

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
katedra zahradnictví

**Opatření ke snížení ztrát způsobených vadnutím
vyvolaným houbou *Fusarium oxysporum* f. sp.
conglutinans u vybraného sortimentu brukvovité zeleniny**

.....
doktorská disertační práce

Autor: **Ing. Tomáš Jelínek**

Školitel: **doc. Ing. Martin Koudela, Ph.D.**

Praha 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že svou disertační práci „**Opatření ke snížení ztrát způsobených vadnutím vyvolaným houbou *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* u vybraného sortimentu brukvovité zeleniny**“ jsem vypracoval samostatně pod vedením školitele a s použitím odborné literatury a dalších citovaných zdrojů, které jsou uvedeny v kapitole 8 Seznam použité literatury. Dále jako autor prohlašuji, že jsem s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze, dne

.....

Ing. Tomáš Jelínek

Poděkování

Touto cestou bych rád poděkoval svému školiteli doc. Ing. Martin Koudela, Ph.D. za vedení své disertační práce, podporu a odborný dohled. Mé poděkování patří všem, kteří mi byli nápomoci při tvorbě práce, členům katedry zahradnictví, spolupracovníkům z Mikrobiologického ústavu AV a Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Praze Ruzyni.

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Cíle a hypotézy disertační práce	9
3	Literární přehled.....	10
3.1	Brukvovitá zelenina	10
3.1.1	Zelí hlávkové	10
3.1.2	Kapusta	11
3.1.3	Květák	11
3.1.4	Brokolice	12
3.1.5	Kedluben.....	12
3.1.6	Pekingské a čínské zelí.....	13
3.1.7	Křen selský.....	13
3.1.8	Ředkvička.....	13
3.1.9	Ředkev setá	14
3.1.10	Méně známá brukvovitá zelenina	14
3.1.11	Choroby a škůdci brukvovité zeleniny.....	15
3.2	<i>Fusarium oxysporum</i>	17
3.2.1	Vliv teploty na <i>Fusarium oxysporum</i>	19
3.2.2	Vliv pH na <i>Fusarium oxysporum</i>	20
3.2.3	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>conglutinans</i>	21
3.3	Možnosti ochrany proti <i>Fusarium oxysporum</i>	22
3.3.1	Preventivní opatření.....	22
3.3.2	Chemická ochrana	23
3.3.3	Rezistentní odrůdy	23
3.3.4	Ošetření ozónem (O ₃).....	24
3.4	Interakce vybraných mikroorganismů a <i>Fusarium oxysporum</i>	25
3.4.1	<i>Trichoderma</i> sp.....	25
3.4.2	<i>Pythium oligandrum</i>	28
3.4.3	Nepatogenní kmeny <i>Fusarium oxysporum</i>	29
3.4.4	<i>Pseudomonas</i> sp.....	30
3.4.5	<i>Bacillus</i> sp.	32

3.5	Metody detekce patogenních mikroorganismů.....	34
3.5.1	ELISA	34
3.5.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	35
3.5.3	RT-PCR	36
3.5.4	LAMP	36
4	Materiál a metody.....	38
4.1	Materiál	38
4.1.1	Patogen.....	38
4.1.2	Mikroorganismy	38
4.1.3	Rostlinný materiál	39
4.1.4	Substrát	39
4.1.5	Pěstební médium	39
4.2	Kultivace patogena.....	40
4.3	Metodika založení experimentu s hodnocením vlivu teploty na růst patogena v podmínkách v <i>in vitro</i>	40
4.4	Metodika experimentu s hodnocením vlivu teploty na infekci rostlin zelí hlávkového z inokulovaného substrátu	40
4.4.1	Tvorba inokula a inokulace substrátu	40
4.4.2	Pěstební podmínky	40
4.4.3	Hodnocení	41
4.4.4	Analýza PCR	42
4.4.5	Statistické vyhodnocení	42
4.5	Metodika úpravy pH a hodnocení experimentu	42
4.5.1	Tuhé médium	42
4.5.2	Tekuté médium	42
4.5.3	Statistické vyhodnocení	43
4.6	Miskové experimenty s antagonistickými mikroorganismy.....	43
4.7	Ošetření osiva antagonistickými mikroorganismy	43
4.7.1	Rostlinný materiál	43
4.7.1	Vytvoření suspenze antagonisty a ošetření osiva	44
4.7.2	Statistické vyhodnocení	44
4.8	Metodika ošetření ozónem (O ₃).....	44

5	Výsledky	45
5.1	Vliv teploty na růst mycelia <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>conglutinans</i> v <i>in vitro</i>	45
5.1.1	Rasa 1	45
5.1.2	Rasa 2	46
5.2	Vliv teploty na infekci rostlin zelí hlávkového z inokulovaného substrátu	47
5.2.1	Odrůda 'Pourovo pozdní'	47
5.2.2	Odrůda 'Zeus'	48
5.2.3	Odrůda 'Target'	48
5.2.4	Porovnání odrůd z hlediska citlivosti k fuzariovému vadnutí v různých teplotních podmínkách	49
5.3	Vliv pH na růst mycelia <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>conglutinans</i>	53
5.3.1	Rasa 1	53
5.3.2	Rasa 2	54
5.4	Hodnocení vlivu antagonistického vztahu mikroorganismů na <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>conglutinans</i> rasa 1	57
5.4.1	Bakterie	57
5.4.2	Houby	58
5.5	Hodnocení vlivu antagonistického vztahu mikroorganismů a <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>conglutinans</i> rasa 2	59
5.6	Ošetření osiva antagonistickými mikroorganismy	60
5.7	Ošetření ozonem	61
5.8	Ekonomické zhodnocení využití antagonistických mikroorganismů	63
6	Diskuze	65
6.1	Vliv teploty na intenzitu fuzariového vadnutí u zelí hlávkového	65
6.2	Vliv pH na intenzitu růstu <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>conglutinans</i>	67
6.3	Interakce mezi potenciálně antagonistickými mikroorganismy a <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i> f.sp. <i>conglutinans</i>	69
6.4	Ošetření osiva pomocí <i>Trichoderma asperellum</i>	70
6.5	Ošetření ozónem	71
7	Závěr	73
7.1	Teplota	73
7.2	pH	74

7.3	Antagonistické mikroorganismy.....	74
7.4	Ozón	74
8	Seznam použité literatury.....	75
9	Přílohy.....	92
9.1	Fotografie duálních testů kolonie <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>conglutinans</i> (Foc) rasa 1 s vybranými antagonistickými mikroorganismy na konci experimentu.....	92
9.1	Fotografie duálních testů kolonie <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>conglutinans</i> (Foc) rasa 2 s vybranými antagonistickými mikroorganismy na konci experimentu.....	98

1 Úvod

Brukvovitá zelenina je svým významem nedocenitelná. V roce 2017 dosahovala pěstební plocha hlávkového zelí v ČR přibližně 935 ha a sklizeno bylo 53 348 t, průměrný hektarový výnos v roce 2017 byl 43,83 t/ha (Buchtová 2018). Nutriční hledisko hraje při hodnocení těchto zelenin zásadní roli. Všechny jsou bohaté na vitaminy, minerální látky a látky antioxidační povahy - sulforafany, glukosinoláty, vitamíny A, C a E. Většina těchto zelenin je i vydatným zdrojem vlákniny. Velkou výhodou většiny brukvovitých zelenin je jejich dlouhá skladovatelnost, především zelí, což umožňuje plynulé zásobení trhu po celý rok. Nejvíce pěstovaným druhem v podmínkách ČR je zelí hlávkové.

Rostliny z čeledi brukvovitých, včetně zelí hlávkového napadá (oproti jiným plodinám) velké množství škůdců a chorob. Závažné škody na brukvovitých plodinách způsobuje v teplejších oblastech (oproti ČR) fytopatogenní houba *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*, tento patogen vyvolává tzv. fusariové vadnutí (fusarium wilt nebo fusarium yellow), které je doprovázeno typickým žlutavým zbarvením listů napadené rostliny. Závažnost škod způsobených tímto patogenem je dána také problematickou ochranou, která spočívá převážně v prevenci, rezistentních odrůdách a případnou biologickou ochranou v podobě antagonistických mikroorganismů.

Škodlivost patogena jde ruku v ruce s jeho teplomilností, se stoupající průměrnou teplotou se rozšiřuje i geografický areál patogena. S rozšiřováním patogena se zvětšují oblasti, kde působí závažné škody na plodinách, např. v Ruské federaci se patogen šíří z jižněji položených oblastí dále na sever. Existuje potenciální riziko, že se patogen rozšíří i do teplých oblastí ČR. Tyto faktory musí brát v úvahu i semenářské firmy, které exportují své produkty do zahraničí, kde se s tímto patogenem lze setkat a musí tedy zajistit obchodním partnerům rezistentní odrůdy.

2 Cíle a hypotézy disertační práce

Cíl práce:

Cílem práce je navrhnout soubor dílčích opatření, která povedou ke zlepšení zdravotního stavu vybraného sortimentu brukvovité zeleniny během vegetačního období a po sklizni. Budou optimalizovány pěstitelské postupy především z hlediska minimalizace ztrát působených patogenem *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*.

Hypotézy:

1. Lze předpokládat rozdílnou úroveň patogenity kmenů *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*, které budou odebrány z vybraných produkčních ploch brukvovité zeleniny a otestovány na vybraném sortimentu brukvovité zeleniny.
2. Úprava půdních vlastností (vlhkost, pH, struktura půdy apod.) bude mít statisticky průkazné výsledky na rozvoj a agresivitu patogena.
3. Různé teplotní podmínky budou významně ovlivňovat aktivitu patogena.
4. Vybrané mikroorganismy (např. mykoparazitické houby *Trichoderma harzianum* aj.) průkazně omezí rozvoj *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*.
5. Aplikace ozonu potlačí rozvoj patogena *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*.

3 Literární přehled

3.1 Brukvovitá zelenina

Souhrnně je tak označována zelenina patřící do čeledi *Brassicaceae* (*Cruciferae*) neboli brukvovité (křížaté). Jedná se o rostliny se střídavými a bez palistnatými listy, které jsou porostlé jednoduchými nebo větvenými trichomy. Květy tvoří hrozny, jednotlivé květy jsou čtyřčetné. Plodem je šešule, která puká dvěma chlopněmi. Pro čeleď je typický obsah glukosinolátů. Při narušení pletiv se uvolňuje glukóza a hořčičné silice, které jsou charakteristické ostrou dráždivou až štiplavou chutí, samotné silice pak mají fytoicidní účinky. Velmi znatelné jsou silice např. u křenu, ředkvičky či ředkve. Semena obsahují olej a v různých koncentracích i nenasycené mastné kyseliny, konkrétně kyselinu erukovou a brasikovou. V listech je u řady druhů vysoký obsah vitamínu C. Samotný rod *Brassica* (brukev) zahrnuje asi 40 druhů rozšířených původně ve středomoří. Druh *Brassica oleracea* (brukev zelná) pocházející taktéž ze Středomoří je jako zelenina využívána již po několik tisíciletí, druh se vyznačuje velkou morfologickou variabilitou kulturních forem, které mají různě dlouhý stonk – košťál, odtud také název košťálová zelenina (Novák & Skalický 2012).

Košťálová zelenina obsahuje celou řadu vitamínů, minerálů i látek antioxidační povahy, mezi nimi vyčnívá zejména brokolice s obsahem sulforanu, látkou s protirakovinnými účinky (Petříková et al. 2012).

Brukvovitá zelenina ovšem nezahrnuje pouze košťálovou zeleninu, ale i jiné druhy z čeledi brukvovitých jako je ředkvička, pekingské a čínské zelí, vodnice, tuřín, křen, ředkev atd.

3.1.1 Zelí hlávkové

Plodina je pěstována po celém světě s širokým spektrem využití, lze jej konzumovat v čerstvém stavu, ale zvláště jako kysané zelí. Jedná se o dvouletou rostlinu, které v prvním roce tvoří zkrácenou dužnatou lodyhu, na které jsou rozmístěny zelené či červenofialové listy (Valšíková 2019). Jednotlivá internodia se směrem k vrchu zkracují a vzniká typická hlávka, celý proces je označován jako epinastie. Ve druhém roce zelí vytváří až 1,7 m vysokou květní lodyhu, na které se objevují žluté květy. Zelí je dlouhodobní a cizosprašná rostlina a není náročné na teplotu a řadí se mezi tzv. chladu odolnou zeleninu. Klíčí již při 2 – 3 °C. Optimální teplota pro vegetativní růst je 16 – 20 °C. Během vegetace potřebuje zelí vyšší a rovnoměrnou vlhkost půdy. Nejlepší způsob závlahy je postřikem, před sklizní se množství závlahy omezuje.

Raným odrůdám vyhovují spíše lehčí půdy, pozdním odrůdám naopak půdy těžší. Zelí je velmi náročné na obsah živin v půdě a radíme ho do první trati, hnojíme tedy chlévským hnojem v dávce 50 t/ha a během vegetace přihnojujeme. Rané odrůdy jsou pěstovány z předpěstované sadby, pro letní a pozdní odrůdy je vhodnější založení porostu z přímých výsevů. U hybridních odrůd se vzhledem k ceně osiva ale využívá předpěstovaná sadba (Petříková et al. 2012). Sklizeň probíhá u raných odrůd probírkou, letní a pozdní odrůdy se sklízí mechanicky. Zelí pro skladování je nutné sklízet za suchého počasí a bez mechanického poškození či napadení škůdci. Zelí se skladuje při 0 – 1 °C a relativní vzdušné vlhkosti 85 – 90 %, skladovat je možné až do června následujícího roku (Petříková et al. 2012; Valšíková 2019).

Sklizňová plocha zelí hlávkového v roce 2017 činila 1 217 ha, celková sklizeň byla 53 345 t a průměrný výnos byl 43,83 t/ha (Buchtová 2018).

3.1.2 Kapusta

Rozlišovány jsou celkem tři variety kapust a to kapusta hlávková (*Brassica oleracea* var. *sabauda*), kapusta růžičková (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) a kapusta kadeřavá neboli kadeřávek (*Brassica oleracea* var. *acephala*). Všechny zmíněné patří mezi košťálovou zeleninu. Jedná se o dvouleté a cizosprašné rostliny. Kapusty jsou chladu odolné až mrazuvzdorné zeleniny, zejména pak růžičková kapusta. Obdobně jako u zelí, rané odrůdy pěstujeme spíše v lehčích půdách, naopak pozdní odrůdy spíše v těžších a vododržných půdách. Kapusty jsou náročné na živiny, proto jsou řazeny do první trati (Petříková et al. 2012). Pěstujeme je převážně z předpěstované sadby, ale lze i z přímých výsevů, kapusty se vysévají či vysazují v jarním období, nejlépe v dubnu až květnu. Kromě raných odrůd hlávkové kapusty se kapusty sklízí mechanizovaně. Růžičkovou kapustu a kadeřávek lze bez problému sklízet i během zimního období (Pokluda 2009).

3.1.3 Květák

V případě květáku (*Brassica oleracea* var. *botrytis* subv. *cultiflora*) se jedná o jednoletou košťálovinu a konzumní částí je fasciované zdužnatělé květenství. Květák je náročný na živiny, proto ho radíme do první trati. Ranému květáku vyhovují spíše lehčí písčitohlinité půdy, těžší a vododržné půdy jsou vhodné pro pozdní odrůdy. Jedná se o chladu odolnou zeleninu, vysoké teploty způsobují oddálení tvorby růžic, optimální teploty pro růst jsou 18 - 20 °C. Květák pěstujeme téměř vždy z předpěstované sadby (Koike et al. 2009).

V podmínkách ČR probíhá výsadba raných kultur od přelomu března a dubna, pozdní kultury až do počátku června (Petříková et al. 2012).

Květák se sklízí probírkou, v oblastech s celoročním pěstováním i 4x za sezónu. Květák je možno skladovat maximálně po dobu 1 měsíce při teplotě 0 °C a 95 % vzdušné vlhkosti, při vyšších teplotách se růžice velmi rychle kazí, např. při teplotě 3 °C vydrží pouze 2 týdny, při teplotě 10 °C pouze 5 dnů (Koike et al. 2009).

3.1.4 Brokolice

Tak jako květák i brokolice (*Brassica oleracea* var. *italica*) je jednoletá košťálovina jejichž konzumní části jsou květy. Brokolice se pěstovala už ve starověkém Římě, ale například do USA se dostává až v roce 1925 (Le Strange et al. 2010).

Je to kultura náročná na živiny a řadíme ji do první trati. Vyžaduje těžší a vododržné půdy a vyhovují jí obdobně jako kvěťáku teploty do 20 °C a snáší pokles teplot k minus 8 °C. Při vysokých teplotách tvoří méně růžic a rychle vykvétá. V našich podmínkách má termíny výsevu či výsadby obdobné jako květák (Petříková et al. 2012).

Brokolici sklízíme probírkou, světle až tmavě zelenou, s uzavřenými poupaty a kompaktní pevnou růžicí. Po sklizni by se měla co nejdříve schladit a zabalit, při teplotě 0 °C je možno skladovat až měsíc. V ČR je pěstební plocha brokolice v roce 2018 (dohromady s kvěťákem) 34 ha (Buchtová 2018). Pro porovnání v USA je to 52 630 ha a 90 % této plochy se nachází v Kalifornii. Brokolice se v Kalifornii (podle lokality) oproti ČR pěstuje po celý rok i během zimních měsíců. Například v USA je stoupající trend v konzumaci brokolice, zejména díky novým zjištěním, že patří k zeleninám s největším obsahem vlákniny a z košťálovin i glukosinolátu sulforafanu který zpomaluje rakovinné bujení (Le Strange et al. 2010).

3.1.5 Kedluben

Kedlubna neboli kedluben (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*) se pěstuje kvůli osní hlíze, která vzniká zkrácením stonku a sekundárním ztloustnutím. Hlízy jsou kulovité až ploše kulovité. Listy jsou dlouze řapíkaté, u modrých odrůd jsou silně ojíněné. Má slabý kořenový systém, bílé odrůdy jsou náchylnější k praskání a dřevnatění nežli modré. Ve druhém roce vytváří kedlubna květní stvol. Kedlubny jsou i přes svou kratší vegetační dobu náročné na živiny a řadí se do první trati. Rané kedlubny se pěstují hlavně z předpěstované sadby, výsadba probíhá v březnu až dubnu, pro letní a podzimní sklizně se vysévají od dubna do počátku června. Rostliny se sklízí převážně probírkou (Petříková et al. 2012), podle Drost & Johson

(2010) se dají skladovat 2 - 3 týdny při 95 % vlhkosti vzduchu. Kedlubny jsou chladu odolné zeleniny, ale jsou náchylné na jarovizaci, které nastává při poklesu teplot pod 7 °C, naopak vysoké teploty během vegetace snižují růst a snižují kvalitu dřevnatěním hlíz. V teplejších oblastech je doporučováno pěstovat kedlubny na jaře či na podzim (Drost & Johson 2010).

3.1.6 Pekingské a čínské zelí

Obě rostliny pocházejí s dálného východu a řadí se k listové zelenině. Jak pekingské (*Brassica pekinenses*) tak čínské zelí (*Brassica chinensis*) jsou nenáročné zeleniny, dají se s úspěchem pěstovat i ve vyšších polohách. Pěstují se jako následná plodina, porost se zakládá v červenci z přímých výsevů nebo se sadby. Kultura se sklízí v září až říjnu a to probírkou. Zatímco pekingské zelí lze skladovat do ledna až února, čínské lze skladovat v ideálních podmínkách 5 - 6 týdnů (Pokluda 2009).

3.1.7 Křen selský

Křen selský (*Armoracia rusticana*) vytváří přízemní růžici řapíkatých oválných listů. Křen se pěstuje po celém mírném pásu pro jeho kořen, který obsahuje hořčičnou silici a je bohatý na vitamín C. V Evropě, USA i Kanadě se pěstuje jako jednoletá kultura s dlouhou vegetační dobou. Pro lepší vývoj kořenů křenu vyhovuje teplý průběh léta a chladnější počátek podzimu. Sází se brzy z jara a sklízí po prvním přemrznutí natě na podzim. V případě trvalé kultury typické pro oblasti s krátkou vegetační dobou se sklízí každý druhý rok a rostlina se nechává na poli kvůli regeneraci. Víceleté kultura je na stanovišti klidně 10 – 20 let, vytrvalá kultura je ale náročnější na celkové ošetřování. Na klimatické podmínky stanoviště je nenáročný a má velkou schopnost adaptace, ale vyhovují mu hluboké hlinité půdy. Jako jedna z málo zelenin se množí vegetativně a to kořenovými řízků (Bratsch 2009).

3.1.8 Ředkvička

Ředkvička neboli *Raphanus sativus* var. *radicula*, je spotřebitelsky velmi oblíbená brukvovitá zelenina. Jedná se o velmi starou plodinu, která měla svůj význam již před 5 000 lety. Dnešní ředkvičky jsou tzv. evropské ředkvičky. Jedná se o jednoletou rostlinu s krátkou vegetační dobou, v ideálních podmínkách je možné sklízet po 28 dnech. Zelenina se pěstuje pro dužnaté bulvičky, které vznikají ztloustnutím hypokotylu a obsahují glukosinoláty – ty způsobují její typickou chuť. Nedostatek vláhy a vyšší teploty mohou způsobit vyšší palčivost. Tvar bulviček bývá většinou kulovitý a barva červená, existují však odrůdy bílé, žluté, černé,

zelené apod. Vyhovují jí půdy dobře zásobené humusem s dostatkem živin. Klíčí již při teplotách 2 – 4 °C, optimum je však 12 – 14 °C. Ředkvičky vyséváme ihned z jara, jakmile to umožní klimatické podmínky. Sklízí se, když bulvičky dosáhnou požadované velikosti (podle odrůdy). V dobrých podmínkách (0 °C a 95 % vlhkost) je možno ředkvičky skladovat 3 - 4 týdny (New England vegetable management guide).

Pro ředkvičku je typické rychlení v krytých prostorách. Vzhledem k její krátké vegetační době a citlivosti na dlouhý den pěstujeme ředkvičku jako předplodinu nebo následnou plodinu (Malý & Petříková 1998).

3.1.9 Ředkev setá

Velmi podobná ředkvičce je ředkev setá (*Raphanus sativus* var. *niger*), liší se zejména větší velikostí a delší vegetační dobou. Nároky jsou velmi obdobné jako u ředkvičky, je nenáročná na teplo. Rané odrůdy vyséváme v dubnu, pozdní odrůdy v červenci, vegetační doba je 8 – 12 týdnů podle odrůdy. Bulva může být kulovitá nebo válcovitá, pozdní odrůdy se dají skladovat až 6 měsíců (Malý & Petříková 1998).

3.1.10 Méně známá brukvovitá zelenina

Mezi méně známou zeleninu v našich podmínkách by se dal zařadit tuřín s vodnicí a několik asijských zelenin. Tuřín (*Brassica napus* var. *napobrassica*) se pěstuje zejména pro svoji bulvu, konzumovat je však možné i listy v závislosti na odrůdě. Jedná se o chladu odolnou zeleninu, která se v našich podmínkách pěstuje pro jarní podzimní sklizeň, na jaře se vysévá či vysazuje předpěstovaná sadba, jakmile to umožňuje počasí. Pěstování za vyšších teplot zhoršuje kvalitu bulvy. V teplejších oblastech (např. Texas), lze tuřín pěstovat celou zimu. Bulvy tuřínu, lze snadno skladovat v chladu po několik týdnů (Masabni 2014).

Podobnou zeleninou jako tuřín je zmíněná vodnice *Brassica rapa* var. *rapa*, která se řadí mezi kořenovou zeleninu, dnes se pěstuje zejména ve Skandinávii, Francii, Velké Británii nebo Kanadě ale byla známa už ve starém Řecku a Římě. Jedná se o dvouletou rostlinu, v prvním roce vytváří konzumní část – bulvu. Je to nenáročná plodina, které vyhovují teploty do 20 °C a snáší teploty až do – 8 °C, vyšší teploty znehodnocují bulvu. Pěstují se z přímého výsevu v březnu a dubnu, pro pozdní sklizeň v červnu až srpnu a sklízí se v říjnu až listopadu. Při sklizni se seřízne nať, ale ponecháváme srdéčko (Šlosár 2014).

Z asijských zelenin se jedná především o mizunu (*Brassica nipposinica*), mibunu (*Brassica rapa* ssp. *Japonica*), čínskou hořčici (*Brassica juncea*) a čínskou brokolici (*Brassica*

alboglabra). Všechny zmíněné druhy mají společný asijský původ, nenáročnost a krátkou vegetační dobu. Kromě čínské brokolice, u které se sklízí nerozkvetlá poupata, se jedná o listovou zeleninu. Rostliny nejsou náročné na teplotu, jedná se spíše o chladu odolnou zeleninu, mizuna snáší pokles teplot i k -15 °C. Rostliny se pěstují z jarního výsevu, případně v předpěstované sadbě, která se vysazuje taktéž na jaře, čínskou brokolici je možné pěstovat i jako podzimní kulturu z červencových výsevů (Petříková et al. 2012).

3.1.11 Choroby a škůdci brukvovité zeleniny

Mezi fyziologické poruchy patří zejména praskání hlávek či deficity jednotlivých prvků, zejména vápníku (Ca) (Ackermann & Kazda 2014) a molybdenu (Mo) (Rod 2017). Z virových chorob jde o virovou mozaiku kvěťáku nebo virovou mozaiku vodnice (Petříková et al. 2012). Nejzávažnější chorobou nejen zelí ale i ostatních brukvovitých plodin je nádorovitost kořenů brukvovitých (*Plasmodiophora brassicae*), na kořenech rostlin se vytváří nádory, rostlina krní a zaostává v růstu, ochrana spočívá především v prevenci (agrotechnika, zdravá sadba, vápnění, pěstování ředkve olejné) a pěstováním rezistentních odrůd (Petříková et al. 2012). Další chorobou je bakteriální černá žilkovitost brukvovitých (*Xantomonas campestris* pv. *campestris*), typickým příznakem jsou chlorotické výseče ve tvaru písmena V, bakteriózu podporuje vlhké a teplé počasí, základní prevencí je zdravé neinfikované osivo (Meenu et al. 2013). Mezi další významné choroby patří plíseň brukvovitých (*Hyaloperonospora parasitica*), která působí největší škody na sazenicích a semenářských porostech, na listech se objevují žlutavé skvrny, starší listy žloutnou a odumírají, silné napadení rostlin může vést až k úhynu rostliny (Ackermann & Kazda 2014). Podobné škody způsobuje Alternáriová skvrnitost brukvovitých (*Alternaria brassicola* a *A. brassicae*), která se projevuje hnědočernými až černými mírně propadlými skvrnami, silné napadení může vést až k úhynu rostlin, nejdůležitější opatření je zdravé osivo a jeho moření (Rod 2017). U brukvovité zeleniny se vyskytuje i tzv. černá noha způsobená fómovou hnilobou brukvovitých (*Leptosphaeria maculans*), na děložních listech, lodyze a kořenovém krčku a kořenech mladých rostlin šedohnědé skvrny s tmavším okrajem. Listy vadnou, silně napadené rostliny mohou uhynout (Ackermann & Kazda 2014)

Jedním z nejzávažnějším škůdcem brukvovité zeleniny je květilka zelná (*Delia radicum*), jejichž bílé larvy ožírají kořeny, zejména boční kořeny, rostliny krní, vadnou, mladé rostliny mohou i uhynout, v chodbičkách pak může sekundárně docházet k hnilobám pletiv (Petříková et al. 2012). Na brukvovité zelenině škodí několik druhů krytonosců a to krytonosec řepkový

(*Ceutorhynchus napi*), který poškozují vegetační vrcholy, způsobuje praskání kedluben. Krytonosec čtyřzubý (*Ceutorhynchus pallidactylus*) jehož larvy vyžírají chodbičky v listech, řapících a později i v lodyhách. Krytonosec zelný (*Ceutorhynchus pleurostigma*) jehož larvy způsobují vznik hálek na hypokotylu a kořenech rostlin (Ackermann & Kazda 2014).

