance to *Verticillium longisporum*: Assessment of Field Resistance and Characterization of Ultrastructural Plant Responses. Dissertation. Göttingen, Germany.

Kuchtová P, Nerad D, Škeřík J, Kazda J, Káš M, Mičák L, Baranyk P, Škeříková M. 2008. Možnosti intenzifikace v ekologické pěstitelské technologii ozimé řepky. Pages 103 – 109. Sborník z konference „prosperující olejniny". Česká zemědělská univerzita, Praha.

Kurze S, Dahl R, Bahl H, Berg G. 2001. Biological control of soil-borne pathogens in strawberry by *Serratia plymuthica* HRO-C48. Plant Dis **85**: 529–534.

Kuthan A. 2021. Xilon® GR biologická prevence výskytu houbových chorob v polních plodinách. Agromanuál Kurent, s. r. o., České Budějovice. Available at https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/choroby/xilon-gr biologicka-prevence-vyskytu-houbovych-chorob-v-polnich-plodinach (accessed April 10, 2021).

Kužma Š et al. 1996. Metodická příručka pro ochranu rostlin: polní plodiny. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v Brně, Odbor prostředků a metod ochrany rostlin.

Lacey LA, Siegel JP. 2000. Safety and ecotoxicology of entomopathogenic bacteria. Laboratory to Field Application. Springer, Dordrecht.

Leben SD, Wadi JA, Easton GD. 1987. Effects of *Pseudomonas fluorescens* on potato plant growth and control of Verticillium dahliae. Phytopathology **77**:1592.

Lugtenberg BJJ, Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV. 2002. Microbe–plant interactions: principles and mechanisms. Antonie Van Leeuwenhoek **81**:373–383.

Malandraki I, Tjamos SE, Pantelides IS, Paplomatas EJ. 2008. Thermal inactivation of compost suppressiveness implicates possible biological factors in disease management. Biol. Control **44**: 180–187.

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.

Mašek J, Novák P. 2011. Technika a technologie pro setí řepky. Zemědělec. Available at https://www.zemedelec.cz/technika-a-technologie-pro-seti-repky/ (accessed April 12, 2021).
Mol L, van Riessen HW. 1995. Effect of plant-roots in the germination of microsclerotia of *Verticillium dahliae*. Eur J Plant Pathol **101**:673–678.

Mercado-Blanco J, Rodrıguez-Jurado D, Hervás A, Jiménez-Dıaz RM. 2004. Suppression of Verticillium wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas spp*. Biol. Control **30**: 474–486.

Milgroom MG, Cortesi P. 2004. Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. The Annual Review of *Phytopathology*. **42**: 311-338.

MONAS technology 1. 2019. Hirundo. MONAS technology, České Budějovice. Available at http://www.monastechnology.cz/index.php/hirundo (accessed April 10, 2021).

MONAS technology 2. 2019. Prometheus. MONAS technology, České Budějovice. Available at http://www.monastechnology.cz/index.php/prometheus-cz (accessed April 10, 2021).

Müller H, Berg G. 2008. Impact of formulation procedures on the effect of the biocontrol agent *Serratia plymuthica* HRO-C48 on verticillium wilt in oilseed rape. BioControl **53**: 905–916.

Mycobank. 2019. Mycobank database. Available at http://mycobank.org/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000067&Rec=14410&Fields=All (accessed April 10, 2021).

Narisawa K, Kawamata H, Currah RS, Hashiba T. 2002. Suppression of Verticillium wilt in eggplant by some fungal root endophytes. Eur. J. Plant Pathol. **108**: 103–109.

Navrátilová M. 2019. Komplexní celostní ochrana rostlin s využitím biologické ochrany. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno. Available at https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/ochrana obecne/komplexni-celostni-ochrana-rostlin-s-vyuzitim-biologicke-ochrany (accessed April 12, 2021).

Odstrčilová, L., Plachká, E., 2007: Choroby řepky na jaře. Agromanuál **4**: 38 – 42.

Ondráčková E, Ondřej M, Prokinová E. 2019. Biologická ochrana rostlin s využitím mykoparazitických hub. Agromanuál Kurent, s.r.o., České Budějovice. Available at https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/choroby/biologicka-ochrana-rostlin-s-vyuzitim-mykoparazitickych-hub (accessed April 12, 2021).

Ordentlich A, Nachmias A, Chet I. 1990. Integrated control of *Verticillium dahliae* in potato by *Trichoderma harzianum* and captan. Crop Prot. **9**: 363–366.

OSEVA, a. s. 2016. Alicante. OSEVA, a. s., Bzenec. Available at https://oseva.eu/product/alicante/ (accessed April 12, 2021).