Poměrně velké šedomodré kolonie vytváří na brukvovité zelenině mšice zelná (*Brevicoryne brassicae*), přítomností mšic dochází ke žloutnutí, deformaci listů a zpomalení růstu, může dojít až k zaschnutí vegetačního vrcholu – vyslepnutí. Rostliny i okolní půda jsou pokryty voskovitým prachem. Mšice mají během vegetace až 16 generací. Při napadení nad 10 % je nutné provést chemické ošetření porostu (Smith et al. 2016). Ve vzcházejících porostech způsobují významné ztráty dřepčici (*Phyllotreta* sp.). Brouci vykusují drobná okénka (1,5 - 2 mm) na vrchní straně listů (i děložních), při silném napadení mladé rostliny odumírají. Chemická ochrana se doporučuje pouze u přímých výsevů. Velmi účinnou ochranou je zakrytí porostů netkanou textilií (Petříková et al. 2012). Asi nejznámějším škůdcem na brukvovité zelenině je motýl bělásek zelný (*Pieris brassicae*). Housenky bělásky škodí na rostlinách žírem až holožírem, samotní dospělci nijak neškodí. V poslední době se stává hojnější bělásek řepový (*Pieris rapae*), oproti předchozímu druhu jsou vajíčka kladena jednotlivě a ne ve snůšce. Housenky skeletují listy, postupně zžírají čepel listů a následně se prokusují do hlávek zelí a kapusty, kde se kuklí. Velmi podobně škodí i další členové řádu *Lepidoptera*; to můra zelná (*Mamestra brassicae*) a můra kapustová (*Polia oleracea*), v listech jsou vykousané otvory a může dojít až k holožírui, postupně se housenky vžirají do hlávek. Spodní části rostlin, zejména kořenový krček jsou ožrané a provrtané osenicí polní (*Agrotis segetum*), v noci housenky ožirají listy. Jestliže je housenkami napadeno více než 10 %, je vhodné použít chemickou ochranu (Ackermann & Kazda 2014).

Během teplých let se může přemnožit západníček polní (*Plutella xylostella*), jedná se o drobného motýla, jehož housenky skeletují na spodní straně listu, starší housenky se vžirají do hlávek, velkým problémem je rezistence vůči chemickým přípravkům, např. v letech 2015 - 2016 byla zjištěna rezistence proti pyretroidům (Kovaříková & Kocourek 2017).

Korkovitost na listech tvořící hlávku způsobují třásněnky (*Thrips* sp.), třásněnky sají na listech, zejména pak na srdéčkách, posátá místa jsou stříbrná, později zasychají, škody působí především na předpěstované sadbě v krytých prostorách. Škůdcem, který znehodnocuje rostliny je molice vlašovníková (*Aleurodes proletella*), molice vylučuje medovici, na které se následně vytvářejí povlaky černí, molice škodí i přenosem viróz (Petříková et al. 2012).

K vyslepnutí či zahnívání vegetačních vrcholů (srdéček) dochází vlivem činnosti larev plodomorky zelné (*Contarinia nasturtii*), čímž dochází k tzv. vícehlavosti či mnohohlavosti

rostlin, která je způsobena tím, že se náhradní výhony vytvářejí z adventivních pupenů (Rod 2017).

3.2 *Fusarium oxysporum*

Druh *Fusarium oxysporum* je nejrozšířenější zástupce svého rodu (*Fusarium*), vyskytuje se na všech možných stanovištích, od pouští, tropů až po Arktidu, bez ohledu na to, zda je půda obhospodařovaná či nikoliv. Jedná se o hospodářsky nejvýznamnějšího patogena z rodu *Fusarium*. Tohoto druhu se do roku 2006 týkalo přes 6000 vědeckých článků (Leslie & Summerell 2006).

Celkově se rozlišuje více než 120 form specialis. Např. *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *capsici*, *spinacia*, *melonis*, *cucumerinum*, atd. Z toho vyplývá že, *F. oxysporum* způsobuje ztráty na spoustě plodin z odlišných čeledí či odlišných pěstebních nároků. Všechny kmeny jsou saprofytické, schopné růst a přežít po dlouhou dobu na organické hmotě v půdě a ve vodě. Houba proniká do kořenů, kde vyvolává tracheomykózy (Larkin & Fravel 1998; Fravel et al. 2003).

Fusarium oxysporum může být rozšiřováno mnoha způsoby, včetně větru, infikovanou půdou, semeny, infikovanými rostlinami nebo dokonce hmyzem, nalezen byl i u mořských řas. Druh je specifický tvorbou tří typů spor, makrokonidií, mikrokonidií a chlamydospor. Makrokonidie (35 - 70 μm) jsou produkovány v konidioforech ve sporodochiu ve velmi hojném množství a bývají světle oranžové. Spóry jsou krátké až středně dlouhé, rovné až mírně zakřivené, relativně štíhlé, zakřivené s lehkým háčkem, tenkostěnné, rozdělené třemi přepážkami. Mikrokonidie (5 - 15 μm) jsou oválné, eliptické nebo ledvinovitého tvaru, obvykle bez přepažení, oproti makrokonidiím bývají přítomny po celém myceliu. Chlamydospory jsou silnostěnné spóry, které umožňují přežít patogenu nepříznivé období. Chlamydospory jsou tvořeny v hyfách a bývají tvořeny v hojném množství, jsou však známi izoláty, které tvoří chlamydospory v malém množství anebo je netvoří vůbec. Spóry se tvoří obvykle ve dvojicích, je však možné je najít i v krátkých řetězcích (Leslie & Summerell 2006).

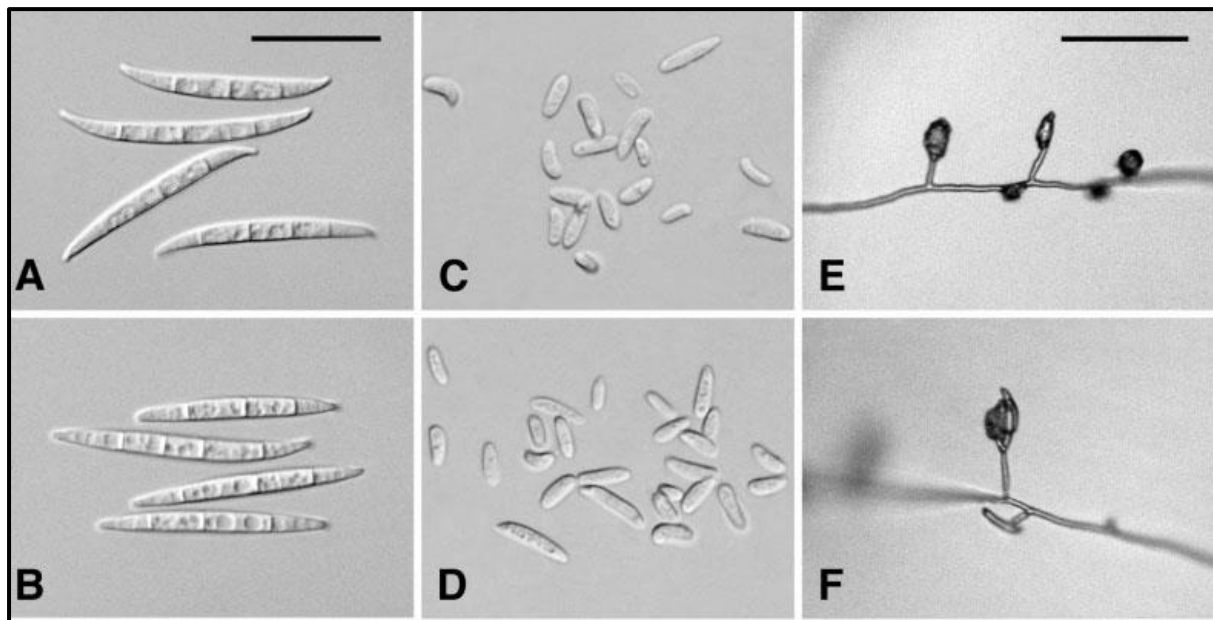
Spory patogena mohou být již přítomny v půdě, na infikovaných posklizňových zbytcích nebo mohou být zavlečeny do nových oblastí infikovaným osivem. Spory klíčí v reakci na výměšky osiva či kořenů (Kochman 2007).

Fusarium oxysporum je houbový patogen, který napadá rostliny přes kořeny a vrůstá přímo do cévních svazků (xylém). Po dosažení xylému patogen zůstává již pouze ve vodivých pletivech, kde se šíří pomocí mikrokonidií, které jsou nesený transpiračním proudem dále

vzhůru rostlinou. Samotné vadnutí je způsobeno aktivitou patogena, tj. akumulací mycelia nebo tvorbou toxinů, dále je způsobována obranou reakcí rostlin, které tvoří gely, gummy, tylosy a antifungální látky. Dokud je rostlina živá, houba zůstává izolována pouze v xylému a přilehlých buňkách. Pokud rostlina uhne, houba napadá parenchym a hojně se sporuluje na povrch rostliny (Di Petro et al. 2003).

U rezistentních rostlin je tvorba obraných bariér mnohem rychlejší a je doprovázena antimykotickými sloučeninami. Přítomnost antifungálních látek brání dalšímu šíření patogena transpiračním proudem. U citlivých rostlin je tvorba gum a gelů pomalejší, stejně jako tvorba a kumulace antifungálních látek, což umožňuje patogenu rychle osídlit vodivá pletiva (Flood 2006).

V rámci druhu se běžně v půdě vyskytují tzv. nepatogenní kmeny, které jsou důležitou součástí supresivní půdy, kde dochází k významnému snížení nebo dokonce eliminaci fusariového vadnutí, formou systematické (indukované) rezistence. Nepatogenní kmeny soupeří s patogenními kmeny o živiny nebo o prostor v blízkosti kořenů (rhizosféra). Může být však obtížné identifikovat efektivitu a ekonomické provedení biologického ošetření inokulem nepatogenního kmenu, jsou známi případy, že je velmi rozdílná účinnost v závislosti na prostředí – skleníky x pole (Leslie & Summerell 2006).



Obrázek 1: *Fusarium oxysporum*. A – B: Makrokonidie; C – D: Mikrokonidie; E – F: Mikrokonidie in situ. A – D, měřítko = 25 μm ; E – F, měřítko = 50 μm (Leslie & Summerell 2006).

3.2.1 Vliv teploty na *Fusarium oxysporum*

Infekce patogenem je ovlivněna podmínkami životního prostředí, především teplotou. Teplota nad 17 °C, podporuje rozvoj patogena, agresivita patogena je na vrcholu při 25 °C (Kochman 2007).

Podle (Koike et al. 2007) je *Fusarium oxysporum* nejaktivnější při teplotách 24 – 29 °C a minimální rozvoj patogena pod 16 °C, podobné rozmezí teplot je optimální i pro ostatní druhy rodu *Fusarium*, například *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. napiforme* i *F. oxysporum*, které rostou nejlépe při teplotě 25 – 30°C (Mogensens et al. 2009; Mohsen et al. 2016), naopak např. *F. sacchari* a *F. globosum* rostou dobře při teplotě 20°C (Mohsen et al. 2016).

Aktivita formae specie druhu *Fusarium oxysporum* začíná při teplotách okolo 15 °C, při teplotách nad 30 °C se růst zpomaluje a ustává (Fravel et al. 1995; Gheorghe et al. 2015; Chitarra et al. 2015; Somu & Thammaiah 2015; Fovo et al. 2017).

Jednotlivé studie uvádí teplotu 25 °C jako optimální pro růst *F. oxysporum* f.sp. *lacutacea* (Scott et al 2010) *F. oxysporum* f.sp. *solanii* (Fayzalla et al. 2008) *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Hibar et al. 2006) a *F. oxysporum* f.sp. *erythroxyli* (Fravel et al. 1995). Teplotu 28 °C uvádí Fovo et al. (2017) jako optimální pro růst mycelia *F. oxysporum* a Gupta et al. (2010) pro *F. oxysporum* f. sp. *pisidii*. Farooq et al. (2005) uvádí pro *F. oxysporum* f.sp. *ciceri* optimální teploty 25 až 30 °C. Gheorghe et al. (2015) uvádí větší rozpětí teploty pro optimální růst mycelia *F. oxysporum* f.sp. *glycines*, konkrétně 22 - 28 °C. Studie dále uvádí zastavování růstu při teplotách nad 35 °C.

Koike et al. (2007) se zmiňují o rozvoji patogena v rozmezí 17 - 35 °C, při nižších teplotách mohou být rostliny napadeny, ale nemusejí se projevit příznaky. Tamietti & Garibaldi (1978) se ve své studii zmiňují, že infekce patogenem nastává při teplotách v rozmezí 17 - 35 °C, dále upřesňuje, že malá aktivita patogena začíná již za teploty 12 °C, optimální teplota pro infekci je však 26 - 27 °C. Wong (2003) považuje teplotu 28 °C, půdy i vzduchu jako optimální pro vznik infekce, dále publikuje teplotu nad 34 °C a pod 17 - 20 °C jako teplotu brzdící rozvoj patogena. Webb et al. (2015) publikovali, že teploty nad 24 °C, vedou k intenzivnějšímu projevu příznaků fusariového vadnutí, zatímco teploty pod 16 °C vedou k min. počtu příznaků. Při *in vitro* podmínkách v rozmezí 15 - 35 °C, největšího růstu *F. oxysporum* dosahovalo při teplotě 25 °C, autor upřesňuje, že ideální teplota nemusí zcela odpovídat intenzitě onemocnění.

3.2.2 Vliv pH na *Fusarium oxysporum*

Druhy rodu *Fusarium* (včetně *F. oxysporum*) mají schopnost růst v podmínkách pH v rozmezí 4 – 10 (Thomson et al. 1992) a preferují zejména kyselé hodnoty pH (Agarwal & Sarbhoy 1978). U druhu *F. graminearum* se uvádí optimální růstu při hodnotě 7,2 pH a schopnost růst při rozpětí od 3 – 10 pH, autoři dále uvádí, že druh roste lépe v alkalickém prostředí nežli kyselém (Wheeler et al. 1990). Farkya et al. (1996) uvádí maximální růst a sporulaci *F. solani* při pH 5,5, houba ale roste za hodnot pH 4 – 8. Druh *F. moniliforme* roste velmi dobře v rozpětí od 3 – 9,5 pH (Wheeler et al. 1990). Hodnotu pH 7,5 jako optimální pro růst mycelia druhu *F. oxysporum* uvádějí Mohsen et al. (2016).

Hodnoty pH ovlivňují rychlost růstu mycelia *Fusarium oxysporum* (Jahuar & Prasad (2011; Tyagy & Paudel 2014). Patogen je schopen stabilně růst v rozmezí 5,5 – 10 pH (Yamamoto et al. 1985). Druh *F. oxysporum* roste nejlépe při hodnotách 6 a 8 pH, naopak snižujícím se pH (4) se růst zpomaluje (Thomson et al. 1992). Pro *F. oxysporum* je uváděna také hodnota 4 – 7 pH (Frans et al. 2017).

Avšak v literatuře existují informace vlivu hodnot pH na růst především o druhu *F. oxysporum* jako takovém, specifikace pro jednotlivé formae specialis jsou velmi nedostatečné. Studie Jaruhar & Prasad (2011), která je zaměřená na *Fusarium oxyporum* f.sp. *lentis* uvádí hodnotu pH 6 - 9. Hodnotu pH 6,5 udávají jako optimální Tyagy & Paudel (2014) při pokusech s *F. oxysporum* způsobující vadnutí rajčat, Cha et al. (2007) udávají jako optimální hodnotu pH 7 pro růst mycelia *Fusarium oxysporum* izolovaného z papriky. Oproti tomu Frans et al. (2017) uvádí u stejného druhu škodící na paprikách optimální hodnoty pro růst hodnoty 4 - 7 pH, autoři dále uvádějí snížení růstu mycelia patogena o 50 % při hodnotě pH 3 a lepší snášení spíše alkalických hodnot pH než kyselých. Pro patogena *F. oxysporum* f.sp. *capsici* je rozpětí růstu mezi 4 - 9 pH a jako optimum pro růst hodnotu pH 7, následovanou pH 6 (Attri et al. 2018).

Jako nejvhodnější pro růst *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* udávají Farooq et al. (2005) hodnoty 6 - 7 pH. Podobné výsledky publikovali i Nagao & Hattori (1983), kteří optimální hodnotu pH pro tvorbu hyf *Fusarium oxysporum* f.sp. *raphanii* uvádějí 6,5 a 7 pH. Mohsen et al. (2016) uvádějí u druhu *F. oxysporum* hodnotu pH 7,5 jako optimální pro růst mycelia, dále je uváděn dobrý růst při hodnotách pH 5,5 a 6,5 a o polovinu nižší intenzitu růstu mycelia při hodnotě pH 4,5.

Mycelium *Fusarium oxysporum* narůstá s rozdílnou intenzitou při všech hodnotách pH Gheorghe et al. (2015), autoři dále uvádí zhoršení růstu mycelia *F. oxysporum* při hodnotách

větších než pH 7. Rathore et al. (2015) udávají u *Fusarium oxysporum* f.sp. *cumini* hodnotu pH 8 jako optimální pro růst mycelia. Gupta et al. (2010) u *Fusarium oxysporum* f.sp. *solanii* uvádějí jako optimální hodnotu pH 5,5. *Fusarium oxysporum* podle Yamamoto et al. (1985) roste nejlépe při hodnotách pH 4,5 - 6.

Napadení patogenem podporují mírně kyselé půdy (5 - 5,5 pH), vadnutí významně snižuje pH 6 - 7 (Zitter 1998). Fusariové vadnutí je onemocnění, převládající na kyselých půdách, zvýšení pH půdy na 6,5 - 7 pomáhá snížit výskyt patogena (Wong 2003).

3.2.3 *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans*

S neustále stoupajícími teplotami a častějším výskytem sucha se mohou objevit organismy, které jsou běžné především v jižněji položených oblastech. To se může týkat i teplomilných patogenů (Shabani et al. 2014). Vyšší teploty a zvýšená frekvence suchých období nebo malé množství vody v půdě poskytují ideální podmínky pro fytopatogenní houbu *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* (Koike et al. 2007).

Fusarium oxysporum f.sp. *conglutinans* (dále Foc) napadá rostliny z čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*) a způsobuje tzv. fusariové vadnutí (fusarium wilt, fusarium yellow). Vážné problémy působí na řepce, hořčici, zelí a ředkvičkách. Počáteční symptomy napadení rostlin Foc se projevují žloutnutím listu či listů, často jen na jedné straně (Obrázek 2) a jejich následným hnědnutím a opadem. Postupem času, v závislosti na podmínkách, rostlina žloutne, vadne a následně hyne. Pro infekci Foc je charakteristické světle hnědé zabarvení cévních svazků stonků nebo větších kořenů. Patogen způsobuje vážné problémy především, při vyšších teplotách (Gaetán 2005; Koike et al. 2007; Kochman 2007; Lange et al. 2007, Liu et al. 2017).



Obrázek 2: Počáteční symptom Foc (Foto autor).

Ztráty na plodinách čeledi *Brassicaceae* způsobené fusariovým vadnutím jsou známy po celém světě. Například Kochman (2007) uvádí informace o problémech s patogenem Foc z Austrálie, Lange et al. (2007) z Kanady, kde patogen způsobuje až 30 % ztráty na řepce, problémy s patogenem jsou známy také v Itálii (Garibaldi et al. 2006), Argentíně (Gaetán 2005), Kalifornii (Kendrick 1930) nebo v Ruské federaci, kde se šíří z jižněji položených oblastí dále na sever (Dzhalilov & Ha 2014).

Dříve bylo rozlišováno celkem 5 ras Foc (Armstrong & Armstrong 1952; Bosland & Williams 1984), rasa 1 napadá převážně zelí a ostatní brukvovité, rasa 2 ředkvičky, rasa 3 a 4 napadá rostliny z rodu *Matthiola*, rasa 5 napadá zelí, později byly rasy osamostatněny jako *formae speciales* a to: *conglutinans* 1 a 2, *raphani* a *mathioli* 1 a 2 (Li et al. 2015).

Z hospodářského hlediska jsou významné obě rasy 1 a 2, které způsobují největší škody (Kistler et al. 1987; Kistler et al. 1997). Rasa 2 se liší oproti rase 1 tvorbou většího počtu konidií, čímž se prvotní symptomy napadení vyskytnou rychleji (Li et al. 2015).

3.3 Možnosti ochrany proti *Fusarium oxysporum*

Pro rozvoj patogena je důležitá teplota půdy. Teplota nad 17 °C, podporuje rozvoj patogena, jeho agresivita je na vrcholu při teplotách okolo 25 °C. Teplomilnosti patogena lze využít k pěstování raných odrůd brukvovité zeleniny v jarních nebo podzimních měsících, kdy je nižší teplota půdy a aktivita patogena je menší. Tímto agrotechnickým opatřením se vyhneme zvýšenému tlaku patogena, který nastává během teplejších měsíců.

3.3.1 Preventivní opatření

V zabránění výskytu patogena jsou velmi důležitá preventivní opatření. Zabránit rozšíření infikované půdy na nezamořené stanoviště. Patogen může být přenesen infikovanou půdou, nalepenou na zemědělských strojích, náradí, botách i oblečení pracovníků, stejně tak infikovanými zbytky kulturních plodin nebo plevelů z čeledi *Brassicaceae* (Kochman 2007).

Dobrym nástrojem snížení koncentrace spor patogena v půdě je dodržování osevních postupů, odstupu mezi brukvovitými plodinami (4-5 let), nepoužívat brukvovité rostliny jako zelené hnojení (hořčice) a důsledná likvidace plevelů z této čeledi (především kokoška pastuší tobolka, penízecká rolní a výdrok řepky a hořčice). Časté pěstování brukvovitých plodin zvyšuje množství spor v půdě. Spory se také šíří závlahou nebo deštěm, kdy dochází ke splavení spor z půdy. Zhutnění půdy podporuje rozvoj patogena, protože dochází k poškozování kořinek rostlin (Kochman 2007).

Ovlivňování pH půdy, je velmi často doporučováno v souvislosti s jinými půdními patogeny, avšak pH a vlhkost půdy má minimální vliv na vývoj uvedeného patogena (University of Illinois 1988). Nicméně určitou roli hraje koncentrace některých prvků v půdě. Konkrétně aktivitu patogena podporuje vysoký obsah dusíku, především forma NH_4^+ a snížení dusičnanové formy dusíku, dále lehké, písčité a mírně kyselé půdy 5 - 5,5 pH. Vadnutí významně snižuje pH 6 - 7 a snížení obsahu dusíku v půdě (Zitter, 1998; Wong 2003). Arya & Kuwatsuka (1993), dokonce

zmiňují jako možný způsob potlačení *F. oxysporum* vyšší koncentraci dusičnanů v půdě, účinek dusičnanů byl výraznější v půdě s vyšším obsahem Ca. Uváděn je také nedostatek draslíku, který vede k intenzivnějšímu projevu symptomů napadení Foc (University of Illinois 1988).

3.3.2 Chemická ochrana

Chemická ochrana a rezistentní odrůdy jsou hlavní způsoby ochrany proti fusariovému vadnutí (Kochman 2007). Nicméně aplikace fungicidů bývají neúčinné, protože nemusí zasáhnout mycelium a všechny spory, které jsou ve velkém měřítku produkovány do prostředí. Chemická ochrana v polních podmínkách bývá zpravidla neefektivní nebo neekonomická (Ghazalibiglar et al. 2016). Výskyt napadení se projevuje většinou až v průběhu vegetace a na použití fungicidů ve fázi prvních symptomů je už pozdě. Fungicidy se mohou preventivně používat především na množitelských plochách případně při preventivním ošetření osiva (Kochman 2007).

3.3.3 Rezistentní odrůdy

Rezistentní odrůdy jsou důležitým nástrojem k ochraně proti patogenu. Například Kochman (2007) uvádí u řepky existující rezistentní odrůdy; 46A76, SW RideR, Quantum a Nexera 710, je zřejmě rezistentní nebo mírně odolná proti Foc. Rezistentní odrůdy nabízejí nejlepší ochranu proti Foc.

U zelí se uvádí rezistence dvojího typu, A a B. Odrůdy s typem A vykazují rovnoměrnou odolnost bez ohledu na teplotu půdy. Odrůdy typu B vykazují vysokou odolnost, ale pouze pokud je teplota půdy do 21 °C. Při zvýšení teploty nad 25 °C je odolnost překonána a rostliny jsou infikovány, zatímco u rostliny s typem A zůstává odolnost na stejné úrovni. Modernější odolné odrůdy nesou převážně rezistenci typu A. Jako odolné odrůdy se uvádí např.: Jones, Gilman a Anderson. Odolnost typu A (kvalitativní) je řízena jedním genem (monogenní), zatímco typ B (kvantitativní) je polygenní (Koike et al. 2007).

Rezistenci typu B mají spíše starší odrůdy např.: Bugner a Red Hollander, většina moderních rezistentních odrůd disponuje rezistencí typu A (University of Illinois 1988).

Celkově je ale vývoj nových rezistentních odrůd velmi nákladné a obtížné, (Larkin & Fravel 1998; Fravel et al. 2003; Ghazalibiglar et al. 2016), rezistence bohužel není trvalá a časem může být patogenem či jen rasou patogena překonána

Růžičková kapusta a květák vykazují určitý stupeň přirozené odolnosti vůči fusariovému vadnutí, vyjma extrémně horkých a suchým období během roku, opačně je tomu u kedluben

a kapust, které bývají naopak velmi citlivé k *Foc*. U ředkviček jsou nejúčinnější ochranou rezistentní odrůdy, nicméně ředkvičky díky období kdy jsou pěstovány, teda především jaro a podzim, nebývají napadány z důvodu nižší teploty půdy (University of Illinois 1988).

3.3.4 Ošetření ozónem (O₃)

Ozón (O₃) je přirozený plyn, který se běžně vyskytuje ve stratosféře ve výškách 25 – 35 km, kde tvoří tzv. ozonovou vrstvu, ta má za úkol chránit Zemi před ultrafialovým zářením. Ozon je někdy nazývá aktivním kyslíkem, je to z toho důvodu, že je podobný kyslíku (O₂), oproti němu má ozón tři atomy kyslíku, tedy o jeden více než kyslík. Přirozeně ho lze najít především v horských oblastech, u moře nebo při bouřkách, kdy je možné ho i cítit. Samotný ozón má velmi silné oxidační schopnosti a tedy dezinfekční účinek. Z toho důvodu je ozón využívám k dezinfekci v mnoha oborech, potravinářství, textilním průmyslu, vodárenství apod. Ozón je mezinárodně uznáván jako bezpečný prostředek při zpracování potravin, včetně zeleniny, je také povolen při ošetření povrchu ekologicky pěstovaných potravin. Ozón má mimořádně velkou mikrobicidní účinnost. Když je správně aplikován, je schopen hubit většinu známých bakterií, virů a hub, včetně *F. oxysporum*. Navíc se ozon rozkládá na kyslík (O₂) a nezanechává žádné vedlejší produkty svého působení. Je to velmi účinný, ekologicky přijatelný dezinfekční prostředek pro vzduch i vodu. Účinnost ozónu je několikanásobně větší než UV záření, samotný ozón je velmi nestabilní a není možné ho skladovat a je nutné ho vždy vyrábět na místě (Ozontech).

Účinnost ozónu proti *F. oxysporum* dokazují výsledky studie Manning et al. (1971), kteří působení ozónu vystavily citlivou a rezistentní odrůdu zelí po dobu 10 týdnů a po tomto období se neobjevily zjevné nepříznivé účinky ozonu na celkový růst rostlin. Rezistentní odrůda byla bez příznaku napadení, citlivá odrůda vykazovala určité symptomy, které ale během experimentu postupně mizely. Oproti tomu Ebihara et al. (2011) uvádějí ovlivnění rostlin čínského zelí ozónem a to snížením růstu o 24 %, po vystavení ozónu. Autoři ale dále dodávají, že zároveň byl silně inhibován patogen *F. oxysporum* při dávce 20 g O₃ /m³.

Pro ošetřování ozónem je nutné zvolit správnou dávku (koncentraci). Při vystavení sazenic vigny čínské (*Vigna unguiculata*) v rozmezí 10 - 50 O₃ ppm, byla nejúčinnější jako ochrana proti *Fusarium oxysporum* varianta 30 O₃ ppm (30 mg O₃ /l), autoři studie dále uvádějí zvýšení biomasy po tomto ošetření (Nagendra-Prasad et al. 2009).

Výsledky použití ozónu ukázaly, že mycelium *F. oxysporum* bylo významně inhibováno po použití ozonu při koncentraci 62 - 72 mg O₃ / m³ vzduchu. Úspěšnost inhibice se zvyšuje

s prodloužením doby léčby a dosáhlo až 90 % při době trvání 120 minut. Použití dávky 40 mg/m³ stačilo k potlačení klíčení spor *F. oxysporum* (Zhou et al. 2009).

Větší účinnost ozónu při delšímu vystavení potvrzuje i studie Al-Ahmadi et al. (2009), kdy za nízké koncentrace 4 ppm dochází ke zpomalování růstu mycelia hub včetně *F. oxysporum* po dobu 120 minut, při koncentraci 8 ppm po dobu 120 minut, už tato dávka byla pro *F. oxysporum* letální.

Ozón je možno využívat k desinfekci hydroponických kultur i přes svou horší rozpustnost ve vodě. V tomto případě závisí na velikosti vzniklých bublin ve vodě. V případě větších bublin, “milibublin“ (milibubble), které jsou velké od milimetrů po centimetry, dochází k menší míře desinfekce nežli u bublin menší velikosti – “mikrobublin“ (microbubble), které mají velikost menší než 50 μm. Vyšší účinnost spočívá v menší rozpínavosti jednotlivých mikrobublin, ty svým působením rozrušují buněčné stěny spór. Tímto způsobem je možné desinfikovat hydroponické kultury, kde došlo k výskytu *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (Tamaki et al. 2018).

3.4 Interakce vybraných mikroorganismů a *Fusarium oxysporum*

Jedna z možných metod ochrany proti fusariovému vadnutí je biologická ochrana, která představuje introdukci a cílené podporování antagonistických půdních hub a bakterií. Jedná se o regulaci patogena bez pozdějšího lidského zásahu. Za potenciální mikroorganismy biologické ochrany na zeleninách se uvádí bakterie z rodu *Bacillus* a *Pseudomonas*, z mykoparazitických hub bývají uváděny *Trichoderma* sp. a *Pythium oligandrum* (El-Katatny et al. 2006; Ajilogba et al. 2013).

Antagonistické organismy mohou konkurenčně vyřadit patogeny prostřednictvím rychlé kolonizace půdy a následně monopolizováním dostupných živin. Například houba *Trichoderma harzianum* vyřadí druh *Fusarium oxysporum*, patogena vyvolávající vadnutí, aby měla přístup ke kořenovým exsudátům a celulóze. Některé mikroby monopolizují zásoby železa v půdě a tak patogeny vyhladovějí. Tyto užitečné mikroby tvoří siderofory (produkty metabolismu, které poutají Fe³⁺), které vážou železo do organických sloučenin a pak jej odebírají do svých buněk (Vondrášková 2011).

3.4.1 *Trichoderma* sp.

Druhy rodu *Trichoderma* jsou půdní houby, známé od roku 1865. Druhy lze od sebe těžce rozlišit kvůli velmi podobné morfologii. Houby jsou známé díky svým antagonistickým

schopnostem (Verma et al. 2007). Druhy mají schopností chránit rostliny před biotickým stresem, podporou jejich růstu vlivem na jejich fytohormony. Svou přítomností chrání rostliny před patogeny vyvoláním indukované rezistence. Důležitou vlastností je i agresivní růst hub (Ghazalibiglar et al. 2016).

Úspěch druhů je spojen částečně s přímým antagonismem pomocí mykoparazitismu a částečně produkcí litických enzymů, kterými rozpouští buněčné stěny patogena (Marzano et al. 2013).

Velmi účinné kmeny druhu *Trichoderma harzianum* proti *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* jsou T-22, T-24, T-35, ANR-1. *T. harzianum* inhibuje patogena pomocí tvorby chitinázy a b-1, 3-glukanázy. Kmen T-35 v *in vitro* inhiboval patogena ze 48 %, v nádobových pokusech kmen snížil výskyt vadnutí o 30 %. Po přidání kravského hnoje byl výskyt vadnutí ještě snížen o 5 - 25 %. Podobnou míru inhibice vykazuje kmen ANR-1, který inhiboval růst patogena o 53 %. V podmínkách skleníku byl výskyt napadení snížen z 58 % (infikovaná kontrola) na 15% při ošetření kmenem ANR-1. Kmen T-24 inhiboval patogena v *in vitro* ze 100%. Často používaný a rozšířený je kmen T-22, tento kmen je i součástí biologického přípravku a snižuje výskyt vadnutí o 62 – 68 % (Larkin & Fravel;1998; El-Katatny et al. 2006; Yigit & Dikilitas 2007; Srivastava et al. 2010; Sundaramoorthy & Balabaskar 2013). Účinnost druhu *T. harzianum* je prokazatelná i bez ověření kmene, Alwathnani & Perveen (2011) použili proti patogenu kmen bez označení, který snížil vadnutí v nádobových pokusech o 44 %.

Aplikací *T. harzianum* do půdy dochází ke zvýšení výšky rostlin rajčat o 73 cm a zvýšení hmotnosti sušiny plodu rajčete o 288 g ve srovnání s neošetřenou kontrolou (61 cm a 187 g) (Sundaramoorthy & Balabaskar 2013).

Účinné proti *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. jsou také uměle získané (zmutované) kmeny *T. harzianum* (Th50M6 a Th50M11), které jsou navíc odolné zasolení, oba vzniklé kmeny jsou ještě účinnější než původní kmeny. Při použití divokého kmene v polních podmínkách došlo ke snížení vadnutí na 17–19 %, při použití nových kmenů byl výskyt vadnutí 1 - 2% (Hassan & Wafaa 2006). Se zvýšením inhibice zmutovaných kmenů *T. harzianum* se shodují i Marzano et al. (2013). Ti uvádějí účinnost kmene *T. harzianum* (Th908) inhibovat *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* v podmínkách v *in vitro* z 56 – 66 % v závislosti na pěstebním mediu. Z 300 předpokládaných zmutovaných kmenů (pomocí UV-C ozařování) selektovali 2 kmeny, Th908-5, které inhibovaly v podmínkách v *in vitro* z 69 %. Při nádobových pokusech aplikovali původní i získaný kmen. Při aplikaci původního kmene přežilo 45% rostlin, v případě nového kmene Th908-5 přežilo 95%, při neošetřené kontrole uhynulo 75 % rostlin.

Na snížení fusariového vadnutí má vliv i množství organického materiálu v půdě/substrátu. Při aplikaci samotné houby (*T. harzianum* SQR-T037) proti *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* došlo k nejmenšímu snížení vadnutí 25 - 28 % při koncentraci suspenze konidii 10^6 TCS (treatment conidia suspensions), při aplikaci konidií 10^6 TBF (treatment conidia suspension blended with organic fertilizer) byl výskyt fusariového vadnutí 4,4 - 13 %, při použití varianty TFF (treatment conidia suspension fermented organic fertilizer) byl výskyt 7 - 9 % při koncentraci konidii 10^5 , při koncentraci konidií 10^6 byl výskyt vadnutí 0% (Yang et al. 2011).

Na intenzitu fusariového vadnutí mělo průkazný vliv i množství vody v substrátu. Jako antagonistu byl použit kmen T-22 proti *F. oxysporum* f.sp. *lactucae*, který způsobuje vadnutí na salátu. Aplikací kmene T-22 došlo ke snížení infekce o 57 % při suché variantě (-0,5 MPa) a ke snížení o 78 % při mokré variantě (-0,03 MPa) pěstování. Dále došlo přítomností kmene ke zvýšení nárůstu biomasy (Innocenti et al. 2015).

Druh *T. harzianum* není jediný, který se uvádí jako biologická ochrana proti *F. oxysporum*. Podle Morsy (2009) *T. viride* (kmen neuveden) v *in vitro* inhiboval růst *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* o 58 %. V nádobových pokusech ve skleníku při aplikaci *T. viride* do substrátu přežilo 73 % rostlin, oproti neošetřené kontrole, kde přežilo 35 % rostlin.

T. viride (KGI-3) zkoušeli i Sundaramoorthy & Balabaskar (2013) při *in vitro* pokusech proti *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* uvádí 38 % inhibici. Při skleníkových pokusech byl výskyt vadnutí 17,5 % oproti neošetřené kontrole, kde byl výskyt 57 %. Při použití kmene KGI-3 došlo ke zvýšení průměrné váhy plodu rajčat o 101 g. S účinnou inhibicí pomocí druhu *T. viride* se shodují i výsledky Riní & Sulochana (2007), kteří v podmínkách v *in vitro* otestovali účinnost několika kmenů proti *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Jako velmi účinné, kdy antagonistu zcela přerostl mycelium patogena uvádějí kmeny TR18, TR19 a TR22.

S účinností v *in vitro* se shodují i Sahi & Khalid (2007), kteří uvádí 62 % potlačení *F. oxysporum* f.sp. *capsici* pomocí *T. viride* (kmen neuveden).

Naopak Larkin & Fravel (1998) uvádí druh *T. viride* za neúčinný, při použití kmene T-101 bylo dosaženo minimální inhibice v nádobových pokusech proti *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Dalším druhem rodu *Trichoderma* je druh *T. hamatum*. Ten byl testován proti *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* v nádobových pokusech. Kmen TRI-4 snížil výskyt vadnutí o 64 % (Larkin & Fravel 1998). Menší účinnost měl v *in vitro* podmínkách kmen *T. hamatum* (RTM-5), který inhiboval *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* z 31 % (Sundaramoorthy & Balabaskar 2013).

Mnohem účinnější je kmen LU740. Při použití proti *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* v nádobových pokusech dosáhl snížení vadnutí z 80 % (kontrola) na 50 %. Samotná aplikace kmenu (bez patogena) výrazně zvýšila množství biomasy rajčat. Je předpoklad, že může ovlivňovat fytoestimulátory nebo fytohormony (Ghazalibiglar et al. 2016).

Testovaným druhem rodu *Trichoderma* je i *T. asperelum*. Aplikací *T. asperelum* (kmeny T-I, T-II) do sterilizovaného substrátu (kompost a rašelina), který byl poté infikován *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, došlo ke snížení infikovaných rostlin z 90 % (kontrola) na 13 % (TI) a 5 % (TII). Stejný experiment byl proveden s přirozenou půdou (lokalita Chateaurnaud), ta byla sterilizována a poté infikována patogenem, výskyt vadnutí byl 55 %, po aplikaci antagonisty byl výskyt vadnutí 22 % (TI) a 23 % (TII) (Cotxarrera et al. 2002).

Třicet izolátů *T. asperelum* bylo zkoušeno v duálních testech proti 4 kmenům *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, přičemž 6 ze získaných izolátů mělo silnou inhibiční aktivitu. Největší inhibici (68-71%) vykazovaly následující kmeny: TS39, TS12, TS42, TS9, TS32 a TS36. Naopak některé kmeny měly inhibice pouze 32 - 36 %. Kmeny se také lišily v objemu tvorby chitinázy a β -1,3-glukanázy, množství odpovídalo míře inhibice jednotlivých kmenů (El-Komy et al. 2015).

Druhem z rodu *Trichoderma* zkoušeným pro biologickou ochranu je i *T. atroviride*. Ghazalibiglar et al. (2016) zkoušeli proti *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* celkem 10 izolátů *Trichoderma* spp. Největšího snížení infekce se dosáhlo u 2 kmenů *T. atroviride* LU140 a LU584, kdy došlo ke snížení o 69 %. Zároveň došlo k průkaznému zvýšení růstu a výšky rostlin oproti neošetřené kontrole a ostatním izolátům.

Menší inhibici způsobil kmen *T. atroviride* (T8). Při použití proti *F. oxysporum* způsobující vadnutí cibule, byl patogen inhibován z 30 - 40 % (Sánchez et al. 2015).

Uváděn je také druh *T. koningii* (kmen neuveden), který v *in vitro* podmínkách inhiboval *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* z 28 % (Otadoh et al. 2011). S podobnou účinností se shoduje i Sahi & Khalid (2007), *T. koningii* (kmen neuveden) inhiboval růst *F. oxysporum* f. sp. *capsici* z 18 %.

3.4.2 *Pythium oligandrum*

Většina druhů rodu *Pythium* jsou rostlinnými patogeny, druh *P. oligandrum* se odlišuje svou schopností chránit rostliny před biotickým stresem a podporou jejich růstu. Úspěch druhu je spojen částečně s přímým antagonismem pomocí mykoparazitismu a částečně produkcí antimikrobiálních sloučenin. Pozoruhodná je schopnost "rozpoznat" své buněčné stěny od

ostatních houbových stěn. *P. oligandrum* svou přítomností chrání rostliny před patogeny vyvoláním indukované rezistence. Podílí se na omezení průniku a vývoje patogenů v hostitelských pletivech nepřímo, zesílením buněčných stěn rostlin nebo přímo antimikrobiální aktivitou (Benhamou et al. 2012).

Při testování v *in vitro* podmínkách mezi *P. oligandrum* (El-U1122) proti *F. oxysporum*, vznikla mezi mikroorganismy vznikla inhibiční zóna a po 12 dnech byl patogen zcela přerostlý antagonistou. K inhibici dochází pomocí těkavých sloučenin chitinázy a b-1,3-glukanázy (El-Katatny et al. 2006).

P. oligandrum (1010) je velmi účinné v boji s *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, neboť při kontaktu hyf dochází v buňkách patogena k řadě poruch, včetně všeobecné dezorganizace cytoplazmy a nakonec ztrátě protoplazmy. Dále dochází v přítomnosti antagonisty ke změnám pletiv kořenů rajčat, které podle autorů pomáhají rostlině vzdorovat patogenu (Benhamou 1996).

Houba proniká svými hyfami do rostlinných pletiv a tím vyvolává systémovou reakci rostliny, která je schopná ubránit se velkému množství půdních patogenů, včetně *F. oxysporum*. *P. oligandrum*, ale není schopno přežít v rostlinných pletivech bez příjmu živin z vnějšího prostředí. Zajímavé je i zjištění, že antagonistu zřejmě nenarušuje biodiverzitu mikroflóry v rhizosféře (Benhamou et al. 2001; Brožová 2002; Gerbore et al. 2013). Brožová (2002), dále uvádí užití přípravku Polyversum na bázi *P. oligandrum* proti *F. oxysporum* f.sp. *lisi*. Aplikací přípravku došlo k většímu snížení vadnutí než při použití rezistentních odrůd hrachu.

Vyvolání systémové rezistence je odůvodňováno bílkovinou zvanou oligandrin, kterou produkuje *P. oligandrum*. Po aplikaci této látky na rajčata došlo k významnému snížení výskytu vadnutí způsobeného *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* oproti rostlinám ošetřených vodou. Došlo k omezení vrůstání hyf patogena a celkově snížení jeho životaschopnosti (Benhamou et al. 2001).

3.4.3 Nepatogenní kmeny *Fusarium oxysporum*

Jako další mikroorganismy potlačující patogenní kmeny *Fusarium oxysporum*, jsou velmi často uváděny nepatogenní kmeny tohoto druhu. Nepatogenní kmeny soutěží s patogenem o stejné živiny v půdě, což ovlivňuje klíčení chlamydospor. Mohou také konkurovat v obsazení míst, kde došlo k poškození kořenů a tím vyvolat u rostliny reakci na tento podnět, která vede k odolnosti rostliny vůči patogenní formě *F. oxysporum* (Fravel et al. 2003).

Nepatogenní kmeny Fo47, CS-1 a CS-20, způsobují určitý stupeň inhibice fusariového vadnutí na rajčatech. Nejúčinnější kmen je CS-20, který snižuje výskyt vadnutí až o 92 %, naopak nejméně účinný je kmen Fo47, jeho účinnost je max. 25 %. Rozdíl je dán jejich způsobem inhibice, zatímco kmeny CS-1 a CS-20 indukují rezistenci rostliny, kmen Fo47 primárně soutěží o živiny s patogenními kmeny a menší míře v indukci rezistence rostliny (Duijff et al. 1998; Larkin & Fravel. 1999; Elmer 2004; Aimé et al. 2013; Aïcha et al. 2014). Nepatogenní kmen Fo47 je v kolonizaci kořenového systému mnohem rychlejší než patogenní kmeny *Fusarium oxysporum* (Bolwerk et al. 2005).

Další účinným kmenem je Fo-B2, který snížil fusariové vadnutí na rajčatech až o 87 %, v závislosti na variantě experimentu. Nejúčinnější byl v pěstební komoře, to je dáno stabilním prostředím experimentu. V podmínkách skleníku byl účinný až ze 71 %. V polních podmínkách, kde je ovšem větší tlak okolního prostředí, se výskyt choroby snížil o 16 – 30 %, (Shishido et al. 2005).

Na snížení fusariového vadnutí za pomoci nepatogenním kmenů, konkrétně proti *F. oxysporum lycopersici* byly nejúčinnější kmeny 233/1, 141/3 a 245/1 (Silva & Bettiol 2005).

Kmen CS-20 byl již zmíněn při použití na snížení fusariového vadnutí na rajčatech. Jako účinný se ukázal i proti *F. oxysporum* f. sp. *asparagi*. Z dalších kmenů použitých proti patogenu byly CS-20, CWB 312, CWB 314, CWB 318 a Fo47. V polních i skleníkových podmínkách byly nejúčinnější kmeny CWB 318 a CS-20. Kmen CS-20 dokonce zvýšil váhu výhonků chřestu oproti ostatním kmenům nebo neošetřené kontrole Elmer (2004) s větší účinností kmene CWB 318 oproti kmenům CWB 312 a CWB 314 se shoduje i (He et al. 2002).

3.4.4 *Pseudomonas* sp.

Pseudomonas využívané jako biologická ochrana (zejména *P. fluorescens* and *putida*) jsou nepatogenní rhizobakterie, kolonizací rhizosféry potlačují půdní patogeny (Ramamoorthy et al. 2002).

Účinnost druhů rodu *Pseudomonas* je dána vyvoláním indukované rezistence rostlin přítomností samotné bakterie. Buňky jsou přitahovány kořenovými exudáty a také kyselinou fusarovou (způsob není zcela znám) (Kamilová 2008). Při indukované rezistenci dochází k indukci obraných enzymů fenylypropanoidovou cestou a akumulací fenolických a PR-proteinů. Bakterie svojí přítomností posilují strukturu buněčné stěny a podporují akumulaci fenolických látek a chitináz (Ramamoorthy et al. 2002)

Za účinný je považován kmen Pf1, který dokázal snížit výskyt fusariového vadnutí na rajčatech (Ramamoorthy et al. 2002; Manikandan et al. 2010). Konkrétně Ramamoorthy et al. (2002), zkoušeli několik kmenů proti *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Kmen Pf1 v polních podmínkách nejvíce snížil výskyt fusariového vadnutí, a to na 18 %, oproti 76 % výskytu na neošetřené kontrole. Při použití chemického ošetření pomocí fungicidu carbendazim, byl výskyt vadnutí 17 %. Z výsledků je patrný minimální rozdíl mezi chemickou a biologickou ochranou.

Za účinnou aplikaci kmene Pf1 je považováno máčení semen nežli máčení kořenů semenáčků. Za vhodný přípravek se považuje kapalná suspenze (2 % glycerol, 1 ml (3×10^{10} CFU (colony-forming unit) ml⁻¹). Po aplikaci suspenze došlo ve skleníkové kultuře ke snížení fusariového vadnutí na 17 %, a v polních podmínkách na 4,8 %. Aplikací kapalného přípravku bylo dosaženo i zvýšení výnosu polních rajčat o 53%, oproti neošetřené kontrole (Manikandan et al. 2010).

S účinností zbylých kmenů Pf se autoři rozcházejí, Larkin & Fravel (1998), publikovali snížení výskytu fusariového vadnutí na rajčatech v průměru o 46 % (30 – 63 %) v závislosti na kmenu bakterie. Jako nejúčinnější uvádí kmeny Pf-5 a SB65.

Naopak z kmenů Pf 1 to Pf 15 byl při v *in vitro* pokusech nejúčinnější proti *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* kmen Pf 12. Účinné kmeny jsou ještě Pf 3, Pf 9, Pf 13 a Pf 14 (Laksmidevi et al. 2015).

Velmi účinným kmene je kmen WCS365, který dokáže v *in vitro* podmínkách kolonizovat hyfy *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* a tím inhibovat patogena (de Weert et al. 2004; Kamilova et al. 2008). Kamilova et al. (2008) dále uvádí snížení počtu vyklíčených spor patogena za přítomnosti bakterie.

Kmen WCS365 je používám i jako standardní kmen k porovnání s jinými kmeny *P. fluorescens*. Na experiment v pěstebním systému Gnotobiotic s rajčaty se použilo celkem 20 kmenů *P. fluorescens*. Sedm kmenů nemělo žádný vliv nebo dokonce zvýšilo závažnost onemocnění ze 63% (kontrola) na 64 – 75 %. Dalších sedm kmenů mírně snížilo tlak onemocnění, avšak nikoliv významně na 58 - 60 %. Šest kmenů, se ukázalo jako velmi účinné při potlačení fusariového vadnutí na rajčatech. Kmeny PCL1757, PCL1758, PCL1760 byly dokonce účinnější než standardní kmen (Validov et al. 2006).

Proti *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* je uváděno i několik dalších inhibujících kmenů, přibližně se stejnou účinností, jedná se o kmeny: P16 , P20, P28, 58/1. Např. v případě kmene P16 došlo v polních podmínkách ke snížení fusariového vadnutí o 30 – 31 %, u kmene 58/1 byl výskyt vadnutí v nádobách 29 % (Akköprü & Demir 2005; Riny & Sulochana 2007; Srivastava

et al. 2010). Akköprü & Demir (2005) dále uvádí zvýšení obsahu P v kořenech naočkovaných rostlin ve variantě s aplikací *P. fluorescens*.

P. fluorescens je účinná i na jiné *forma specialis* patogena, konkrétně proti *F. oxysporum* f. sp. *melonis*. Z celkem 126 izolátů vykazovalo v nádobových pokusech 64 izolátů určitou míru inhibice, 28 izolátů vykazovalo více než 50 % inhibici, 6 izolátů vykazovalo inhibici v rozmezí 70 - 84 % (Özaktan & Bora 2000).

P. fluorescens, kmen LRB3W1 je uváděn jako účinný způsob k potlačení výskytu fusariového vadnutí na zelí. K porovnání účinnosti byl použit fungicid benomyl. Při aplikaci pouze bakterie byl snížen výskyt vadnutí o 50 %, při koncentraci buněk 10^9 , při koncentraci 10^5 pouze o 15%, při kombinaci s benomylem byla účinnost 80 – 90 % (Someya et al. 2006).

Jako účinný je uváděn i druh *Pseudomonas putida*, konkrétně kmeny WCS358 a RE8, jejichž kombinací v nádobových pokusech byl snížen výskyt fusariového vadnutí na ředkvičkách způsobeného *F. oxysporum* f. sp. *raphani* o 50%, při jednotlivém použití pouze o 30% (de Boer et al. 2003).

S účinností *P. putida* se shodují i výsledky Özaktan & Bora (2000), kteří použili kmeny P30, P109 a P180, které snížili výskyt fusariového vadnutí na melounech v nádobových pokusech o 80, 82 a 84 %.

V kombinaci *Pseudomonas fluorescens* s *T. harzianum* došlo výraznému snížení výskytu fusariového vadnutí na rajčatech, navíc se zvýšila i klíčivost semen o 22 - 48 % (Srivastava et al. 2010).

3.4.5 *Bacillus* sp.

Bakterie rodu *Bacillus* jsou dobře známy pro svoji schopnost biologické ochrany pomocí různých mechanismů, zejména pak *B. subtilis*, *B. cereus*, a *B. amyloliquefaciens*, (Yu et al. 2011). Druhy *Bacillus* chrání rostliny kolonizací jejich kořeny. Druhy produkují lipopeptidy, jakou jsou ituriny, surfactiny, fengyciny a korynebactin. Lipopeptidy jsou schopné potlačit *Fusarium oxysporum* (Cao 2012; Zhao 2013).