Pal KK, McSpadden Gardener B. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor.*

Pfeufer E, Gauthier N, Bradley A. Powdery Mildew. 2017. University of Kentucky Plant Pathology Fact Sheet, College of Agriculture, Food and Environment. Available at https://plantpathology.ca.uky.edu/files/ppfs-gen-02.pdf (accessed April 10, 2021).

Plachká E. 2018. Výsledky fungicidních pokusů v máku v roce 2017. Agromanuál Kurrent, s. r. o., České Budějovice. Available at https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/choroby/vysledky-fungicidnich-pokusu-v-maku-v-roce-2017 (accessed April 19, 2021).

Prieto P, Navarro-Raya C, Valverde-Corredor A, Amyotte SG, Dobinson KF, Mercado-Blanco J. 2009. Colonization process of olive tissues by *Verticillium dahliae* and its in planta interaction with the biocontrol root endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7. Microb. Biotechnol. **2**: 499–511.

Procházková-Rulfová J. 2009. Polyversum-biologický fungicid na ochranu rostlin. BIOPREPARÁTY spol. s. r. o., Praha. Available at http://konference.agrobiologie.cz/2009-12-10/24-prochazkova_rulfova_polyversum_-_biologicky_fungicid_na_ochranu_rostlin.pdf (accessed April 19, 2021).

Prokinová E. 2014. Chorby polních plodin. Profi Press, Praha 2.

Prokinová E. 2003. Sborník z konference Řepka, mák, hořčice. Pages 76-80. Praha.

Purdy HL. 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 coi1 against the vascular pathogen *Verticillium longisporum* is not due to increased levels of the active hormone jasmonoyl-isoleucine. Plant Signaling & Behavior. **8**: 11.

Rollins JC, Dickman C, Kohn M. 2014. Genomics of Plant-Associated Fungi and Oomycetes. Dicot Pathogens.

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

Rygulla W, Snowdon RJ, Friedt W, Happstadius I, Cheung WY, Chen D. 2008. Identification of quantitative trait loci for resistance against *Verticillium longisporum* in oilseed rape (*Brassica napus*). Phytopathology **98**: 215–221.

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.

Ślusarski C, Pietr SJ. 2009. Combined application of dazomet and *Trichoderma asperellum* as an efficient alternative to methyl bromide in controlling the soil-borne disease complex of bell pepper. Crop Prot. **28**: 668–674.

Svoboda L. 2007. Použití přípravku Contans WG je doprovázeno vysokou mírou rentability. AgroProtec s.r.o. Kamenný Újezd.

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

Štěpánek P. 2020. Představení odrůd ozimé řepky jednotlivých společností dodávajících osiva na český trh v roce 2020. Agromanuál Kurent, s. r. o., České Budějovice. Available at https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/osivo-a-sadba-1/repka-ozima-odrudy-2020(accessed April 10, 2021).

Thomasow LS, Weller DM, Bonsall R, Pierson LS. 1990. Production of de antibiotic phenazine 1-carboxylic acid by fluorescent pseudomonad species in the rhizosphere of wheat. Applied and Environmental Microbiology. **56**: 908-912.

Tjamos EC, Tsitsigiannis DI, Tjamos SE, Antoniou PP, Katinakis P. 2004. Selection and screening of endorhizosphere bacteria from solarized soils as biocontrol agents against *Verticillium dahliae* of solanaceous hosts. Eur J Plant Pathol **110**: 35–44.

Tomášek J, Cihlář P. 2016. Cesta intensivní výroby kukuřičné siláže či využití přírodních způsobů. Výzkumná stanice FAPPZ Červený Újezd, ČZU v Praze. Available at http://konference.agrobiologie.cz/2016-12-06/28_Tomasek_Cihlar_CESTA_INTENSIVNI_VYROBY_KUKURICNE_SILAZE_CI_VYUZITI_PRIRODNICH_ZPUSOBU.pdf (accessed April 19, 2021).

Toscano-Underwood C, Huang CYJ, Fitt BDL, Hall AM. 2003. Effects of temperature on maturation of pseudothecia of *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* on oilseed rape stem debris. Plant Pathology. **52**. 726-736.

ÚKZÚZ 1. 2014. Padlí brukvovitých. Rostlinolékařský portál, Praha. Available at http://eagri.cz/public/app/srs_pub/fytoportal/public/?key=%22f50546d2ac767ccc6ca48bbc1a080e34%22#rlp|so|choroby|detail:c18ccd9cbe2ba381e37b810d0c5b29f2|popis (accessed April 12, 2021).

ÚKZÚZ 2. 2014. *Plasmodiophora brassicae*. Rostlinolékařský portál, Praha. Available at http://eagri.cz/public/app/srs_pub/fytoportal/public/?key=%22f50546d2ac767ccc6ca48bbc1a

083aac%22#rlp|so|choroby|detail:c18ccd9cbe2ba381e37b810d0c2b38ee|popis (accessed April 12, 2021).