Druh *B. amyloliquefaciens* je účinný proti spektru půdních patogenů, včetně *F. oxysporum*. Druh inhiboval houbové patogeny pomocí produkce lipopeptidů, které mají antifungální účinky (Vitullo et al. 2011; Li et al. 2014).

B. amyloliquefaciens je velmi účinný proti *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, jako nejúčinnější kmeny proti fusarivému vadnutí byly zjištěny kmeny, LIOBac179, B07. Kmen LIOBac179 potlačil patogena v *in vitro* podmínkách o 92,5 %, v podmínkách skleníku došlo ke snížení

výskytu vadnutí o 75 %. Kmen B07 má silnou inhibiční aktivitu v *in vitro*. Kmen následně úspěšně kolonizoval kořeny rajčat a produkcí lipopeptidů snížil výskyt vadnutí o 40 % (Vitullo et al. 2011; Ajilogba et al. 2013). S účinností se naopak neshoduje Myresiotis et al. (2011) podle této studie *B. amyloliquifaciens* (IN937) je neúčinný, ale v kombinaci s *B. subtilis* (GB03) došlo ke snížení vadnutí vyvolaného *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* o 60 %.

B. amyloliquifaciens inhibuje i jiné f. sp. patogena. Konkrétně kmen Q-426 inhiboval v *in vitro* zcela růst spor *F. oxysporum* f. sp. *spinacia*. Inhibice byla úspěšná tvorbou lipopeptidů (Zhao et al. 2012).

B. amyloliquifaciens (NJN-6) produkoval při inhibici *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* antifungální látky, které byly velmi účinné; benzothiazol fenol, 2,3,6-trimethylfenol, 2-nonanon, 2-dekanon (Yuan et al. 2012).

Proti *F. oxysporum* je účinný také druh *B. subtilis*. Patogena *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* nejvíce potlačily kmeny ATCC 11774, EU07, QST 713 a GB 03. Kmen ATCC 11774 v *in vitro* inhiboval patogena z 82 %, v podmínkách skleníku snížil výskyt vadnutí ze 100 % na 37,5 %. Kmen EU07 snížil výskyt vadnutí ve skleníku o 75 %, kmen QST 713 o 53 %. Kmen GB 03 snížil vadnutí na rajčatech o 60 % (Baysal et al. 2008; Myresiotis et al. 2011; Ajilogba et al. (2013). Myresiotis et al. (2011) dále uvádějí kmen FB24, který snížil výskyt vadnutí pouze o 30 %, kmen byl následně aplikován v kombinaci s kmenem GB 03 a došlo ke snížení jen o 40 %, oproti samotnému kmenu GB 03 je účinek opět nižší.

B. subtilis je účinný i v potlačení patogena *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. Druh také inhibuje patogena pomocí antifungálních látek – lipopeptidů (Cao et al. 2012).

Nejúčinnější kmeny proti *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* jsou SQR 9, B579 a B068150. Všechny tři kmeny inhibovali ve velké míře patogena. Kmen SQR 9 snížil výskyt fusariového vadnutí ve skleníku o 49 - 61 % tento kmen snižuje klíčivost spor až o 83%. Kmen B579 snížil fusariové vadnutí o 73 %. Kmen B068150 v nádobovém pokusu v modifikovaném gnotobiotickém systému snížil vadnutí o 50 % a je téměř srovnatelný s chemickou variantou ošetřenou pomocí fungicidu carbendazim, kde byl účinek 60 %. Všechny 3 kmeny zlepšili fyziologický stav rostlin. Kmen SQR 9 dvojnásobně zvýšil obsah sušiny oproti neošetřené kontrole, dále se zvýšila délka výhonu z průměrných 67 cm na 91 cm. Aplikace kmene B579 zvýšila obsah IAA u ošetřených rostlin (Chen et al. 2010; Cao et al. 2011; Cao et al. 2012; Li et al. 2012).

B. subtilis je účinný i proti *F. oxysporum* f. sp. *melonis*. Konkrétně kmen Y-IVI, účinnost ještě zvýšila aplikace organického hnojení (Zhao et al. 2013).

B. subtilis je účinný také proti *F. oxysporum* f. sp. *capsici*. Konkrétně kmen CAS15 v *in vitro* podmínkách silně inhiboval patogena. V nádobových pokusech ve skleníku bylo při současné aplikaci patogena i antagonisty sníženo výskyt vadnutí na rostlinách paprik o 44 %, při samostatné aplikaci došlo ke snížení o 57 %. Kmen velmi podporoval i samotnou rostlinu, rostliny ošetřené CAS15 byly vyšší, zvýšil se výnos plodů, tím že došlo ke zkrácení doby kvetení o 50 %, o 37 % se zvýšila průměrná hmotnost plodů a celkový výnos z rostlin se zvýšil o 49% (Yu et al. 2011).

Jako další možné druhy vhodné k ochraně proti *Fusarium oxysporum* uvádí Ajilogba et al. (2013) *B. cereus* (ATCC 11778) a *B. pumilus* (LIOBac269), ty v podmínkách v *in vitro* inhibovaly *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* z 55 % a 70 %. Ve skleníkových podmínkách snížila aplikace *B. cereus* výskyt vadnutí na rajčatech na 25 % (obdobně jako *B. amyloliquefascines*), *B. pumilus* snížil výskyt na 37 % (obdobně jako *B. subtilis*).

Rozdílnou inhibicí druhu *B. pumilus* uvádí ve své publikaci Myresiotis et al. (2011), kteří testovali proti *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* kmen SE34, výskyt vadnutí na rajčatech byl snížen z 97 % (kontrola) na 87 % v ošetřené variantě. Kmen nebyl významně účinný ani v kombinaci s jinými druhy rodu *Bacillus*.

3.5 Metody detekce patogenních mikroorganismů

Rostliny, včetně kulturních plodin trpí množstvím chorob, které bývají způsobeny přítomností virů, fytoplazem, bakterií či hub. Vyjmenované mikroorganismy mohou za určitých podmínek způsobit významné hospodářské ztráty. Patogenní mikroorganismy bývají často přítomny v pletivech v tzv. latentní formě. Pro přesnou diagnózu se využívají laboratorní metody detekce. Mezi využívané metody patří: ELISA, PCR, RT-PCR a LAMP (VŠÚO 2015 - 2016).

3.5.1 ELISA

. Název ELISA pochází z anglického Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay. Prvně byla tato metoda představena již v 60. letech 20. století. Od PCR se odlišuje, že detekuje fenotypové vlastnosti patogenních mikroorganismů (Schmidt & Rodrick 2003). Jedná se o imunoenzymatickou metodu, která je založená na interakci antigenu testovaného patogena a protilátky. Vznikne tak imunokomplex antigen-protilátka. Celý proces probíhá způsobem, že se na specifickou protilátku naváže antigen patogenu. Na něj se následně naváže enzymově označená protilátka, která se přidává v dalším kroku analýzy. Při dalším kroku se do reakční

směsi přidává substrát, který se za pomoci enzymu přemění na barevný produkt. Zabarvení konečného produktu se stanoví spektrofotometricky a je přímo úměrná koncentraci antigenu ve vzorku. (Schmidt & Rodrick 2003). Metoda je využívána především pro diagnózu viróz (VŠÚO 2015 - 2016).

3.5.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce vynesla jejímu objeviteli K. B. Mullisovi v roce 1993 Nobelovu cenu. Zkratka PCR pochází z anglického originálu polymerase chain reaction.

Principem diagnostické metody PCR je zmnožení specifických úseků DNA daného mikroorganismu na detekovatelné množství. Technické vybavení pro PCR je následující: centrifuga, vortex, termocyklér, pipety, mikrozkušavky, sterilní špičky, přístroj na elektroforetickou separaci (elektroforéza) a UV transluminátor s fotoaparátem. Nezbytné jsou také určité chemikálie a to: vyizolovaná DNA, Master Mix, primery a destilovaná voda. Před využitím samotného PCR je nutná izolace DNA. Předpokladem je dostatečné množství celkové DNA z rostlin, metod pro extrakci DNA je několik a výběr metody záleží na vzorku (VŠÚO 2015 - 2016). Během PCR se k denaturované DNA, která se rozestoupila do dvou řetězců, přidá jeden pár specifických primerů. Primery jsou svými sekvencemi konstruovány speciálně k sekvencím diagnostikovaného mikroorganismu. Vybrané primery se vyznačují komplementaritou k řetězcům DNA mikroorganismu a vážou se jen na ně. Po navázání působí termostabilní enzym tzv. Taq DNA polymeráza, ta způsobí, že se do syntetizuje druhý řetězec do formy dvou řetězce (Atawodi et al. 2010).

Samotnou polymérázovou řetězovou reakci je možné rozčlenit do tří kroků. Při prvním kroku se dvojitý řetězec DNA při přibližně 90 °C denaturuje na dva samostatné řetězce. Ve druhém kroku dochází k napojení dvou oligonukleotidových primerů, komplementárních k některému úseku DNA při 50 °C, probíhá tzv. annealig, primery se vyberou, tak aby se vážaly vždy jen na jednom řetězci na k nim specifické sekvence podle směru účinnosti polymerázy DNA, tedy od 5' k 3'. Řetězec by měl být mezi nimi ohraničen o délce přibližně 20 000 bp, protože aktivita primerů je na obou řetězcích vzájemně protisměrná. Ve třetím kroku při polymerizaci využijí DNA polymerázy napojené primery jako start k syntéze komplementárního řetězce při 70 °C. Tato reakce se nechá proběhnout přibližně 25 – 30 krát, tím dojde k rozmnožení úseku, který byl vyhraničen primery 10⁵ až 10⁶ krát. Původní malé množství několika desítek molekul se rozmnoží natolik, že se dá následně vzniklý úsek DNA o známé délce elektroforeticky prokázat. Celá metoda je velmi citlivá ke kontaminaci

a vyžaduje naprostou čistotu, aby nedocházelo k namnožení nechtěných molekul DNA (Chloupek 2008; Atawodi et al. 2010).

K samotným krokům cyklu dojde v jedné zkumavce změnou teploty v termocykléru. Asi nepoužívanější a nejjednodušší metoda vyhodnocení PCR je elektroforetická separace PCR na gelu (agarózový či polyakrylamidový). Metoda je založena na principu pohybu záporně nabitých molekul DNA v elektrickém poli směrem k anodě. Elektroforéza probíhá v gelu, ten tvoří separační síť polymerních molekul s póry, kterými se molekuly DNA pohybují rozdílnou rychlostí v závislosti na velikosti, a tím dojde k jejich separaci. Vzorky se na gel nanesou s fluorescenčním barvivem, barvivo způsobí, že se na gelu pomocí UV transiluminátoru zviditelní fragmenty DNA pozitivních vzorků (VŠÚO 2015 - 2016).

3.5.3 RT-PCR

Reverzní transkripce spojená s polymerázovou řetězovou reakcí (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) se běžně používá k detekci přítomnosti mRNA, pre-mRNA nebo jiných typů RNA (Rio et al. 2011). Reverzní transkripce byla objevena v roce 1970 (VŠÚO 2015 - 2016). Při reverzní transkripci dochází k přepisu genomové RNA na jedno řetězovou DNA. Tímto krokem se získá molekula, která odráží specifickou genetickou informaci patogena a funguje v rámci PCR jako vstupní templát (Rio et al. 2011). Tímto krokem může být naplno využít potenciál PCR, který spočívá v jeho vysoké citlivosti a specifičnosti (VŠÚO 2015 – 2016).

3.5.4 LAMP

LAMP, tedy Loop mediated isothermal amplification, neboli izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou. Jedná se o techniku, která umožňuje detekci DNA i RNA. Pomocí této techniky je možné v rostlinných pletivech potvrdit přítomnost virů, bakterií či hub (VŠÚO 2015 – 2016).

Velká výhoda této metody spočívá v tom, že je jedno, zda se zjišťuje DNA nebo RNA. Při použití této metody nepředstavují problém znečišťující látky, je tedy možné udělat test s minimální výbavou přímo na poli. Metoda vznikla v roce 2000 v Japonsku. Jedná se o obdobu PCR. Princip LAMP je podobný fungování PCR, kde se musejí vlákna DNA oddělit zahřátím. V případě LAMP se použije odlišný termostabilní enzym, který dokáže během syntézy nového vlákna DNA původní vlákno odstrkovat stranou. Postačí tedy jedna teplota pro všechny fáze reakce (60 – 65 °C). Primery jsou navrženy tak, aby při syntéze DNA vznikla nekonečná

smyčka a enzym DNA polymeráza, tak neustále přidává další kopie úseku DNA, dokud se nenamnoží do takového množství, které je možné detekovat. Největší výhodou metody LAMP oproti klasické PCR je nižší cena a nižší citlivost na čistotu vzorku (Bouma 2019). Celý proces probíhá v jedné zkumavce. Technika má pravděpodobně slibnou budoucnost jako levná detekční metoda (VŠÚO 2015 – 2016).

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

V letech 2015 – 2019 byl v rámci jednotlivých experimentů studujících vliv jednotlivých faktorů na růst patogena *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* využit následující materiál:

4.1.1 Patogen

Během experimentů byl používán houbový patogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* zb1 (rasa 1) a zb 2 (rasa 2), ze sbírky Stichting Nederlandse Algemene Kwaliteitsdienst Tuinbouw (Naktuinbouw).

4.1.2 Mikroorganismy

Pro experiment tzv. duálních testů mezi patogenem a vybranými mikroorganismy, tedy testování ovlivnění růstu či inhibice mycelia patogena Foc, byly na základě literatury a doporučení otestovány v duálních testech tyto potenciálně antagonistické mikroorganismy:

- *Trichoderma harzianum* CCF 2714
- *Trichoderma hamatum* CCF 2390
- *Trichoderma asperellum* ATCC 204424
- nepatogenní kmen *Fusarium oxysporum* CCF 3428
- *Fusarium lateritium* CCF 3689
- *Pythium oligandrum* CBS 530.74
- *Aureobasidium pullulans* CCF 4532
- *Cladosporium herbarum* CCF 3741
- *Pseudomonas fluorescens* CCM 2115
- *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1960
- *Bacillus amyloliquefaciens* DSM 23117
- *Bacillus subtilis*
- *Erwinia herbicola* DSM 8570.

Vysvětlivky:

- DSM: Deutsche sammlung von mikroorganismen und zellkulturen
- CCM: Czech Collection of Microorganisms
- CCF: Culture Collection of Fungi
- CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures

4.1.3 Rostlinný materiál

Na základě předběžných pokusů byly vybrány pro experimenty 3 odrůdy hlávkového zelí (*Brassica oleraceae* convar. *capitata* f. *alba*). Dvě odrůdy citlivé k fusariovému vadnutí, 'Pourovo pozdní' a 'Zeus' a jako rezistentní odrůda 'Target'.

- **'Pourovo pozdní'**

Pozdní kruhárenské zelí, hmotnost hlávky 4 - 6 kg, vegetační doba 130 - 140 dní. Moravoseed.

- **'Target' F1**

Polopozdní zelí, využití ke kruhárenství či skladování, hmotnost hlávky 3,3 kg, vegetační doba 125 - 130 dní. Udávaná rezistence k Foc. Moravoseed.

- **'Zeus' F1**

Polorané zelí pro letní sklizeň, využití pro přímý konzum, vegetační doba 75 - 80 dní. Moravoseed.

4.1.4 Substrát

Během experimentů byl pro veškerou kultivaci rostlin hlávkového zelí používán substrát od firmy Agro CS Česká Skalice, konkrétně substrát AGRO CS profi, rašelinový substrát I s následujícími parametry; N: 50 - 300 mg/l, K₂O: 80 - 300 mg/l a P₂O₅: 80 - 300 mg/l, pH 5,5 – 6,5.

4.1.5 Pěstební médium

- Pevné médium: Potatoe dextroze agar – PDA, Výrobce: VWR
- Tekuté médium: Malt extrakt – ME, Výrobce: ROTH

4.2 Kultivace patogena

Patogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* (rasa 1 a 2), byl kultivován na PDA mediu. Médium o koncentraci 39 g/l bylo autoklávováno při teplotě 121 °C. Médium bylo rozlito na Petriho misky o průměru 9 cm. Na miskách byl kultivován patogen při teplotě 24 °C ve tmě. Kultivace patogena probíhala na miskách dle Ramamoorthy et al. (2002) 10 dní.

4.3 Metodika založení experimentu s hodnocením vlivu teploty na růst patogena v podmínkách v *in vitro*

Patogen byl naočkován na misky s PDA mediem. Médium o koncentraci 39 g/l bylo autoklávováno při teplotě 121 °C a rozlito na Petriho misky o průměru 9 cm. Na miskách byl kultivován patogen za konstantních teplot a to 15, 18, 24, 28 a 37 °C. Všechny varianty byly bez přístupu světla. Přírůstky kolonie patogena byly pravidelně měřeny měřítkem.

4.4 Metodika experimentu s hodnocením vlivu teploty na infekcí rostlin zelí hlávkového z inokulovaného substrátu

Při tomto experimentu byl substrát inokulován inokulem o určité koncentraci spor patogena *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* rasa 1. Do substrátu byly přepíchány předpěstované rostliny tří odrůd hlávkového zelí a dále pěstovány za odlišných teplotních podmínek.

4.4.1 Tvorba inokula a inokulace substrátu

Narostlé mycelium bylo staženo z misek do destilované vody, která byla předem autoklávována při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Petriho misky byly poté ještě vypláchnuty destilovanou sterilní vodou. Získaná suspenze byla mixována homogenzátorem WiseTis HG-15D.

Pomocí Burkeho komůrky byla spočítána aktuální koncentrace spor. Získaná suspenze byla naředěna sterilní vodou na koncentraci spor 1×10^5 , získanou suspenzí byl inokulován substrát.

4.4.2 Pěstební podmínky

Rostliny všech tří odrůd byly předpěstovány v substrátu v chlazeném inkubátoru Binder KBW 400 s regulovanými teplotními a světelnými podmínkami 12 h světla a 12 h tmy. Při světelné fázi byla teplota 22 °C, v temností fázi pak 20 °C. Juvenilní rostliny hlávkového zelí

byly ve fázi 3 - 4 pravých listů přesazeny do infikovaného substrátu po 40 kusech v každé variantě.

Samotný experiment probíhal v sadbovačích s objemem buněk 54 ml. Sadbovače byly naplněny standardním substrátem AGRO profi rašelinový substrát I. Substrát byl před výsadbou rostlin inokulován patogenem. Při výsadbě do sadbovačů byly rostlinám zkráceny kořeny na 5 cm. Sadbovače s rostlinami byly kultivovány při světelném režimu 12h světelná fáze (430 lm) a 12h temnostní fáze v růstové komoře (Q-CELL 1), kde byly rostliny pěstovány při teplotách 16/18 °C, 19/21 °C, 22/24 °C a 26/28 °C.

4.4.3 Hodnocení

Napadení rostlin zelí hlávkového patogenem bylo hodnoceno bodovou stupnicí 0 - 3 podle Luhová et al. (2006), 0 – bez příznaků; 1 – počáteční symptomy, žloutnutí jednoho pravého listu, často jen z jedné strany, stagnace v růstu; 2 – intenzivní napadení, žloutnutí několika listů, čistě zelený pouze veg. vrchol; 3 – uhynulé rostliny. První hodnocení proběhlo 3 týdny od přepíchnání rostlin do infikovaného substrátu, stupeň napadení byl zaznamenáván 5x v rozmezí 2 - 3 dnů.



Obrázek 3: Stupnice hodnocení vizuálních symptomů hlávkového zelí infikovaného *Foc*, 0 – bez příznaků 1 – počáteční symptomy, 2 – intenzivní napadení, 3 – uhynulé rostliny (Foto Věra Kofránková).

4.4.4 Analýza PCR

V náhodně vybraných uhynulých rostlinách nebo v rostlinách s příznaky infekce byla přítomnost DNA patogena potvrzována v kořenech a kořenových krčcích rostlin pomocí PCR. Izolace DNA proběhla podle návodu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

PCR s primery 1#77R/1#77S proběhla dle metodiky Zhang et al. (2014). Amplifikované PCR vzorky byly elektroforézovány na 1,5% agarozovém gelu, který byl zbarven v ethidium bromidu a vizualizován na UV transluminátoru.

4.4.5 Statistické vyhodnocení

Získaná data byla testována na normalitu dat, která byla negativní, k vyhodnocení byl použit Kruskal-Wallisův test v programu StatSoft, Inc (2013) STATISTICA (data analysis software systém), version 12.

4.5 Metodika úpravy pH a hodnocení experimentu

Při experimentu byl patogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* (rasa 1 a 2) kultivován za rozdílných hodnot pH v tuhém a tekutém mediu a hodnocen vliv hodnoty pH na růst patogena. Po skončení experimentu byl zjišťován vliv patogena na pH změřením hodnoty pH.

4.5.1 Tuhé médium

Hodnota pH PDA media byla upravena na hodnoty 4; 5; 6; 7; 8 a 9 pH, za pomoci kyseliny chlorovodíkové (HCl) a hydroxidu sodného (NaOH). PDA médium bylo autoklávováno při teplotě 121 °C, rozlito na Petriho misky o průměru 9 cm.

Z předem napěstovaných kultur Foc na Petriho miskách byl patogen naočkován terčičkem o průměru 0,7 cm na střed Petriho misky s upraveným mediem a kultivován při 24 °C bez přístupu světla. Šíře mycelia bylo pravidelně měřena (cm) po dobu 10 dní. Poté byl experiment ukončen a vyhodnocen. Dále byla zpětně změřena hodnota pH media.

4.5.2 Tekuté médium

Patogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans*, byl kultivován v 50 ml v ME mediu ve 250 ml Erlenmeyerově baňce. pH bylo upraveno na hodnoty 4; 5; 6; 7; 8 a 9, autoklávováno při 121°C 15m a baňky byly umístěny na třepačce WishSahde SHO-1D (120 rpm) za teploty 24

°C po dobu 5 dnů. Podle metodiky Rosa-Garzon et al. (2017), která byla přizpůsobena našim podmínkám.

4.5.3 Statistické vyhodnocení

Průměry mycelia Foc byly hodnoceny pomocí T-testu. Závislost růstu mycelia na hodnotě pH bylo hodnoceno jednoduchou lineární korelací. Všechny data byla testována v programu StatSoft, Inc (2013) STATISTICA (data analysis software system), version 12.

4.6 Miskové experimenty s antagonistickými mikroorganismy

Jednotlivé potenciálně antagonistické mikroorganismy byly testovány proti Foc (rasa 1 a 2) v *in vitro* podmínkách v duálních testech. Bylo vytvořeno několik variant (*Trichoderma harzianum*, *T. hamatum*, *T. asperellum*, nepatogenní kmen *Fusarium oxysporum*, *Fusarium lateritium*, *Pythium oligandrum*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium herbarum*, z bakterií; *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus amyloliquifacines* a *Bacillus subtilis*, *Erwinia herbicola* a kontrola Foc, každá varianta ve 3 opakováních. Testy byly prováděny v Petriho miskách (průměr 9 cm) na PDA. Kultivace probíhala bez přístupu světla, u hub při teplotě 24 °C, u bakterií při 28 °C. Houbové kultury byly očkované na PDA v PM přenesením terčíku (průměr 7 mm) porostlého myceliem z předem napěstované kultury (PDA, 24 °C, tma). Bakterie byly očkované kapkou (10 µl) buněčné suspenze o optické densitě $OD_{600nm} = 1,0$. Kultury byly naočkované ve stejném termínu, ve vzdálenosti 2,5 cm od sebe.

Během 10 denní kultivace kultur byl každé 2 dny měřen průměr (v cm) mycelia. V případě pravidelné kolonie byl průměr měřen jedenkrát, v případě nepravidelné kolonie byl průměr měřen dvakrát (kolmo na sebe, šířka a výška), naměřené hodnoty byly zprůměrovány.

4.7 Ošetření osiva antagonistickými mikroorganismy

4.7.1 Rostlinný materiál

Pro experiment byla vybrána citlivá odrůda hlávkového zelí 'Pourovo pozdní' (*Brassica oleraceae* convar. *capitata* f. *alba*). Pěstební podmínky (viz kapitola 4.4.2), vyjma teplotnímu režimu, který byl jednotně nastaven na 24 °C v temnostní fázi, 26 °C světelná fáze. Osivo bylo vyseto do inokulovaného substrátu inokulovaného *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* rasa 1 (viz kapitola 4.4.1) po 50 kusech ve 4 opakování od každé varianty.

4.7.1 Vytvoření suspenze antagonisty a ošetření osiva

Na základě výsledků z duálních testů v *in vitro* byl vybrán druh *Trichoderma asperellum*. Narostlé mycelium *T. asperellum* bylo staženo z misek do destilované vody, která byla předem autoklávována při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Petriho misky byly poté ještě vypláchnuty destilovanou sterilní vodou. Získaná suspenze byla mixována homogemizátorem WiseTis HG-15D. Suspenze byla naředěna sterilní vodou na požadované koncentrace spór 1×10^5 , 1×10^6 a 1×10^7 ve kterých bylo osivo máčeno po dobu 10 minut.

Veškeré osivo bylo sterilizováno 4 % NaClO po dobu 5 min dle Valkonen & Koponen (1990) a bylo rozděleno na 4 varianty:

- 1) neinokulovaný substrát (kontrola) + sterilizované osivo
- 2) inokulovaný substrát Foc + sterilizované osivo
- 3) neinokulovaný substrát + osivo ošetřené antagonistou
- 4) inokulovaný substrát Foc + osivo ošetřené antagonistou

4.7.2 Statistické vyhodnocení

Získané data byla testována na normalitu dat s negativním výsledkem, na základě toho byl použit k vyhodnocení Kruskal-Wallis test ($\alpha = 0,05$) v programu StatSoft, Inc (2013) STATISTICA (data analysis software system), version 12.

4.8 Metodika ošetření ozónem (O₃)

Pro experiment byla vybrána citlivá odrůdy hlávkového zelí – 'Pourovo pozdní'. Desinfikované osivo bylo po 30 minut máčeno ve vytvořeném inokulu (tvorba inokula viz kapitola 4.4.1) o koncentraci spor 1×10^5 . Kontrolní (neošetřená) varianta byla máčena pouze v destilované sterilní vodě a po oschnutí bylo osivo vyseto. Osivo máčené v inokulu bylo následně ošetřeno ozónem po dobu; 0 minut, 30 minut a 60 minut. Pro ošetření osiva ozónem byl využit ozonizér Hailea HLO-820A (koncentrace 2 mg O₃ / l). Osivo ošetřené ozónem bylo následně vyseto do substrátu AGRO profi a umístěno do Q-cell 1, s režimem 12/12h tma/světlo při teplotě 24/26 °C. Následně byl experiment po 14 dnech hodnocen – počítán počet živých vyklíčených rostlin. Osivo bylo vyseto po 40 ks ve 4 opakováních.

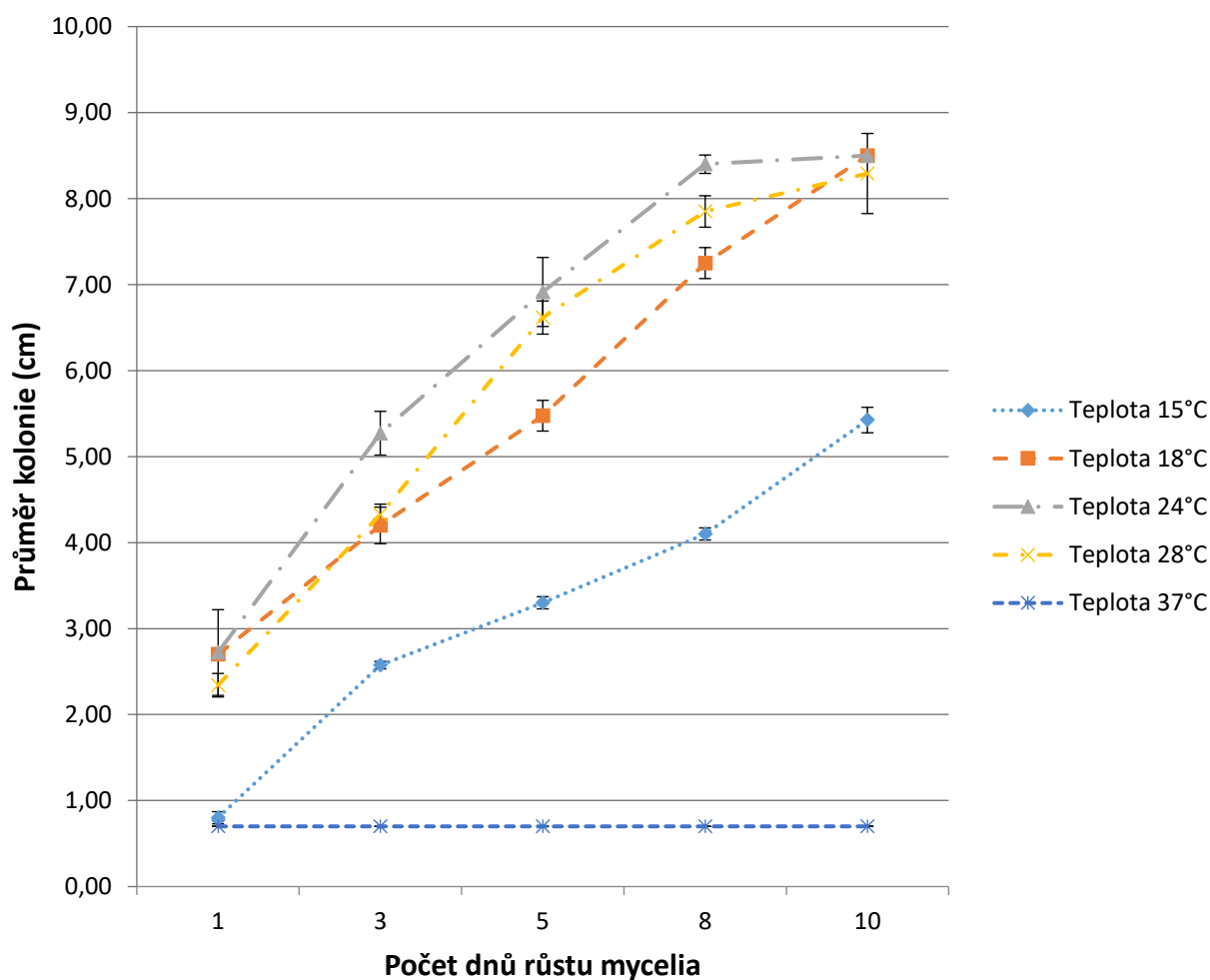
5 Výsledky

5.1 Vliv teploty na růst mycelia *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* v *in vitro*

5.1.1 Rasa 1

Růst mycelia byl v průběhu 10 dnů měřen a vyhodnocován. V *in vitro* nejrychleji rostlo mycelium patogena při teplotě 24 °C a 28 °C, nejmenší přírůstky měl patogen při teplotě 15 °C a při teplotě 37 °C patogen nerostl vůbec. Z grafu 1 je patrné teplotní rozhraní, 18 - 28 °C, při kterém měl patogen největší přírůstky. Při teplotě 37 °C patogen nejevil známky růstu, po ukončení experimentu byla tato varianta umístěna do teploty 24 °C, ani po týdnu nejevil patogen známky růstu.

Graf 1: Vliv teploty v *in vitro* na růst mycelia Foc rasa 1.

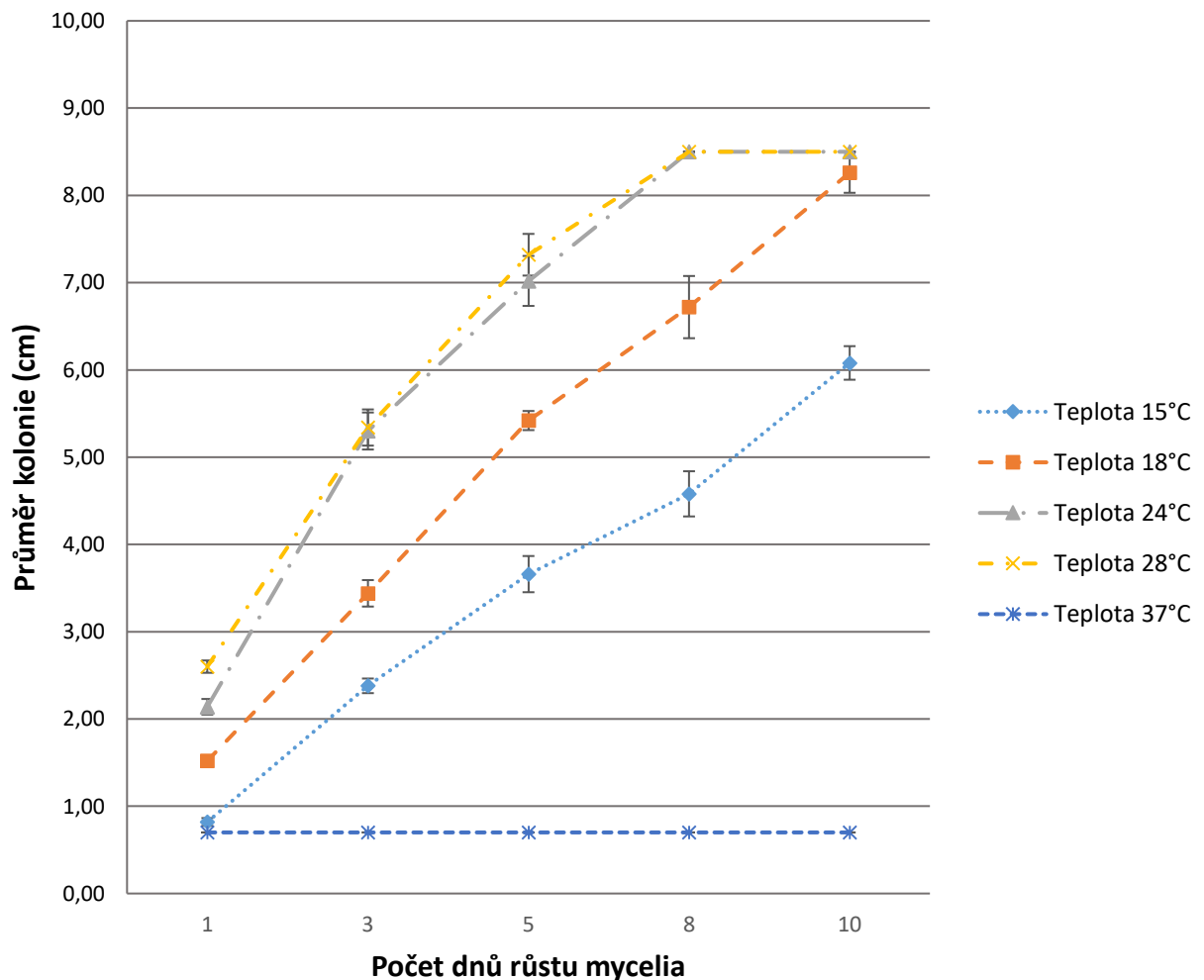


5.1.2 Rasa 2

Růst mycelia byl v průběhu 10 dnů měřen a vyhodnocován. V *in vitro* nejrychleji rostlo mycelium patogena při teplotě 24 °C a 28 °C, nejmenší přírůstky měl patogen při teplotě 15 °C a při teplotě 37 °C patogen nerostl vůbec. Z grafu 2 je patrné teplotní rozhraní, 18 - 28 °C, při kterém měl patogen největší přírůstky. Při teplotě 37 °C patogen nejevil známky růstu, po ukončení experimentu byla tato varianta umístěna do teploty 24 °C, ani po týdnu nejevil patogen známky růstu.

V porovnání s rasou 1, rostla rasa nejvíce intenzivně za obdobných hodnot, lišila se pouze v rychlosti růstu – dosažený určité velikosti průměru mycelia bylo rychlejší.

Graf 2: Vliv teploty v *in vitro* na růst mycelia Foc rasa 2.



5.2 Vliv teploty na infekci rostlin zelí hlávkového z inokulovaného substrátu

Nejvhodnější parametry pro infekční pokusy v pěstebním substrátu vykazovalo inokulum s koncentrací spor patogena *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* (rasa 1) 1×10^5 . Nižší koncentrace (10^3 a 10^4) vykazovaly nedostatečný infekční potenciál.

Byl hodnocen vliv teplot 16/18 °C, 19/21 °C, 22/24 °C a 26/28 °C (den 12 hod/noc 12 hod). První symptomy napadení se u varianty (citlivé odrůdy) 22/24 °C objevily po 2 - 3 týdnech, u variant s nižšími teplotami po 3 - 4 týdnech od inokulace (Tabulka 1). U varianty 22/24 °C docházelo k postupnému projevu symptomů a úhynu rostlin. Varianty 16/18 °C a 19/21 °C 5 - 6 týdnů po inokulaci vykazovala stále pouze počáteční symptomy s minimem uhynulých rostlin. Při variantě 26/28 °C byl u citlivých odrůdy nástup symptomů velmi rychlý, během 1 týdne byla většina rostlin již uhynulá. Rezistentní odrůda vykazovala pouze počáteční symptomy, včetně varianty s nejvyšší teplotou 26/28 °C. Intenzita napadení patogenem odpovídá největší intenzitě růstu mycelia v *in vitro* podmínkách.

5.2.1 Odrůda 'Pourovo pozdní'

V jednotlivých teplotních variantách, mezi výsadbou předpěstovaných rostlin do inokulovaného substrátu a prvním výskytem vizuálních symptomů byl zřetelný rozdíl ve výskytu prvních symptomů a rozvoje choroby (Tabulka 1). Za nižších teplot 16/18 °C a 19/21 °C se první symptomy objevily mnohem později a intenzita vadnutí byla nízká, s minimem uhynulých rostlin, naopak u teplot 22/24 °C a 26/28 °C byl průběh onemocnění mnohem intenzivnější, což je patrné z grafu 3.

Symptomy napadení Foc u rostlin pěstovaných v teplotní variantě 16/18 °C nebyly statisticky významně odlišné oproti variantě 19/21 °C, obdobně nebyly zjištěny rozdíly mezi variantami 22/24 °C a 26/28 °C. Rostliny pěstované v teplotních režimech 16/18 a 19/21 °C byly průkazně méně napadeny Foc v porovnání s teplotními režimy 22/24 °C a 26/28 °C (Tabulka 3).

U varianty 22/24 °C se první symptomy objevily za 1 - 2 týdny (Tabulka 1), symptomy se postupně zintenzivňovaly a vedly k úhynu rostlin. Ve variantě 26/28 °C propukla infekce nejrychleji a nejintenzivněji. První symptomy se u této varianty objevily už několik dní po přesazení rostlin a již při prvním měření byla většina rostlin uhynulých. Varianty 22/24 °C

a 26/28 °C se lišily pouze vizuálně v rychlosti výskytu prvních symptomů infekce a v rychlosti úhynu rostlin.

5.2.2 Odrůda 'Zeus'

V jednotlivých teplotních variantách, mezi výsadbou rostlin do inokulovaného substrátu a prvním výskytem vizuálních symptomů byl zřetelný rozdíl ve výskytu prvních symptomů a rozvoje choroby (Tabulka 1). Za nižších teplot 16/18 °C a 19/21 °C se první symptomy objevily mnohem později a intenzita vadnutí byla nízká, s minimem uhynulých rostlin, naopak u teplot 22/24 °C a 26/28 °C byl průběh onemocnění mnohem intenzivnější, což je patrné z grafu 3. Závažnost infekce, stoupala postupně v závislosti na teplotě, což je zřejmé z grafu 3.

Úroveň napadení Foc v teplotní variantě 16/18 °C nebyla statisticky významně odlišná pouze oproti variantě 19/21 °C. Mezi variantami 22/24 °C a 26/28 °C nebyl statisticky průkazný rozdíl ve stupni napadení. Varianta 19/21 °C se statisticky průkazně lišila ve stupni napadení pouze s variantou 26/28 °C. Rostliny zelí hlávkového pěstované v teplotních režimech 16/18 °C a 19/21 °C byly statisticky významně méně napadeny Foc v porovnání s variantou 26/28 °C (Tabulka 3).

U varianty 22/24 °C se první symptomy objevily za 1 - 2 týdny (Tabulka 1), symptomy se postupně zintenzivňovaly a vedly k úhynu rostlin. Při variantě 26/28 °C se symptomy vadnutí objevily nejrychleji a byly nejintenzivnější. První symptomy se u této varianty objevily už několik dní po přesazení rostlin a již při prvním měření byla většina rostlin uhynulých

5.2.3 Odrůda 'Target'

Symptomy napadení Foc u rostlin pěstovaných v rozdílných teplotních variantách se statisticky lišily pouze varianty 19/21 °C a 26/28 °C. Mezi ostatními variantami nebyl statisticky průkazný rozdíl ve stupni napadení (Tabulka 3). U této odrůdy byl výskyt symptomů zcela minimální anebo žádný. Pouze ve variantě 26/28 °C došlo k úhynu několika rostlin a několik dalších mělo během hodnocení počáteční symptomy napadení patogenem.

Tabulka 1: Počet dnů do výskytu prvních symptomů Foc 1.

Teplota Odrůda	16/18 °C	19/21 °C	22/24 °C	26/28 °C
Pourovo pozdní	21-28	21-28	7-14	0-7
Zeus	21-28	21-28	7-14	0-7
Target	28-35	28-35	21-28	7-14

5.2.4 Porovnání odrůd z hlediska citlivosti k fuzariovému vadnutí v různých teplotních podmínkách

Odrůda 'Pourovo pozdní' měla statisticky stejnou úroveň symptomů za nižších teplot (16/18 °C a 19/21 °C) jako odrůda 'Zeus'. Při vyšších teplotách (22/24 °C a 26/28 °C) měly obě odrůdy statisticky stejnou úroveň napadení, přičemž varianta 'Zeus' 22/24 °C se neodlišovala od žádné z varianty odrůdy 'Pourovo pozdní' (Tabulka 3).

Odrůda 'Pourovo pozdní' vychází na intenzitu napadení v závislosti na teplotě méně citlivá než odrůda 'Zeus' (graf 3), která se při variantě 19/21 °C průkazně neodlišovala od 'Pourovo pozdní' při variantě 22/24 °C (Tabulka 2).

Odrůda 'Target' vykazovala svou rezistenci proti infekci patogenem, ale za vyšší teploty 26/28 °C došlo k úhynu několika rostlin, a úroveň infekce se při této variantě (26/28 °C) průkazně nelišila od citlivých odrůd za teplot 16/18 °C a 19/21 °C (Tabulka 3).

Odrůda 'Target' vykazovala ve všech variantách vždy statistický rozdíl oproti ostatním odrůdám za teplot 22/24 °C a 26/28 °C. Za nižších teplot 16/18 a 19/21 °C se odrůda 'Target' průkazně nelišila v intenzitě napadení pouze vůči odrůdě 'Zeus' 16/18 °C, jinak měla vždy statisticky průkazně nižší stupeň napadení oproti ostatním variantám (Tabulka 3).

Úroveň napadení odrůdy 'Target' za teploty 26/28 °C dosahovala stejné hodnoty stupně napadení jako u citlivých odrůdy za nižších teplot 16/18 °C a 19/21 °C, při variantě 22/24 °C byl statisticky stejný stupeň napadení v porovnání s variantami s nižší teplotou, vyjma varianty 'Zeus' 19/21 °C, která se průkazně odlišovala. Celkové statistické vyhodnocení všech variant je shrnuto v tabulce 3.

Pro potvrzení přítomnosti patogena v rostlinném pletivu byl vybrán soubor 10 rostlin pro analýzu PCR. U variant s teplotami 22/24 °C a 26/28 °C byly po vyhodnocení odebírány především uschlé a uhynulé rostliny, u kterých se potvrdila přítomnost patogena v kořenech a kořenovém krčku. V listech byla analýza vždy negativní. U zbylých variant byly odebírány

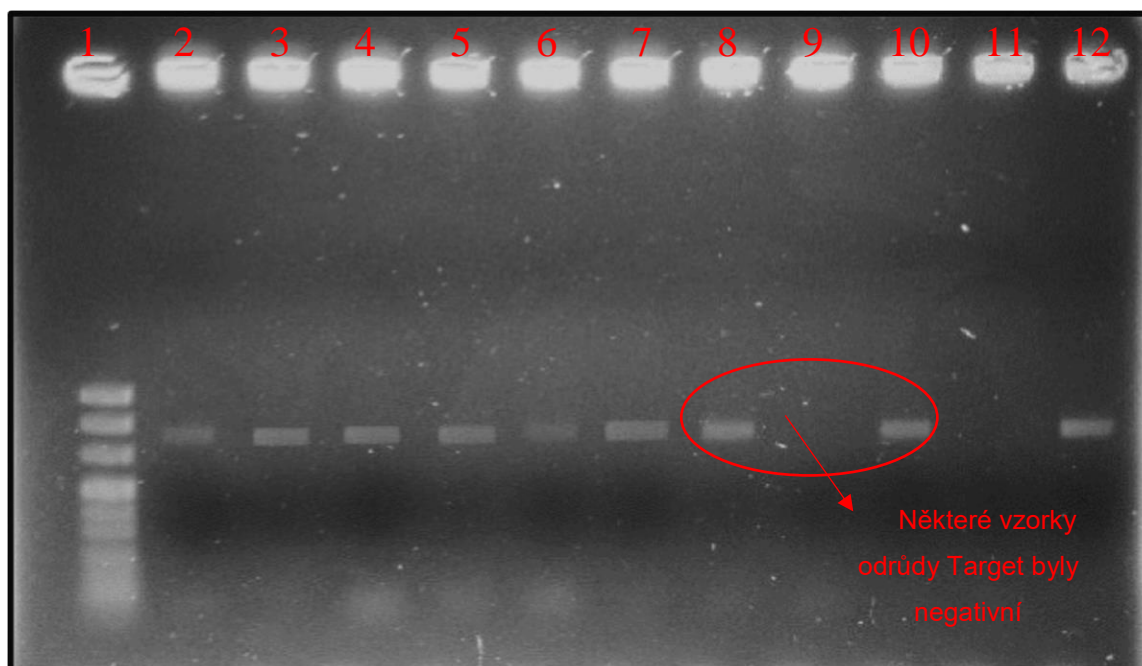
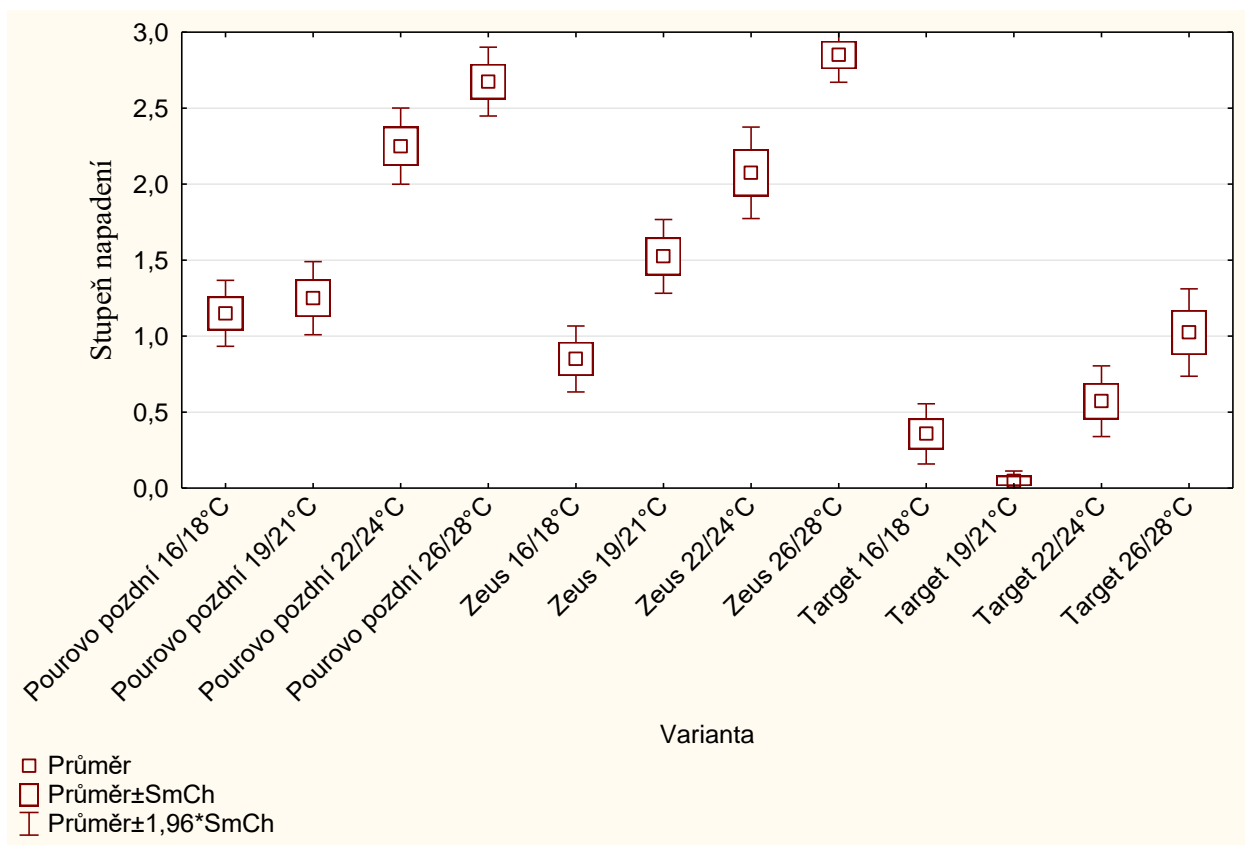
po vyhodnocení uhynulé a živé rostliny převážně s počátečními symptomy, které se projevovaly během celého hodnocení (spodní listy s příznakem odpadly a rostlina působila zdáním nenapadení patogenem, to se opakovalo během celého pokusu) a i přes zdánlivý dobrý zdravotní stav, byla v pletivech kořenů a kořenového krčku pomocí PCR analýzy prokázána přítomnost patogena (Obrázek 4).

Zajímavým poznatkem je zjištění, že citlivé odrůdy za nižších teplot (16/18 a 19/21 °C) mají minimální, tedy průkazně shodné symptomy jako rezistentní odrůda za vyšších teplot (26/28 °C) což bylo potvrzeno i statisticky. Při pokusném přemístění variant s nižší teplotou 16/18 a 19/21 (po vyhodnocení) do podmínek s vyšší teplotou 26/28 °C, došlo za několik dní k rychlému nástupu infekce a do deseti dnů k úhynu většiny rostlin (odrůdy 'Zeus' a 'Pourovo pozdní').

Tabulka 2: Nejnižší a nejvyšší průměrné hodnoty stupně napadení a jejich rozdíly

Odrůda	Stupeň napadení (body)		Rozdíl hodnot
	Nejnižší průměrná hodnota (varianta)	Nejvyšší průměrná hodnota (varianta)	
Pourovo pozdní	1,15 (16/18 °C)	2,68 (26/28 °C)	1,53
Zeus	0,85 (16/18 °C)	2,85 (26/28 °C)	2
Target	0,05 (19/21 °C)	1,02 (26/28 °C)	0,97

Graf 3: Grafické zobrazení vlivu teploty na infekci rostlin z pěstebního substrátu.



Obrázek 4: Elektroforetický agarózový gel (1,5 %); 1: marker (100 bp DNA ladder), 2 - 4: 'Pourovo pozdñí' 19/21 °C, 5 - 7: 'Zeus' 16/18 °C, 8 - 10: 'Target' 22/24 °C, 11: negativní kontrola (sdH₂O), 12: pozitivní kontrola (DNA Foc).

Tabulka 3: Statistické vyhodnocení stupně napadení jednotlivých variant

Varianty	Pourovo pozdní 16/18°C	Pourovo pozdní 19/21°C	Pourovo pozdní 22/24°C	Pourovo pozdní 26/28°C	Zeus 16/18°C	Zeus 19/21°C	Zeus 22/24°C	Zeus 26/28°C	Target 16/18°C	Target 19/21°C	Target 22/24°C
Target 26/28°C			++	++			++	++		++	
Target 22/24°C			++	++		++	++	++			
Target 19/21°C	++	++	++	++	+	++	++	++			
Target 16/18°C	+	++	++	++		+	++	++			
Zeus 26/28°C	++	++			++	++					
Zeus 22/24°C					++						
Zeus 19/21°C				++							
Zeus 16/18°C			++	++							
Pourovo pozdní 26/28°C	++	++									
Pourovo pozdní 22/24°C	++	+									
Pourovo pozdní 19/21°C											

(Kruskal-Wallisův test)

+ statisticky významný rozdíl $\alpha = 0,05$

++ statisticky vysoce významný rozdíl $\alpha = 0,01$

5.3 Vliv pH na růst mycelia *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans*

5.3.1 Rasa 1

Z výsledků je patrný rozdíl při růstu v prostředí s odlišnými hodnotami pH (graf 4), přírůstky mycelia se lišily ve variantách s nižšími hodnotami pH 4 a 5 oproti zbylým variantám a dále se lišily mezi sebou. Ve variantě pH 4 patogen rostl průkazně pomaleji oproti ostatním variantám a během 10 dnů nezarostl celou miskou (9 cm) viz tabulka 8.

V ostatních variantách (6 - 9 pH) rostlo mycelium nejrychleji a během experimentu se varianty odlišovaly především proti variantám pH 4 a 5, mezi sebou se varianty nejvíce lišily během pátého dne experimentu, k osmému dni experimentu již nebyly průkazné rozdíly v růstu mycelia mezi variantami pH 6 - 9 (Tabulka 8).

Byla zjištěna závislost velikosti průměru kolonie mycelia Foc 1 na hodnotě pH, jednotlivé korelační koeficienty jsou uvedeny v tabulce 4.