Uppal AK, El Hadrami A, Adam LR, Tenuta M, Daayf F. 2008. Biological control of potato Verticillium wilt under controlled and field conditions using selected bacterial antagonists and plant extracts. Biol. Control **44**: 90–100.

USDA-ARS. 2017. Germplasm Resources Information Network (GRIN) Taxonomy for Plants. United States Department of Agriculture. Available at http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?7661 (accessed April 12, 2021).

Vaněk V, Balík J, Pavlík M, Pavlíková D, Tlustoš P. 2016. Výživa a hnojení polních plodin. Profi Press s. r. o, Praha 2.

Vašák J, Bečka D, Cihlář P, Mikšík V, Růžek L. 2017. Problémy řepky v Evropě, EU, ČR, SR-sucho, zimy, kořeny. Česká zemědělská univerzita v Praze. Available at http://konference.agrobiologie.cz/2017-12-05/01-Vasak-Becka-Bokor-Cihlar-Miksik-Ruzek_PROBLEMY_REPKY_V_EVROPE,_EU,_CR,_SR_-_SUCHO,_ZIMY,_KORENY.pdf (accessed April 19, 2021).

Vašák J, et al. 2000. Řepka – popis řepky, AGROSPOJ Těšnov, Praha, 321.

Vrkoč F, Vach M. 2005. Sborník „Řepka, mák, slunečnice a hořčice“. Česká zemědělská univerzita v Praze, Katedra rostlinné výroby.

Whipps J. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. J Exp Bot **52**:487–511.

YARA. 2021. Olejnatost řepky. YARA Agri Czech republic. Available at http://www.yaraagri.cz/vyziva-rostlin/plodiny/repka/kvalita-repka/olejnatost-repky/(accessed April 10,2021).

Zeise K, Tiedemann AV. 2001. Morphological and physiological differentiation among vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* in relation to *V. longisporum*. J. Phytopathol **149**: 469–475.

Zeise K, Tiedemann AV. 2002. Host specialization among vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* in relation to *Verticillium longisporum*. J. Phytopathol **150**: 112–119.

Zhou L, Hu Q, Johansson A, Dixelius C. 2006. *Verticillium longisporum* and *V. dahliae:* infection and disease in *Brassica napus*. Plant Pathol **55**: 137–144.

9 Seznam tabulek

Tab. 1: Výpis termínů a dávek přípravků u jednotlivých variant

varianta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
aplikace	30.08.2019									
před setím	Contans 2 kg/ha ve 300 l H_2O ($50m^2$)	Contans 2 kg/ha ve 300 l H_2O ($50m^2$)	x	x	X	x	x	x	x	x
aplikace	31.08.2019									
moření	x	X	x	Integral Pro 1,6 l/t	X	x	x	x	x	x
při setí	x	X	x	x	X	Xilon 10 kg/ha	x	x	x	x
aplikace	11.10.2019									
BBCH 14 - 16	x	X	Polyversum 100 g/ha	BAS 750 11F 1,0 l/ha	TOPSIN M 500 SC. 1,2 l/ha	x	Hirundo 1 l/ha	Prometheus 1 l/ha	x	x
aplikace	12.03.2020									
BBCH 30	x	Serenade 4 l/ha	x	x	X	x	x	x	x	x
aplikace	16.03.2020									
BBCH 32				BAS 750 11F – 1,0 l/ha	X	x	Hirundo 1 l/ha	Prometheus 1 l/ha	x	x
aplikace	05.05.2020									
BBCH 65	x	Propulse 1 l/ha	x	BAS 762 02F – 1,0 l/ha	X	x	Hirundo 1 l/ha	Prometheus 1 l/ha	x	x

10 Seznam zkratek

BCA – biological control agent
CFU – Colony Forming Units
CTAB – Cetyltrimethylamoniumbromid
ČZU – Česká zemědělská univerzita v Praze
DASA – dusičnan amonný a síran anommý
DNA – Deoxyribonukleová kyselina
HTS – Hmotnost tisíce semen
LAD – ledek amonný s dolomitem
LAV – ledek amonný s vápencem
MEŘO – methyl ester řepkového oleje
pH – power of hydrogen
qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RPM – Otáčky za minutu
SPZO – Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin

11 Samostatné přílohy

Příloha 1: Flowbox

Příloha 2: Cycler

Příloha 3: Podzimní kontrola porostu 26. 11. 2019

Příloha 4: Jarní kontrola porostu 10. 03. 2020

Příloha 5: pokusy v průběhu sezóny

Příloha 6: strniště

Příloha 7: Pokusy týden před sklizní

Příloha 8: odebírání vzorků

Příloha 9: obebírání vzorků

Příloha 10: stonky na odběr

Příloha 11: stonky na odběr