Po kolonizaci celé Petriho misky byla stanovena hodnota pH živného média a byla zaznamenána tendence okyselování média v řádu jednotek (Tabulka 5). Čím větší byla původní hodnota pH média, tím větší byl naměřený rozdíl hodnot pH (největší rozdíl byl při hodnotě pH 9).

Tabulka 4: Závislost růstu mycelia Foc rasa 1 na hodnotě pH.

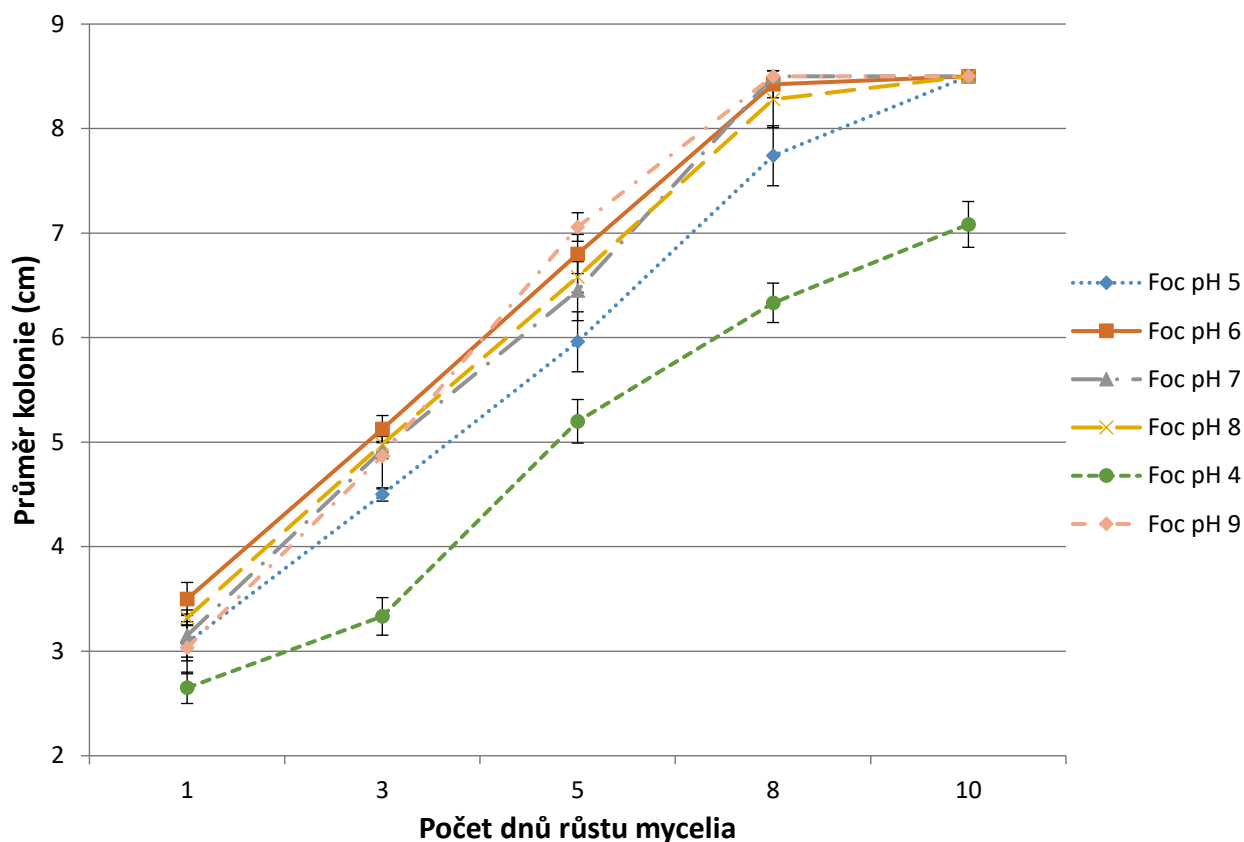
Dny	1	3	5	8	10
$p (\alpha = 0.05)$	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
Korelační koeficient	0.26	0.7	0.8	0.78	0.6

Korelační koeficient průměrů mycelia mezi hodnotami pH (4; 5; 6; 7; 8 a 9) během jednotlivých měření.

Tabulka 5: Hodnota pH media na začátku a konci experimentu Foc rasa 1

Hodnota pH				
Původní hodnota pH	PDA médium	Rozdíl hodnot pH (PDA médium)	ME médium	Rozdíl hodnot pH (ME médium)
4	3,1 ± 0,6	0,9	3,7 ± 0,1	0,3
5	3,3 ± 0,11	1,7	3,68 ± 0,01	1,32
6	3,9 ± 0,13	2,1	4,85 ± 0,18	1,15
7	5,97 ± 0,21	1,03	4,71 ± 0,29	2,29
8	6,3 ± 0,2	1,7	5,4 ± 0,25	2,6
9	6,51 ± 0,24	2,49	5,89 ± 0,2	3,11

Graf 4: Vliv pH na růst mycelia Foc rasa 1



5.3.2 Rasa 2

Z výsledků je patrný rozdíl při růstu v prostředí s odlišnými hodnotami pH (graf 5), přírůstky mycelia se lišily ve variantách s nižšími hodnotami pH 4 a 5 oproti zbylým variantám a dále se lišily mezi sebou. Ve variantě pH 4 patogen rostl průkazně pomaleji oproti ostatním variantám a během 10 dnů nezarostl celou miskou (9 cm) viz tabulka 8.

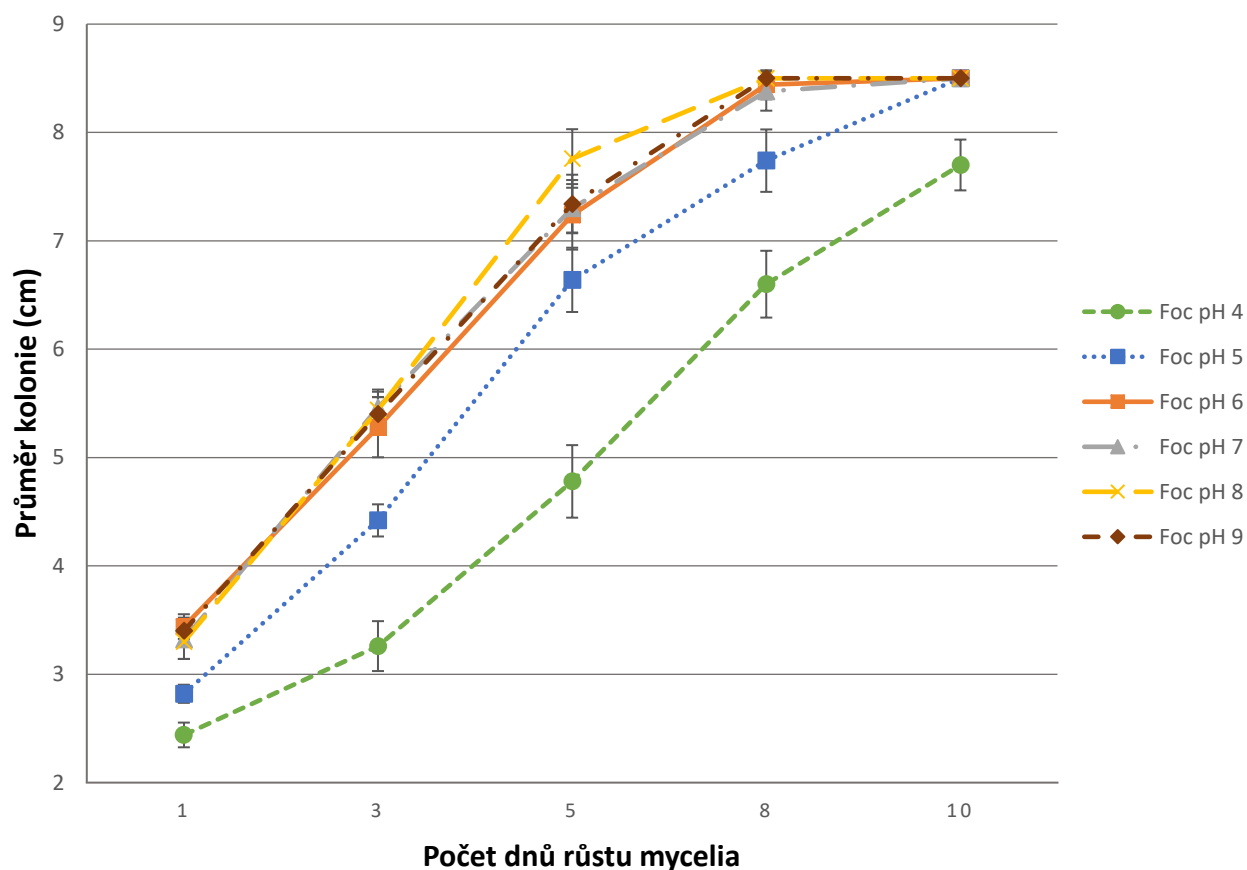
V ostatních variantách (6 - 9 pH) rostlo mycelium nejrychleji a během experimentu se varianty odlišovaly především proti variantám pH 4 a 5, mezi sebou se varianty nejvíce lišily během pátého dne experimentu, k osmému dni experimentu již nebyly průkazné rozdíly v růstu mycelia mezi variantami pH 6 - 9 (Tabulka 8).

Byla zjištěna závislost velikosti průměru kolonie mycelia Foc 2 na hodnotě pH, jednotlivé korelační koeficienty jsou uvedeny v tabulce 6.

Po kolonizaci Petriho misky byla stanovena hodnota pH média a byl, zaznamenám trend v okyselování média v řádu jednotek (Tabulka 7). Čím větší byla původní hodnota pH média, tím větší byl naměřený rozdíl hodnot pH (největší rozdíl byl při hodnotě pH 9).

V porovnání s rasou 1, byly přírůstky mycelia rasy 2 ve většině variant přibližně stejně velké anebo větší a mycelium zarostlo celou miskou, vyjma varianty pH 4. Rozdíl v přírůstcích mycelia v jednotlivých variantách mezi rasou 1 a rasou 2 ukazuje tabulka 8.

Graf 5 : Vliv pH na růst mycelia Foc rasa 2.



Tabulka 6: Závislost růstu mycelia Foc rasa 2 na hodnotě pH.

Dny	1	3	5	8	10
p ($\alpha = 0.05$)	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
Korelační koeficient	0.8	0.8	0.8	0.8	0.64

Korelační koeficient průměrů mycelia mezi hodnotami pH (4; 5; 6; 7; 8 a 9) během jednotlivých měření.

Tabulka 7: Hodnota pH media na začátku a konci experimentu Foc rasa 2.

Hodnota pH				
Původní hodnota pH	PDA médium	Rozdíl hodnot pH PDA médium	ME médium	Rozdíl hodnot pH ME médium
4	3,9 ± 0,14	0,1	2,67 ± 0,06	1,23
5	4,5 ± 0,09	0,5	3,37 ± 0,05	1,63
6	5,3 ± 0,17	0,7	4,08 ± 0,34	1,92
7	6,3 ± 0,1	0,7	5,26 ± 0,06	1,74
8	6,5 ± 0,16	1,5	5,53 ± 0,12	2,47
9	6,9 ± 0,15	2,1	5,97 ± 0,06	3,03

Tabulka 8: Statistické vyhodnocení velikosti mycelia v průběhu experimentu Foc rasa 1 a 2.

Dny	1		3		5		8		10	
Varianta	Rasa		Rasa		Rasa		Rasa		Rasa	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
pH 4 A	2,65b cdef+	2,44bc def+	3,33 bcdef f	3,26b cdef	5,2bc def+	4,78bc def+	6,33bc def+	6,6bcd ef+	7,08bc def+	7,7bcd ef+
pH 5 B	3,08a ce+	2,82bc +	4,5ac def	4,42a cdef	5,96a cdef+	6,64ac def+	7,74ac def	7,74ac def	8,5a	8,5a
pH 6 C	3,5ab f	3,44ab	5,13 ab	5,28a b	6,8ab +	7,24ab e+	8,43ab	8,44ab	8,5a	8,5a
pH 7 D	3,15a	3,32ab	4,93 ab+	5,46 ab+	6,45 abf+	7,3 abe+	8,43ab	8,44ab	8,5a	8,5a
pH 8 E	3,32a b	3,3ab	4,98 ab+	5,44 ab+	6,58 abf+	7,76 abcdf+	8,28ab	8,5ab	8,5a	8,5a
pH 9 F	3,03a c+	3,4ab+	4,87 ab+	5,4ab d+	7,06 abde	7,34 abe	8,5ab	8,5ab	8,5a	8,5a

Jednotlivé písmena a – f symbolizují statisticky průkazný rozdíl přírůstků mycelia v jednotlivých dnech mezi rozdílnými hodnotami pH (A-F) během jednotlivých měření.

Symbol + značí průkazný rozdíl průměrného přírůstku mycelia mezi rasou 1 a 2 během jednotlivých měření.

5.4 Hodnocení vlivu antagonistického vztahu mikroorganismů na *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* rasa 1

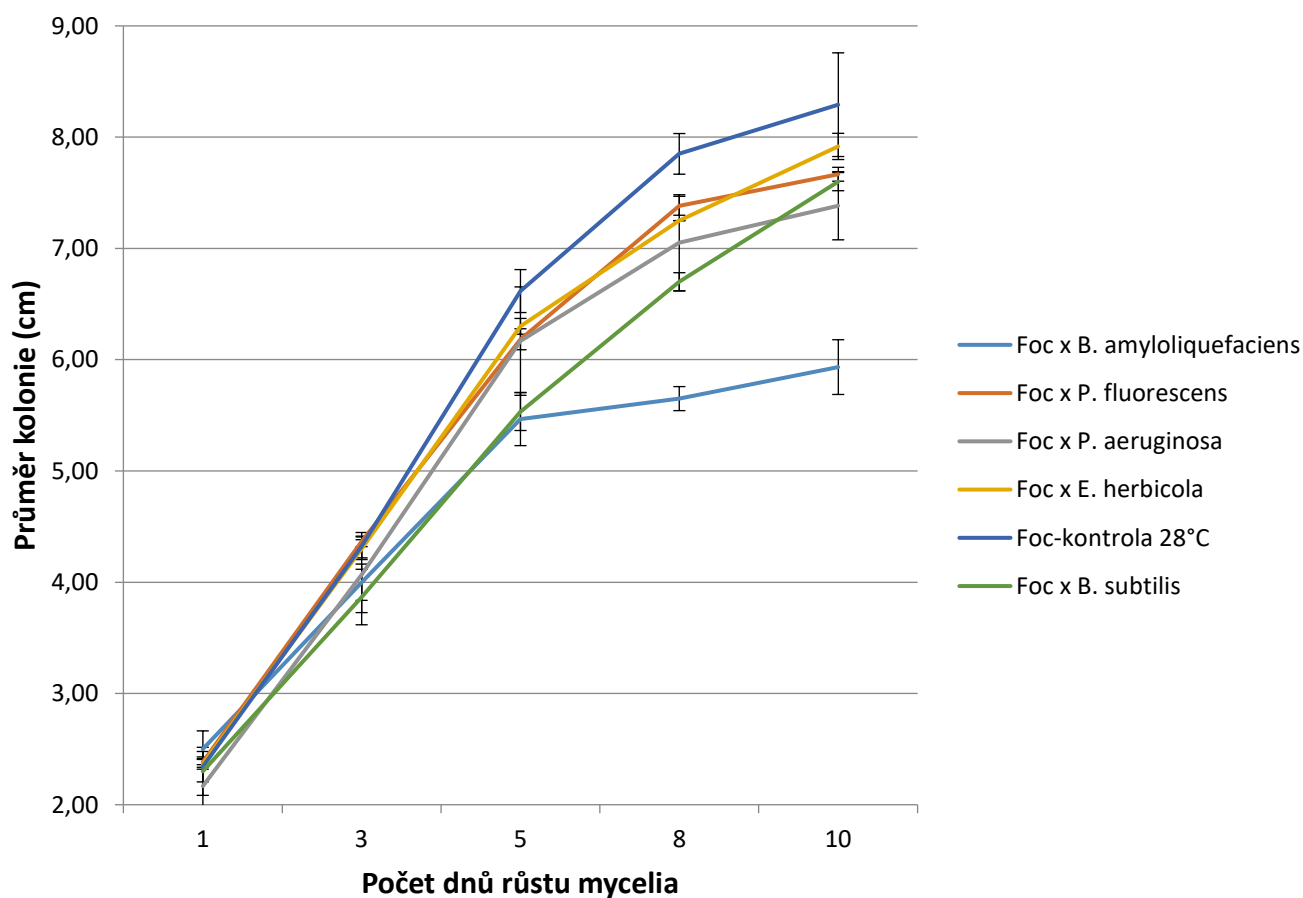
Vybrané mikroorganismy byly spolu s patogenem *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* rasa 1 a 2 naočkovány terčíkem (houby) či v případě bakterií pipetou na Petriho misky v tzv. duálních testech. Byl sledován růst obou mikroorganismů a měřen průměr mycelia patogena.

5.4.1 Bakterie

Z výsledků získaných v laboratorních experimentů, lze považovat za účinnou bakterii pouze *Bacillus amyloliquifascient*, která inhibovala růst mycelia Foc (Graf 6). Literaturou uváděné inhibující bakterie *Pseudomonas fluorescens* a *Bacillus subtilis* pouze zpomalily, ale nezastavily růst patogena Foc, který postupně bakterie přerostl (foto viz příloha).

Zbylé testované bakterie nezpomalily růst Foc a patogen jimi nebyl inhibován.

Graf 6: Interakce mezi bakteriemi a Foc rasa 1.



5.4.2 Houby

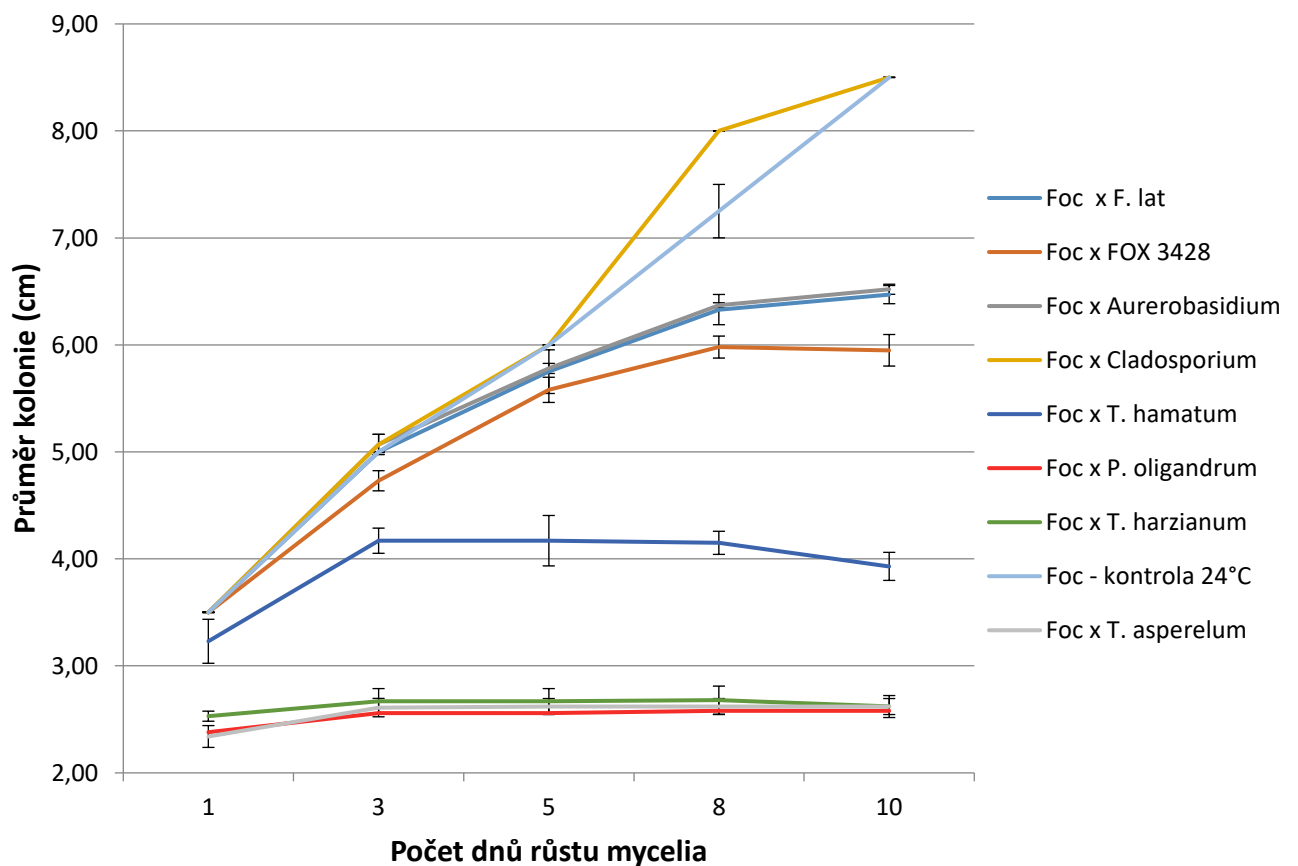
Z hub nejvíce snížila velikost průměru kolonie patogena *Trichoderma harzianum*, houba během 2 - 3 dní zcela přerostla a pohltila kolonii Foc. K inhibici průměru kolonie patogena došlo i u varianty s *Trichoderma hamatum* a *Trichoderma asperellum*, které potlačily a velmi brzy zastavily růst kolonie Foc (Graf 7).

Podobné účinky vykázalo také *Pythium oligandrum*, které velmi rychle dosáhlo kolonie Foc a inhibovalo její rozrůstání.

U varianty s nepatogenním kmenem *Fusarium oxysporum*, došlo k vytvoření inhibiční zóny mezi oběma mikroorganismy a k zastavení růstu patogena (foto viz příloha).

Zbylé testované houby nezpomalily růst Foc a patogen jimi nebyl inhibován.

Graf 7: Interakce mezi houbami a Foc rasa 1.

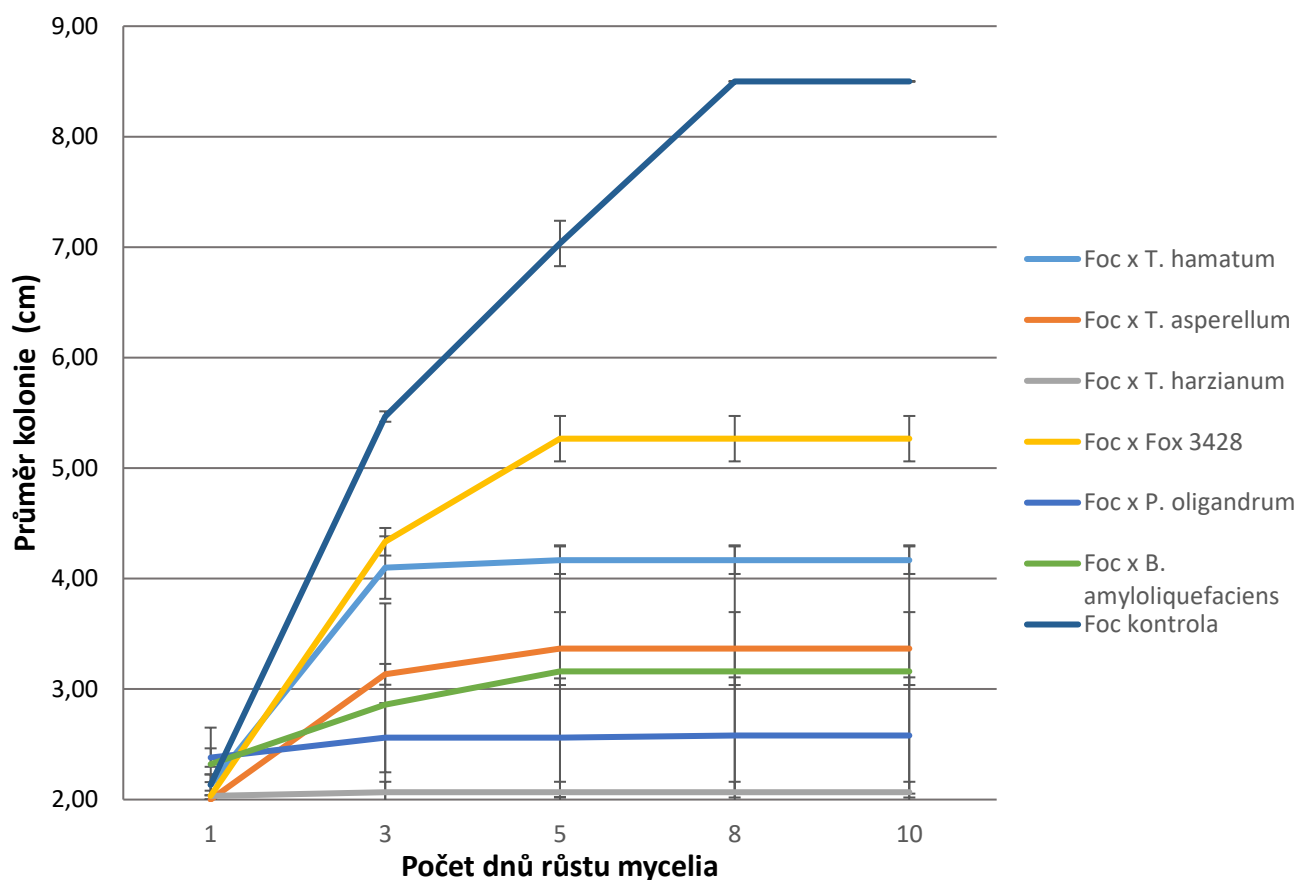


5.5 Hodnocení vlivu antagonistického vztahu mikroorganismů a *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* rasa 2

Na základě výsledků s rasou Foc 1, byly testovány jen účinné mikroorganismy a to: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma hamatum* a *Trichoderma asperellum*, které potlačily a velmi brzy zcela zastavily růst kolonie Foc 1. Podobné účinky vykázalo také *Pythium oligandrum* a nepatogenním kmen *Fusarium oxysporum* s bakterií *Bacillus amyloliquifascient*, kdy došlo k vytvoření inhibiční zóny mezi oběma mikroorganismy nebo k zastavení růstu patogena.

Výsledky jsou obdobné jako s rasou 1, nejvíce byl patogen inhibován druhy *Trichoderma harzianum*, *T. asperellum*, *T. hamatum* a *Pythium oligandrum*, za účinný lze považovat opět i nepatogenní kmen *Fusarium oxysporum* 3428, kdy byla vytvořena inhibiční zóna jako v případě Foc rasa 1. Z bakterií byl opět účinný druh *Bacillus amyloliquifascient*, kdy došlo k podobné inhibici jako v případě Foc rasy 1 (Graf 8, foto viz příloha).

Graf 8: Interakce mezi mikroorganismy a Foc rasa 2.



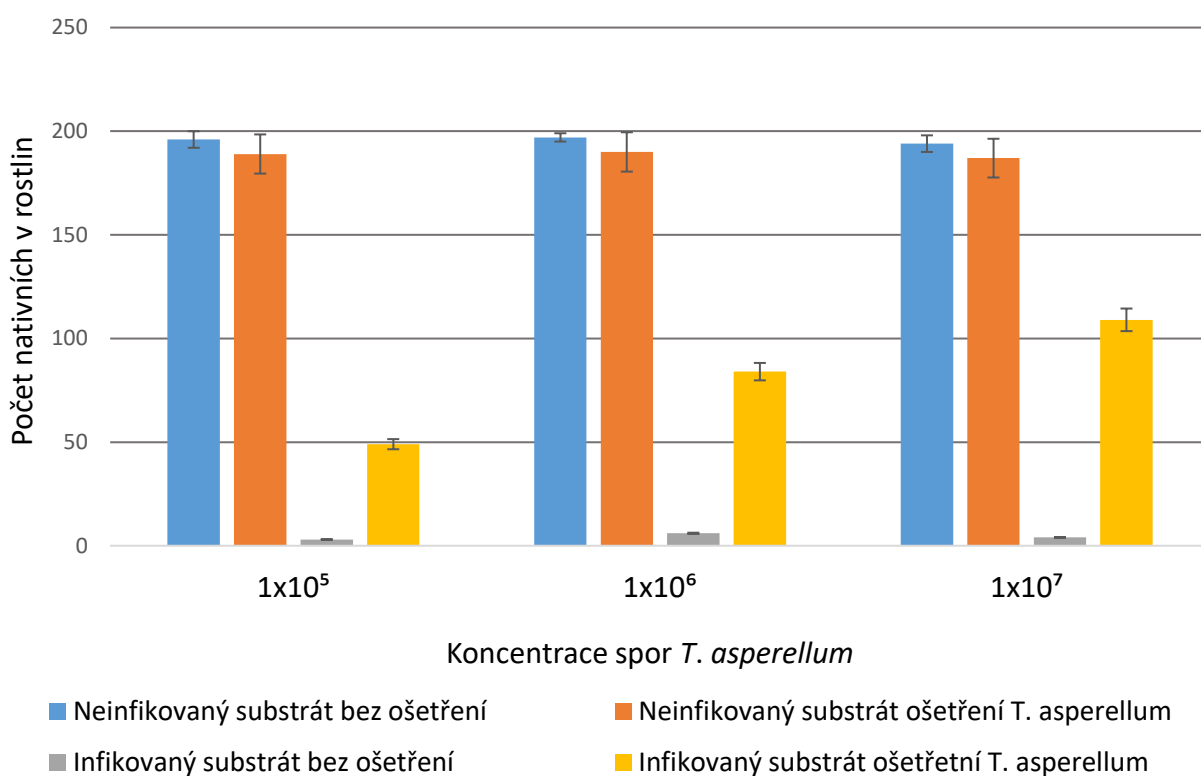
5.6 Ošetření osiva antagonistickými mikroorganismy

Již během prvních dnů během klíčení osiva byl patrný rozdíl mezi neošetřenou kontrolou a osivem, které bylo ošetřeno (máčeno) suspenzí *T. asperellum*. U neošetřené kontroly po vyrašení prvních děložních listů došlo k jejich žloutnutí a uhynutí klíčících rostlin, tedy došlo k tzv. padání klíčících rostlin, vlivem Foc. Rostliny, které přežily tuto fázi, byly zakrnělé a i tyto rostliny postupně uhynuly. V kontrolních variantách, tedy bez ošetření, bylo živých 97 - 98 % rostlin, při ošetření osiva pouze suspenzí *T. asperellum* bylo živých 93,5 - 95 %. Ve variantách infikovaného substrátu a neošetřeného osiva bylo 1,5 - 3 % živých rostlin. Ve variantách infikovaného substrátu a ošetřeného osiva přežilo 24,5 % (koncentrace spor inokula 1×10^5), 42 % (koncentrace spor inokula 1×10^6) a 60,5 % (koncentrace spor inokula 1×10^7) rostlin (Graf 9). Procentuální počet nativních rostlin přehledně shrnuje tabulka 9. Vyšší účinnost inokula při vyšší koncentrací spor byla potvrzena statisticky (Tabulka 10), kdy byl průkazný rozdíl živých rostlin po ošetření osiva při koncentracích spor inokula 1×10^5 a 1×10^7 .

Tabulka 9: Procentuální shrnutí nativních rostlin.

Koncentrace spor <i>T. asperellum</i> v inokulu	Neinfikovaný substrát		Infikovaný substrát	
	Ošetření osiva <i>T. asperellum</i>	bez ošetření	Ošetření osiva <i>T. asperellum</i>	bez ošetření
1×10^5	94,5 %	98 %	24,5 %	1,5 %
1×10^6	95 %	97,5 %	42 %	3 %
1×10^7	93,5 %	97 %	60,5 %	2 %

Graf 9: Počet nativních vyklíčených rostlin.



Tabulka 10: Statistické vyhodnocení vlivu koncentrace spór na výskyt fusariového vadnutí při ošetření osiva pomocí *T. asperellum* při výsevu do infikovaném substrátu.

Koncentrace spor <i>T. asperellum</i> v inokulu	1×10^5	1×10^6	1×10^7
1×10^5	-	0,349993	<i>0,005106</i>
1×10^6	0,349993	-	0,349993
1×10^7	<i>0,005106</i>	0,349993	-

Kruskal-Wallis test, $\alpha = 0,05$

5.7 Ošetření ozonem

Už po několika dnech po výsevu inokulovaného osiva byl vizuálně patrný rozdíl mezi ošetřeními, které trvalo 60 minut oproti osivu, které ošetřeno nebylo, tedy varianta 0 minut. Ve variantě 0 minut, začala klíčit většina semen, ale po 14 dnech od výsevu přežilo v průměru pouze 10 % rostlin. V případě varianty ošetřené ozónem 60 minut, začala klíčit většina semen a po 14 dnech přežilo průkazně více rostlin, a to 31 % (Tabulka 11). Varianta ošetřená ozónem

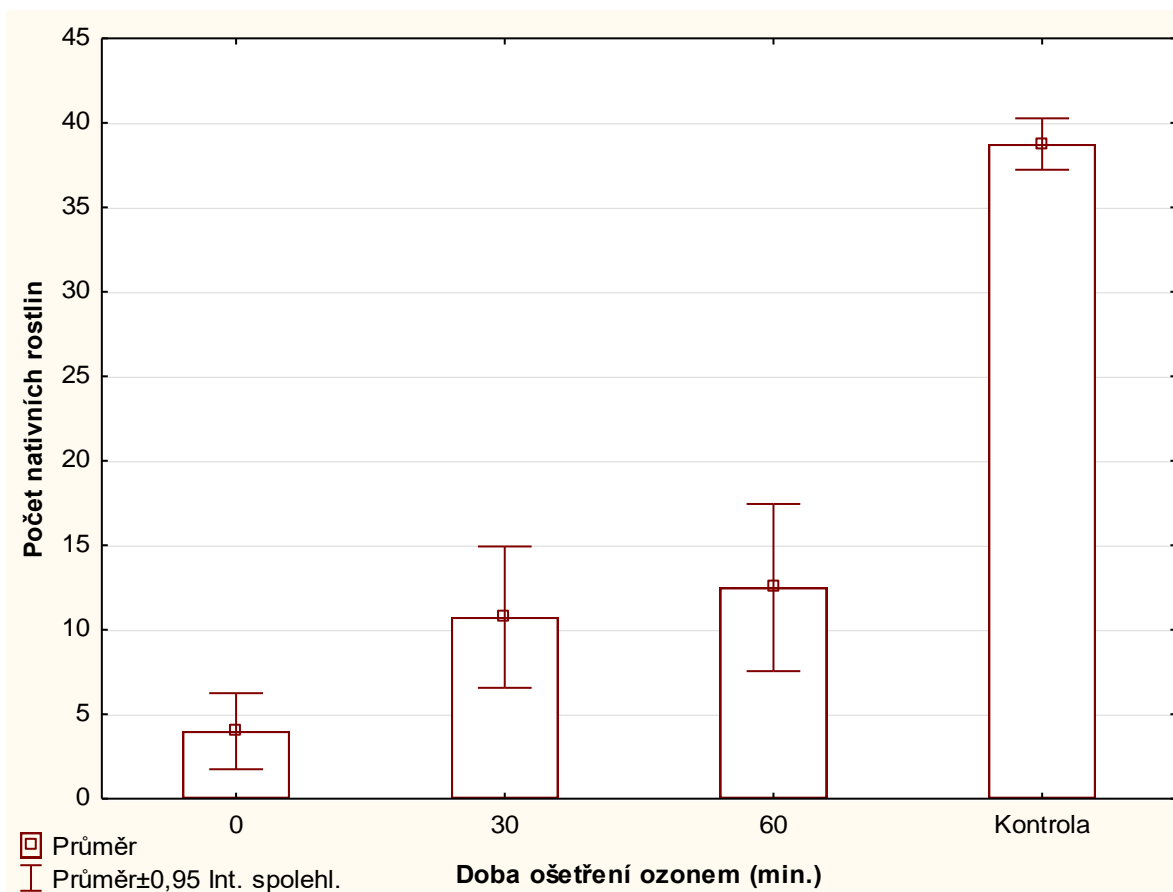
po dobu 30 minut se průkazně nelišila od ostatních dvou (0 a 60 minut), ale i v této variantě byl patrný, neprůkazný rozdíl v počtu nativních vyklíčených rostlin, kdy přežilo 26 % rostlin, celkové zhodnocení je zobrazeno v grafu 10, včetně kontroly, která nebyla inokulována patogenem, a bylo zde 97 % živých rostlin. Z výsledků je patrné, že ošetření inokulovaného osiva hlávkového zelí pomocí ozónu má určité desinfekční účinky.

Tabulka 11: Statistické vyhodnocení působení ozónu na výskyt fusariového vadnutí při inokulaci osiva.

Doba ošetření osiva ozónem	0 minut	30 minut	60 minut
0 minut	-	0,105029	<i>0,028086</i>
30 minut	0,105029	-	1,000000
60 minut	<i>0,028086</i>	1,000000	-

Kruskal-Wallis test, $\alpha = 0,05$

Graf 10: Počet nativních vyklíčených rostlin z inokulovaného osiva ošetřeného ozónem po jednotlivých variantách a kontrola bez inokulace a ošetření ozónem.



5.8 Ekonomické zhodnocení využití antagonistických mikroorganismů

Do celkových nákladů na pěstování plodin je nutno přičíst také náklady na prostředky na ochranu rostlin ať už při předpěstování nebo při pěstování v polních podmínkách. V případě biologické ochrany existuje několik přípravků na bázi antagonistických mikroorganismů. Velmi známý a opět dostupný je přípravek Polyversum (*Pythium oligandrum*), existují ovšem i jiné přípravky jako: RhizoVital 42 (*Bacillus amyloliquefaciens*) nebo Trichomil (*Trichoderma harzianum*). Případné použití by navyšovalo celkovou cenu na ochranu rostlin. Konkrétně ošetření brukvovité zeleniny pomocí přípravku Polyversum ve formě záливky či postřiku, by zvýšilo náklady na jeden hektar o cca 2 800 Kč (20 g na 1 ha). U Slovenského přípravku Trichomil (2 litry na 1 ha) by se náklady za hektar zvýšily o cca 1 000 Kč (40 €) v případě RhizoVital 42 (0,5l na 1 ha) o cca 1 300 Kč. V případě ploch o velikosti několika desítek hektarů by náklady na ochranu rostlin vzrostly o desítky tisíc korun (bez ceny za vodu a mechanizaci).

Využitím přípravků asi nelze zcela omezit ztráty zelí hlávkového způsobené fusariovým vadnutím, ale může tyto ztráty významně snížit. V případě rajčat jsou antagonistické mikroorganismy schopny snížit tyto ztráty i o více než 50 % (Ajillogba et al. 2013; Gerbore et al. 2013). Snížením ztrát na zelí způsobené Foc, které v Ruské federaci dosahují 20 - 25 % (AgroFlora 2014) o 50 % by došlo „pouze“ k 10 - 15 % ztrátám.

Výnos pozdních odrůd zelí bílého hlávkového z hektaru může dosahovat v podmínkách ČR okolo 80 - 100 t. Rané odrůdy se pěstují na začátku vegetace s nižší teplotou půdy a patogen za nižších teplot je mnohem méně agresivní než během letních měsíců, způsobené ztráty jsou tedy menší, rané odrůdy mají také menší výnos a to 35 - 40 t/ha. Průměrná cena za kilo hlávkového bílého zelí byla v ČR v roce 2018 necelých 7 korun (Buchtová 2018). Samotná cena za kilo hlávkového bílého zelí se mění každým rokem a není tedy stálá. Celkový trend cen je takový, že spíše stoupá, to lze dát i do souvislosti s většími nároky na zavlažování z důsledku výskytu sucha a vyšších teplot, tedy podmínek, které vyhovují patogenu.

Tržby z jednoho hektaru (bez započtení ostatních nákladů) s výnosem 100 t/ha činí 700 000 Kč. Vezmeme-li v úvahu, že i v našich podmínkách mohou být ztráty u citlivé odrůdy způsobené fusariovým vadnutím teoreticky 20 %, budou tržby nižší o 140 000 Kč na hektar. V případě použití přípravku Polyversum a teoretickým snížením ztrát o 50 %, byly by případné ztráty poloviční, tedy 70 000 Kč na hektar, plus cena za samotný přípravek 2 800 Kč, tzn., že v případě využití přípravku Polyversum by ztráta (po započtení ceny přípravku) činila 72 800 Kč. Vyčíslené teoretické ztráty nemusí odpovídat realitě, kde vstupuje do hry spousta faktorů,

jako teplota, vlhkost, citlivost odrůdy, vegetační doba, množství spor v půdě, způsob pěstování apod.

Dalším těžko vyčíslitelným benefitem využití antagonistických mikroorganismů je, že nechrání rostliny pouze proti *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans*, ale jsou uváděny účinky proti daleko většímu spektru houbových patogenů, studie dále prokázaly vitálnější růst ošetřených rostlin a v případě rajčat i vyšší násadu květů. V případě zelí je benefit v násadě květů vedlejším efektem využitelný pouze v semenářství, ale lze teoreticky přepokládat, že mikroorganismy by měli mít taktéž pozitivní vliv na vývoj a růst zelí hlávkového a tím teoreticky i zvýšení váhy samotných hlávek a ke zlepšení zdravotního stavu.

6 Diskuze

6.1 Vliv teploty na intenzitu fusariového vadnutí u zelí hlávkového

Výsledky experimentů potvrdily, že druh *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* je teplomilný patogen. Podle (Koike et al. 2007) je Foc nejméně aktivní při teplotách 24 - 29 °C, podobné rozmezí teplot je optimální i pro ostatní druhy rodu *Fusarium*, například *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. napiforme* i *F. oxysporum* rostou nejlépe při teplotě 25 - 30 °C (Mogensen et al. 2009; Mohsen et al. 2016), naopak např. *F. sacchari* a *F. globosum* rostou dobře při teplotě 20 °C (Mohsen et al. 2016). Aktivita formae speciei druhu *Fusarium oxysporum* začíná při teplotách okolo 15 °C, při teplotách nad 30 °C se růst zpomaluje a ustává (Mogensen et al. 2009; Gheorghe et al. 2015; Somu & Thammaiah 2015; Fovo et al. 2017), čemuž odpovídají i výsledky experimentu v *in vitro* podmínkách, kde mycelium Foc při teplotě 37 °C nevykazovalo žádné přírůstky, z čehož lze usuzovat, že byl dlouhodobým působením vyšší teploty zahuben nebo silně inhibován.

Z našich výsledků je patrné, že v *in vitro* podmínkách patogen nejlépe rostl při teplotě 24 a 28 °C. To se shoduje s tvrzením Navas-Cortés et al. (2006) a Somu & Thammaiah (2015). Obdobné výsledky prezentují i studie Fravel et al. (1995); Hibar et al. (2006); Cha (2007) a Scott et al. (2010), které uvádí teplotu 25 °C jako optimální pro růst *F. oxysporum*. Teplotu 28 °C uvádí Fovo et al. (2017) jako optimální pro růst mycelia *F. oxysporum* a Gupta et al. 2010 pro *F. oxysporum* f. sp. *pisidii*. Farooq et al. (2005) uvádí pro *F. oxysporum* f.sp. *ciceri* optimální teploty 25 až 30 °C. Gheorghe et al. (2015) uvádí větší rozpětí teploty pro optimální růst mycelia *F. oxysporum* f.sp. *glycines*, konkrétně 22 - 28 °C, studie dále uvádí zastavování růstu při teplotách nad 35 °C.

Na základě výsledků experimentů v *in vitro* byly navrženy teplotní pokusné varianty pro experiment s hodnocením stupně napadení rostlin v infikovaném substrátu (Foc rasa 1) v podmínkách s definovanými teplotami. Absence či jen minimální příznaky u citlivých odrůd ve variantách 16/18 °C a 19/21 °C odpovídají nižší intenzitě růstu patogena v *in vitro* podmínkách. Výskyt minimálních příznaků na rostlinách za nižších teplot se shoduje s výsledky studií Larkin & Fravel (2002); Landa et al. (2006), nicméně autoři upozorňují, že infekce byla pouze latentní. Symptomy infekce se projevily pouze na nejstarších listech a to střídáním vizuální symptomatické fáze s asymptomatickou fází, listy opadly a rostlina byla opět bez příznaků. Dočasné symptomy infekce na rostlinách vymizí (opad listu), infekce však v rostlinách

přetrvává latentně, což bylo potvrzeno pomocí PCR analýzy (Obrázek 4). Přítomnost patogena i stálá patogenita infikovaných rostlin se také potvrdila přemístěním (po vyhodnocení) do vyšších teplot, kdy většina rostlin citlivých odrůd během cca 10 dní uhynula.

Přítomnost patogena v pletivech rostlin byla prokázána v kořenech či kořenovém krčku, v nadzemních částech rostlin byla přítomnost patogena sporadická a v listech byla analýza vždy negativní, což mohlo být způsobeno juvenilní fází rostlin – cca 6 - 8 pravých listů (Epstein et al. 2017).

Varianty citlivých odrůd s vyššími teplotami 22/24 °C a 26/28 °C, jednoznačně potvrdily teplomilnost patogena, který je znám převážně v teplomilných oblastech, kde patogen způsobuje největší ztráty, např. Austrálie a Itálie (Garibaldi et al, 2006; Kochman, 2007). Podobné výsledky infekce formae specialis *F. oxysporum* za vyšších teplot, konkrétně 23/32 °C udává Scott et al. 2010 a 27 °C (Larkin & Fravel 2002; Landa et al. 2006).

Rozdíl 3 °C se ukázal jako velmi rozdílový u odrůdy 'Pourovo pozdní', varianta 19/21 °C s minimálními příznaky a odumřelými rostlinami se průkazně lišila s variantou 22/24 °C, kdy většina rostlin uhynula, podobný rozdíl 3 °C udává také Hibar et al. (2006).

U odolné odrůdy dochází za vysokých teplot (26/28 °C) k většímu výskytu symptomů oproti pěstování za nižších teplot, jak ukázala analýza PCR, některé rostliny byly pozitivní na přítomnost Foc, odrůda je zřejmě pouze tolerantní a potvrzuje fakt, že za určitých podmínek (zejména vysoké teploty) může být rezistence proti formae specialis z části překonána (Landa et al. 2006).

Citlivé odrůdy za nižších teplot (16/18 a 19/21 °C) vykazovaly podobnou intenzitu napadení jako odolná odrůda ('Target') za vyšších teplot (26/28 °C). Úhyn několika rostlin u odolné odrůdy byl způsobem infekcí Foc, což bylo potvrzeno pomocí PCR analýzy, kdy byl patogen přítomen v pletivech.

Náchylnost rostlin k infekci patogenem za vyšších teplot je jistě z jedné strany dána podmínkami vhodnými pro růst patogena ale zároveň dané podmínky jako je vyšší teplota a s tím související možný přísušek jsou stresující pro rostliny, čímž se odolnost k patogenům obecně snižuje. Vyšší teploty nejsou ani fyziologicky vhodné pro zeleniny z čeledi *Brassicaceae*, například optimum pro hlávkové zelí je přibližně 20 °C (Rosa & Rodrigues 1998; Wszelaki & Kleinhenz 2009). Nejnižší úroveň napadení odolné odrůdy ve variantě 19/21 °C může být způsobena zvýšenou odolností rostlin za teplotních podmínek optimální pro růst. Podobné teploty platí i pro hospodářky významnou řepku a hořčici, kdy optimální teplota růstu, kvetení a tvorby semen je okolo 20 °C, za vyšších teplot mohou mít rostliny problémy s kvetením a semena jsou horší kvality než při zrání za teplot okolo 20 °C (Morrison 1989;

Yaniv 1995; Angadi 2000). Je patrné, že vyšší teploty nejsou vhodné pro hostitelské rostliny patogena *Foc*, neboť se zvyšuje stres kvůli vysokým teplotám a stávají se tím méně odolné vůči patogenu a tím se umocňuje tlak patogena a infekce je tak snazší.

Na základě těchto skutečností se doporučuje náchylné odrůdy pěstovat při nižších teplotách na počátku či konci vegetace (Scott et al. 2010). Například Landa et al. (2006) doporučuje vysévat/vysazovat cizrnu (Izrael) v dřívějších termínech, kdy při výsadbě v lednu byl výskyt infikovaných a uhynulých rostlin menší oproti únorovému termínu. Stejně důležité je v praxi rozlišovat tolerantní a rezistentní odrůdy, kdy může být rezistence částečně překonána a rostlina se stává možným zdrojem nákazy.

6.2 Vliv pH na intenzitu růstu *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans*

Hodnoty pH ovlivňují rychlost růstu mycelia *Fusarium oxysporum* (Jahuar & Prasad 2011; Tyagy & Paudel 2014). Avšak v literatuře existují informace vlivu hodnot pH na růst především o druhu *F. oxysporum* jako takovém se velmi liší a specifikace pro jednotlivé formae specialis jsou velmi nedostatečné.

Thomson et al. (1992) udávají schopnost druhů rodu *Fusarium* (včetně *F. oxysporum*) růst v podmínkách pH v rozmezí 4 - 10 (4,6,8 a 10) s výjimkou druhu *Fusarium graminearum*, podle výsledků studie roste druh *F. oxysporum* nejlépe při hodnotách 6 a 8 pH, naopak se snižujícím se pH (4) se růst zpomaluje, toto tvrzení potvrzují naše výsledky u *F. oxysporum* f.sp. *conglutinans*. Patogen je schopen stabilně růst v rozmezí 5,5 - 10 pH (Yamamoto et al. 1985), s těmito hodnotami, lze podle našich výsledků souhlasit.

Z grafů (4 a 5) je patrné, že nejlépe a rovnoměrně narůstalo mycelium při pH 6 - 9, to potvrzuje i studie Jaruhar & Prasad (2011), která je zaměřená na *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis*. Hodnotu pH 6,5 udávají jako optimální Tyagy & Paudel (2014) při pokusech s *F. oxysporum* způsobující vadnutí rajčat, Cha et al. (2007) udávají jako optimální hodnotu pH 7 pro růst mycelia *Fusarium oxysporum* izolovaného z papriky. Oproti tomu Frans et al. (2017) uvádí

u stejného druhu škodící na paprikách optimální hodnoty pro růst hodnoty 4 - 7 pH, což jsou pouze částečně shodné hodnoty s našimi výsledky s *Foc*, autoři dále uvádějí snížení růstu o 50 % při hodnotě pH 3 a lepší snášení spíše alkalických hodnot pH než kyselých, což potvrzují výsledky našeho experimentu. Pro patogena *F. oxysporum* f.sp. *capsici* je rozpětí růstu mezi 4 - 9 pH a jako optimum pro růst hodnotu pH 7, následovanou pH 6 (Attri et al. 2018), což jsou obdobné nároky jako *Foc*.

Jako nejvhodnější pro růst *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* udávají Farooq et al. (2005) hodnoty 6 - 7 pH, tyto hodnoty jsou podobné s nároky Foc. Podobné výsledky publikovali také Nagao & Hattori (1983), kteří optimální hodnotu pH pro tvorbu hyf *Fusarium oxysporum* f.sp. *raphanii* uvádějí 6,5 a 7 pH. Mohsen et al. (2016) uvádějí u druhu *F. oxysporum* hodnotu pH 7,5 jako optimální pro růst mycelia, to se shoduje s výsledky experimentu. Dále je uváděn dobrý růst při hodnotách pH 5,5 a 6,5 a o polovinu nižší intenzitu růstu mycelia při hodnotě pH 4,5.

Mycelium *Fusarium oxysporum* f.sp. *glycines* narůstalo s rozdílnou intenzitou při všech hodnotách, to potvrzuje i studie Gheorghe et al. (2015), ten dále uvádí zhoršení růstu mycelia *F. oxysporum* při hodnotách větších než pH 7, což neodpovídá výsledkům našeho experimentu, kdy Foc rostlo velmi dobře i při hodnotách pH 8 a 9, tento rozdíl mohl být způsoben jiným kmenem. Rathore et al. (2015) udávají u *Fusarium oxysporum* f.sp. *cumini* hodnotu pH 8 jako optimální pro růst mycelia, což se shoduje s našimi výsledky pouze částečně. Gupta et al. (2010) u *Fusarium oxysporum* f.sp. *solanii* uvádějí jako optimální hodnotu pH 5,5, tato hodnota pH se liší od pH, kdy Foc nejintenzivněji narůstalo. *Fusarium oxysporum* podle Yamamoto et al. (1985) roste nejlépe při hodnotách pH 4,5 - 6, uváděné hodnoty jsou odlišné od našich výsledků (pH 6 - 9).

Z výsledků je zřejmé, že obě rasy reagují velmi podobně na rozdílné podmínky pH, shodně reagovali za nižší hodnoty pH (4 a 5), ale také na vyšší hodnoty pH (8 a 9).

Rasy se nelišily v reakci na hodnoty pH, ale byly průkazné rozdíly v rychlosti růstu mycelia za stejných podmínek pH, toto zjištění by mohlo odpovídat větší tvorbě konidií a agresivnějšímu růstu rasy 2 (Li et al. 2015), rozdílnost agresivity ras je možné pozorovat i u jiných formae speciales (Zhou & Everts 2003; Perchepied & Pitrat 2004).

Patogen svým růstem okyseloval pěstební médium, což se neshoduje s výsledky studie da Rosa-Garzon et al. (2017), kde v tekutém mediu docházelo spíše k mírné alkalizaci pěstebního media. Rozdílné výsledky (alkalizaci) je možné vysvětlit rozdílným médiem, da Rosa-Garzon et al. (2017) použili médium (oproti námi použitému mediu) s malou dostupností uhlíku (bez přidání glukózy a sacharózy), což zřejmě vedlo k alkalizaci prostředí (Bi et al. 2016). Velikost změny pH závisí na dostupnosti živin (Vylkova 2017), lze předpokládat, že v případě dostatku uhlíku (naše médium) ve formě základních cukrů dochází k opačnému efektu, tedy okyselování a tvorbě organických kyselin, které mění pH prostředí (da Rosa-Garzon et al. 2017).

Druh *Fusarium oxysporum* produkuje konkrétně kyselinu fusariovou, která okyseluje prostředí a pletiva hostitele (Vylkova 2017), tento fakt odpovídá okyselování media při kultivaci *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans*.

Samotné rozdíly oproti původní hodnotě je možné dát do souvislosti s intenzitou růstu, která byla vyšší při neutrálním až alkalickém mediu, zdá se, že patogen využívá vyšší hodnoty pH k rychlejšímu růstu a intenzivnějšímu okyselování (čím vyšší bylo pH tím víc bylo médium okyseleno).

6.3 Interakce mezi potenciálně antagonistickými mikroorganismy a *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans*

Jednou z možných metod ochrany proti fusariovému vadnutí je biologická ochrana, která představuje introdukci a cílené podporování antagonistických půdních hub a bakterií. Jedná se o regulaci patogena bez pozdějšího lidského zásahu. Za potenciální mikroorganismy využitelné v biologické ochrany zeleniny se uvádějí bakterie rodu: *Bacillus* a *Pseudomonas*, z hub: *Trichoderma* sp., *Pythium oligandrum* a nepatogenní kmeny druhu *Fusarium oxysporum* (El-Katatny et al. 2006; Ajilogba et al. 2013).

V případě *Bacillus amyloliquifascient*, *Trichoderma harzianum*, *T. hamatum*, *T. asperellum*, *Pythium oligandrum* a nepatogenního kmene *Fusarium oxysporum* se naše výsledky shodují s údaji uváděnými autory Fravel et al. (2003), El-Katatny et al. (2006), Vitullo et al. (2011) a Ajilogba et al. (2013), kteří uvedené druhy považují za schopné inhibovat původce fusariového vadnutí.

Při použití bakterie *Bacillus amyloliquifascient* a nepatogenního kmene *Fusarium oxysporum* došlo k vytvoření inhibiční zóny. Mycelium druhů r. *Trichoderma* a *Pythium oligandrum* velmi rychle přerůstalo mycelium patogena, z důvodu vyšší intenzity růstu, a proto došlo k potlačení mnohem rychleji než u výše zmíněných dvou druhů.

Naopak naše výsledky s *Bacillus subtilis*, který Myresiotis et al. (2011) a Ajilogba et al. (2013) uvádějí jako druh inhibující *Fusarium oxysporum*, jejich zjištění nepotvrzují. V počáteční fázi experimentu se mezi *B. subtilis* a Foc nejprve vytvářela inhibiční zóna, ale v druhé polovině experimentu Foc kolonii *B. subtilis* přerostl.

Lakshmidēvi et al. (2015) uvádějí *Pseudomonas fluorescens* jako bakterii inhibující druh *Fusarium oxysporum*. Získané výsledky jsou v rozporu s tímto tvrzením, protože bakterie *Pseudomonas fluorescens* pouze zpomalila počáteční růst mycelia patogena, který následně

bakterii přerostl. Při testování antagonistických mikroorganismů proti patogenům velmi záleží na použití kmene, protože účinnost jednotlivých kmenů se může výrazně lišit.

6.4 Ošetření osiva pomocí *Trichoderma asperellum*

V duálních testech *T. asperellum* potvrdilo, že se nijak neodlišuje svým rychlým a agresivním růstem od ostatních testovaných druhů rodu *Trichoderma* používaných jako biologická ochrana (Ghazalibiglar et al. 2016). *T. asperellum* v duálních testech proti *Foc* silně inhibovalo patogena, což odpovídá testům s *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (El-Komy et al. 2015). Silnou inhibiční aktivitu vykazovalo *T. asperellum* i proti *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (Saravanakumar et al. 2016). Inhibiční aktiva byla v duálních testech vykazována také proti *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Otadoh et al. 2011). Inhibiční aktivitu prokázala *T. asperellum* v *in vitro* proti *Fusarium oxysporum* způsobující vadnutí brambor (Omati & Zaker 2012) nebo proti *Fusarium oxysporum* f.sp *lentis* (Akrami et al. 2011).

Ochrana rostlina u *T. asperellum* spočívá v přímém parazitismu hyf patogena (Akrami et al. 2011) a dále silnou kumulací železa a tvorbou siderofor a tím eliminací *Fusarium oxysporum* (Segeera et al. 2009; Borrero et al. 2011). Fusariové vadnutí u brambor bylo pomocí *T. asperellum* sníženo na pouhé 2,5 % (Ommati & Zaker 2012). Účinná je také aplikace *T. asperellum* do sterilizovaného substrátu (kompost a rašelina), který byl poté infikován *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, došlo ke snížení infikovaných rostlin z 90 % (kontrola) na 5 - 13% (Cotxarrera et al. 2002). Podobná účinnost (79 %) je uváděna proti *F. oxysporum* Akrami et al. (2013), v těchto případech došlo k mnohem razantnějšímu snížení infekce oproti našemu experimentu. Rozdíl je způsoben nejspíše rozdílným kmenem oproti našemu experimentu.

Při ošetření osiva čočky pomocí *T. asperellum* proti *F. oxysporum* došlo ke snížení výskytu vadnutí na 42 %, to je podobná úroveň inhibice vadnutí jako v našem experimentu, autoři zároveň zmiňují proměnlivou účinnost u druhu *T. asperellum* proti *F. oxysporum* (Ślusarsk & Pietr 2009)

Rozdílnou závažnost výskytu fusariového vadnutí v jednotlivých variantách experimentu, lze odůvodnit rozdílnou koncentrací spor *T. asperellum* v inokulu, ve kterém bylo máčeno osivo, snížení závažnosti fusariového vadnutí odpovídá vyššímu počtu spor v inokulu, to potvrzuje Adebessin et al. (2009).

Ošetření osiva pomocí *T. asperellum* dokáže snížit výskyt fusariového vadnutí na zelí. Rozdílnou účinnost je možné vysvětlit odlišnými kmeny *T. asperellum* a odlišnou vstupní koncentrací spor v inokulu, kde vyšší koncentrace spor v inokulu má větší inhibiční potenciál.

6.5 Ošetření ozónem

Vystavení patogena působení ozónu způsobuje určitou inhibici jeho růstu či jeho uhynutí, včetně spor (Al-Ahmadi et al. 2009; Zhou et al. 2009; Tamaki et al. 2018.). Autoři se shodují na inhibici a eliminaci patogena *F. oxysporum* (mycelia i spór) pomocí ozónu. Při ošetření infikovaného osiva ozónem dochází k poškození buněčných stěn spor patogena (Tamaki et al. 2018). Z toho důvodu zřejmě došlo ke snížení počtu uhynulých rostlin v našem experimentu v případě variant 30 a 60 minut. Podle Zhou et al. (2009) se úspěšnost inhibice patogena zvyšuje s dobou působení ozónu, kdy vystavení ozónu po dobu 120 minut způsobuje 90 % inhibici mycelia *F. oxysporum*, tuto dobu působení ozónu uvádí Al-Ahmadi et al. (2009) už jako letální pro *F. oxysporum*.

Ošetřování prostředí či rostlin ozónem je doporučováno pro desinfekci proti patogenům, včetně *Fusarium oxysporum*. Působení ozónu a jeho inhibiční vliv na *Fusarium oxysporum*, potvrzuje i studie Manning et al. (1971), kteří ošetřovali již vzrostlé sazenice zelí, dále u ozónu neuvádí negativní vliv na růst rostlin zelí. K inhibici patogena *F. oxysporum* pomocí ozónu došlo také u rostlin čínského zelí (Ebihara et al. 2011). Autoři, ale dále uvádí negativní vliv na rostliny čínského zelí, kdy došlo nejen k eliminaci patogena, ale také ke snížení růstu rostlin o 24 %. Ozón bude mít tedy rozdílné inhibiční dopady na odlišné druhy rostlin, zřejmě i odrůdy, hlávkové zelí bude méně citlivé na působení ozónu nežli čínské zelí.

V případě ošetřování osiva dochází ke snížení přítomnosti osivem přenosných patogenů například také u hrachu (Ciccarese et al. 2007). Studie uvádí jako účinnou dobu ošetření osiva hrachu 3 minuty. Po vysetí semen na PDA médium nebyla prokázána přítomnost rozličných chorob (*Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizoctonia* sp. atd.) včetně *Fusarium* sp. Ošetření nemělo vliv ani na klíčivost hrachu, které se pohybovalo přes 90 % a to u osiva ošetřeného i neošetřeného ozónem. Minimální nebo žádný vliv ozónu na klíčivost osiva uvádí i studie Violleau et al. (2007), při ošetřování ozónem osiva kukuřice nebyl negativní rozdíl v klíčivosti a životnosti oproti neošetřenému osivu, naopak autoři dodávají, že krátkodobé vystavení semen ozónu zlepšuje jeho klíčivost.

Autoři se již ale neshodnou ohledně koncentrace ozónu v prostředí, kdy jsou v publikacích uváděny nejen odlišné koncentrace, ale také jednotky, zejména miligramy (gramy) na objem,

tedy litry případně metry krychlové, případně jako ppm. Správná koncentrace se bude spíše lišit v závislosti na dané plodině, nežli formae specie patogena, výsledná koncentrace musí být ale dostatečně letální pro patogena, ovšem bez dopadu na zdravý vývoj rostlin.

Jako příklad lze uvést studii Nagendra-Prasad et al. (2009) zaměřenou na vynu čínskou a neúčinnější dávku 30 ppm O₃, tedy 30 mg O₃/l, Ebihara et al. (2011) udávají potřebnou dávku 20 g O₃/m³ k silné inhibici *F. oxysporum* napadající čínské zelí, zatímco Al-Ahmadi et al. (2009) udávají mnohem menší koncentraci, a to 8 ppm, která byla účinná proti *F. oxysporum* způsobující vadnutí datlí. Lze tedy předpokládat, že v případě použití větší koncentrace než byla koncentrace v našich experimentech (2 mg O₃/l), by došlo k větší inhibici *Foc*.

7 Závěr

Z výsledků provedených experimentů a analýz zpracovaných v předkládané práci lze vyvodit následující závěry:

7.1 Teplota

- Byla prokázána teplomilnost patogena *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans*, jehož intenzita růstu mycelia v *in vitro* podmínkách byla nejvyšší ve variantách 24 a 28 °C, naopak ve variantě 15 °C byl růst mnohem méně intenzivní a při variantě 37 °C patogen nerostl vůbec.
- Největší počet uhynulých rostlin byl ve variantách s vyšší teplotou (22/24 °C a 26/28 °C) a rozdíl mezi variantami byl pouze v rychlosti uhynutí rostlin.
- Byly zjištěny latentní příznaky infekce za nižších teplot, kdy rostliny jsou zdánlivě zdravé, ale patogen je přítomen v pletivech a rostliny mohou být potenciálním zdrojem nákazy.
- Přítomnost patogena v pletivu byla prokázána pomocí PCR pouze v kořenech, kořenovém krčku a části stonku, nikoli však v listech, na kterých se objevují první vizuální symptomy infekce.
- Analýza PCR ukázala, že rezistence vůči patogenu (odrůda 'Target') může být za vyšších teplot překonána a rostlina se stává pouze tolerantní s latentními příznaky a stává se potenciálním zdrojem nákazy, podobně jako citlivé odrůdy za nižších teplot.
- Citlivé odrůdy je vhodné pěstovat za nižších teplot (jaro, podzim) a tím se vyhnout vyššímu infekčnímu tlaku patogena. Ovšem je nutno přihlídnout k citlivosti odrůd na jarovizaci a mít na vědomí, že asymptomatické rostliny citlivých odrůd s latentní infekcí mohou být potenciálním zdrojem nákazy.
- Bylo by vhodné, aby výzkum v budoucnu studoval princip ztráty rezistence a šlechtění nových plně rezistentních odrůd.
- Výzkum by se mohl zaměřit na studium reakce rostlin na přítomnost patogena v cévních svazcích na buněčné úrovni s využitím moderních vizualizačních metod, jako je např. konfokální mikroskopie.

7.2 pH

- Byl prokázán vliv hodnoty pH na intenzitu růstu mycelia patogena, který nejintenzivněji rostl v rozmezí hodnot pH 6 - 9.
- Byla prokázána závislost intenzity růstu mycelia na hodnotě pH.
- Bylo zjištěno, že patogen svou činností okyseluje médium. Čím vyšší byla původní hodnota pH media (8 a 9), tím bylo médium více okyseleno.
- Zmíněné poznatky týkající se inhibice Foc v kyselějších podmínkách jsou však problematicky uplatnitelné v praxi, protože většině kulturních plodin vyhovuje podobné pH, tedy mírně kyselé až neutrální (6 - 7 pH), košťálové zelenině dokonce neutrální až mírně zásadité.

7.3 Antagonistické mikroorganismy

- Bylo prokázáno, že druhy *Trichoderma harzinaum*, *T. asperellum* a *T. hamatum*, *Pythium oligandrum*, nepatogenní kmen *Fusarium oxysporum* a *Bacillus amyloliquifascient* inhibují růst patogena *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans*
- Bylo prokázáno snížení výskytu fusariového vadnutí při ošetření osiva pomocí *Trichoderma asperellum*.
- Výzkum by se v této oblasti mohl zaměřit na využití biologické ochrany proti fusariovému vadnutí vhodnou kombinací mikroorganismů, případně vhodnou kombinací vybraných kmenů téhož druhu.
- Budoucí výzkum by mohl studovat či izolovat účinné látky produkované mikroorganismy a dále je testovat pro využití v praxi při ochraně rostlin.

7.4 Ozón

- Bylo prokázáno, že ozón má inhibiční účinek na *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans*, je však nutné zajistit, aby použitá koncentrace ozónu měla kurativní efekt, ale současně nepoškodila vitalitu osiva
- Budoucí výzkum by se mohl zaměřit na hledání optimálního poměru mezi eliminací patogena a prahem škodlivosti účinku ozónu u osiva brukvovité zeleniny.

8 Seznam použité literatury

Adebesin AA, Odebode ACh, Ayodele MA. 2009. Control of postharvest rots of banana fruits by conidia and culture filtrates of *Trichoderma asperellum*. Journal of plant protection research **49**: 302 – 308.

Ackermann P, Kazda J. 2014. Metodika ochrany zahradních rostlin pro zahradníky a zahrádkáře. Český zahrádkářský svaz.

Agarwal DK, Sarboy AK. 1978. Physiological studies on four species of *Fusarium* pathogenic to soyabean. Indian Phytopathology **31**: 24-31.

AgroFlora. 2014. Фузариозное увядание капусты. AgroFlora.ru. Available from <https://agroflora.ru/fuzarioznoe-uvyadanie-kapusty/> (accessed May 2019).

Aïcha B, Nisserine H, Abdeslem MS, Hadjira B, Lalia SB, Mebrouk K, Jamel-Eddine H. 2014. Antagonist effect of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 on *Fusarium oxysporum* f. sp. radicis-lycopersici the cause of fusarium crown and root rot in tomato cultivation. Adv. Environ. Biol **8**: 50-56.

Aimé S, Alabouvette C, Steinberg C, Olivian C. 2013. The Endophytic Strain *Fusarium oxysporum* Fo47: A Good Candidate for Priming the Defense Responses in Tomato Roots. Molecular Plant-Microbe Interactions **26**: 918-926.

Ajilogba FC, Babalola OO, Ahmad F. 2013. Antagonistic Effects of *Bacillus* Species in Biocontrol of Tomato *Fusarium* Wilt. Studies on Ethno-Medicine **7**: 205-216.

Akköprü A, Demir S. 2005 Biological Control of Fusarium Wilt in Tomato Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici by AMF *Glomus intraradices* and some Rhizobacteria. J. Phytopathology **153**: 544-550.

Akrami M, Golzary H, Ahmadzadeh. 2011. Evaluation of different combinations of *Trichoderma* species for controlling Fusarium rot of lentil. African Journal of Biotechnology **14**: 2653-2658.

Al-Ahmadi SS, Ibrahim AR, Ouf AS. 2009. Possible control of fungal and insect infestation of date fruits using ozone. Biosciences, Biotechnology Research Asia **6**: 17-28.

Alwathnani AH, Perveen K. 2012. Biological control of *fusarium* wilt of tomato by antagonist fungi and cyanobacteria. African Journal of Biotechnology **11**: 1100-1105.

Armstrong GM, Armstrong JK. 1952. Physiological races of the fusaria causing wilts of the Cruciferae. Phytopathology **42**: 255-257.

Angadi VS, Cutforth WH, Miller RP, McConkey GB, Entz HM, Brandt AS, Volkmar MK. 2000. Response of three Brassica species to high temperature stress during reproductive growth. Canadian journal of plant science **80**: 693–701

Atawodi ES, Atawodi CJ, Dzikwi AA. 2010. Polymerase chain reaction: theory, practice and application: a review. Sahel Medical Journal **13**: 54-63.

Attri K, Sharma M, Gupta KS. 2018. Influence of Edaphic Factors on Fusarium wilt of Bell Pepper. International Journal of Bio-resource and Stress Management **9** : 606-610.

Arya N, Kuwatsuka S. 1993. Possible mechanism of suppression of the growth of *fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* by nitrate in soil. Soil science and Plant nutrition **39**: 409-416.

Baysal Ö, Caliskan M, Yesilova Ö. (2008). An inhibitory effect of a new *Bacillus subtilis* strain (EU07) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Physiological and Molecular Plant Pathology **73**: 25–32.

Benhamou N, Rey P, Chérif M, Hockenhull J, Tirilly Y. 1996. Treatment with the Mycoparasite *Pythium oligandrum* triggers Induction of defense-Related Reactions in Tomato roots when Challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology* **87**: 108-122.

Benhamou N, le Floch G, Vallance J, Gerbore J, Grizard D, Rey P. 2012. *Pythium oligandrum*: an example of opportunistic success. *Microbiology* **158**: 2679–2694.

Benhamou N, Bélanger R R, Rey P, Tirilly Y. 2001. Oligandrin, the elicitor-like protein produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum*, induces systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants. *Plant Physiol. Biochem* **39**: 681–698.

Bolwerk A, Lagopodi LA, Lugtenberg JJ, Bloemberg VG. 2005. Visualization of Interactions Between a Pathogenic and a Beneficial *Fusarium* Strain During Biocontrol of Tomato Foot and Root Rot. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**: 710–721.

Bosland PW, Williams PH. 1984. A new pathotype of the crucifer yellows organism capable of causing disease in cool soils. *Cruciferae Newsletter* **9**: 95.

Bouma D. 2019. Lepší diagnostika přímo na poli. *Zemědělec* **27**: 17-18.

Bratsch A. 2009. Specialty crop profile: Horseradish. Virginia state university. Available from <https://www.pubs.ext.vt.edu/438/438-104/438-104.html> (accessed October 2019).

Brožová J. 2002. Exploitation of the mycoparasitic fungus *Pythium oligandrum* in plant protection. *Plant Protection Science* **38**: 29-35.

Buchtová I. 2018. Situační a výhledová zpráva zelenina. Ministerstvo zemědělství. Praha.

Cao Y, Zhang Z, Ling N, Yuan Y, Zheng X, Shen B, Shen Q. 2011. *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots. *Biol Fertil Soils* **47**: 495–506.

Cao Y, Xu Z, Ling N, Yuan Y, Yang X, Chen L, Shen B, Shen Q. 2012. Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing Fusarium wilt of cucumber. *Scientia Horticulturae* **135**: 32-39.

Ciccarese F, Sasanelli N, Ciccarese A, Ziadi T, Ambrico A, Mancini L. 2007. Seed disinfestation by ozone treatments. IOA Conference and Exhibition Valencia. Valencia Spain.

Cotxarrera L, Trillas-Gay IM, Steinberg C, Alabouvette C. 2002. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress Fusarium wilt of tomato. *Soil Biology & Biochemistry* **34**: 467-476.

de Boer M, Bom P, Kindt F, Keurentjes BJJ, van der Sluis I, van Loon CL, Bakker MHAP. 2003. Control of Fusarium Wilt of Radish by Combining *Pseudomonas putida* Strains that have Different Disease-Suppressive Mechanisms. *Phytopathology* **93**: 626-632.

de Weert S, Kuiper I, Legendijk LE, Lamers MEG, Lugtenberg JJB. 2003. Role of Chemotaxis Toward Fusaric Acid in Colonization of Hyphae of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Molecular plant-microbe interactions* **16**: 1185-1191.

Di Petro A, Madrid PM, Caracuel Z, Delgado-Jarana J, Roncero GIM. 2003. Fusarium oxysporum: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular plant pathology* **4**: 215-325.

Drost D, Johson M. 2010. Home gardening. Utah State University. Available from <https://pdfs.semanticscholar.org/414e/eb42c309cf022671103f20c7a138a87beec4.pdf> (accessed October 2019).

Duijff JB, Pouhair D, Olivain Ch, Alabouvette C, Lemanceau P. 1998. Implication of systemic induced resistance in the suppression of fusarium wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r and by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *European Journal of Plant Pathology* **104**: 903–910.

Dzhalilov SF, Ha NTV. 2014. Cabbage diseases control in field. Potato and vegetables **54**: 20–23.

Ebihara K, Stryczewska H, Ikegami T, Mitsugi F, Pawlat J. 2011. On-site ozone treatment for agricultural soil and related applications. Przegląd Elektrotechniczny **87**: 148-152.

El-Katatny MH, Abdelzaher HMA, Shoukamy MA. 2006. Antagonistic actions of *Pythium oligandrum* and *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi (*Fusarium oxysporum* and *Pythium ultimum* var. *ultimum*). Archives of Phytopathology and Plant Protection **39**: 289-301.

El-Komy HM, Saleh AA, Eranthodi A, Molan YY. 2015. Characterization of Novel *Trichoderma asperellum* Isolates to Select Effective Biocontrol Agents Against Tomato Fusarium Wilt. Plant Pathology Journal **31**: 50-60.

Elmer HW. 2004. Combining nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum* with sodium chloride to suppress fusarium crown rot of asparagus in replanted fields. Plant Pathology **53**: 751-758.

Farkya S, Pandey AK, Rajak RS. 1996. Mycoherbicides potential of *Fusarium* spp. against *Parthenium*: Factors affecting *in vitro* growth and sporulation. Bioved **7**: 1–9.

Farooq S, Iqbal MS, Rauf ACA. 2005. Physiological Studies of *Fusarium oxysporum* F. Sp. *Ciceri*. International journal of agriculture & biology **7**: 275-277.

Fayzalla AE, Shabana MY, Mahmoud SN. 2008. Effect of environmental conditions on wilting and root rot fungi pathogenic to solanaceous plants. Plant pathology journal **7**: 27-33.

Flood J. 2006. A Review of Fusarium Wilt of Oil Palm Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis*. Phytopatology **96**: 660-662.

Fovo DJ, Dostaler D, Bernier L. 2017. Influence of Culture Media and Temperature on Growth and Sporulation of *Lasioidiplodia theobromae*, *Pestalotiopsis microspora* and *Fusarium oxysporum* Isolated from *Ricinodendron heudelotii* in Cameroon. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences **6**: 3098-3112.

Frans M, Aerts R, Van Laethem S, Ceusters J. 2017. Environmental effects on growth and sporulation of *Fusarium* spp. causing internal fruit rot in bell pepper **149**: 875-883.

Fravel D, Olivain C, Alabouvette C. 2002. Research review *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist* **157**: 493-502

Fravel RD, Stosz KS, Larkin P R. 1995. Effect of temperature, soil type, and matric potential on proliferation and survival of *Fusarium oxysporum* f.so. *erythroxyli* from *Erythroxylum coca*. *Phytopathology* **86**: 236-240.

Gaetán AS. 2005. Occurrence of Fusarium Wilt on Canola Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* in Argentina. *Plant disease* **89**: 432.

Garibaldi A, Gilardi G, Gullino LM. 2006. Evidence for an expanded host range of *Fusarium oxysporum* f.sp.*raphani*. *Phytoparasitica* **36**: 115-121.

Gerbore J, Benhamou N, Vallance J, le Floch G, Grizard D, Regnault-Roger C, Rey P. 2014. Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. *Environ Sci Pollut Res* **21**: 4847–4860

Ghazalibiglar H, Kandula DRW, Hampton JG. 2016. Biological control of fusarium wilt of tomato by *Trichoderma* isolates. *New Zealand Plant Protection* **69**: 57-63.

Gheorghe AB, Stelica C, Relu CZ, Maria O. 2015. The biological growth parameters of the *Fusarium oxysporum* f. sp. *glycines* fungus. *Romanian biotechnological letters* **20**: 10 921-10 928.

Gupta KV, Misra KA, Gaur KR. 2010. Growth characteristics of fusarium spp. causing wilt disease in psidium guajava l. in India. *Journal of plant protection research* **50**: 452-462.

Hassan AAM, Wafaa MH. 2006. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. *Brazilian Journal of Microbiology* **37**: 181-191.

He YC, Hsiang T, Wolyn JD. 2002. Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* inoculated with nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology* **51**: 225–230.

Hibar K, Daami-Remadi M, Jabnoun-Khiareddine H, El Mahjoub M. 2006. Temperature effect on mycelial growth and on disease incidence of *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* **5**: 233-238.

Cha A, Jeon Y, Ahn G, Han IJ, Han K, Kim HS. 2007. Characterization of *Fusarium oxysporum* Isolated from Paprika in Korea. *Mycobiology* **35**: 91-96.

Chen F, Wang M, Zheng Y, Luo J, Yang X, Wang X. 2010. Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* B579. *World Journal Microbiology Biotechnology* **26**: 675–684.

Chloupek O. 2008. Genetická diverzita, šlechtění a semenářství. Academia. Praha

Innocenti G, Roberti R, Piattoni F. 2015. Biocontrol ability of *Trichoderma harzianum* strain T22 against *Fusarium* wilt disease on water-stressed lettuce plants. *BioControl* **60**: 573–581.

Jaruhar BH, Prasad A. 2011. Effect of different ph levels on the growth and sporulation of *Fusarium oxysporum* schlecht. f. sp. *lentis* (vasudeva and srinivasan) the causal organism of wilt disease of lentil. *The Bioscan* **6**: 289-291.

Kamilova F, Lamers G, Lugtenberg B. 2008. Biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 inhibits germination of *Fusarium oxysporum* spores in tomato root exudate as well as subsequent formation of new spores. *Environmental Microbiology* **10**: 2455–2461.

Kistler CK, Bosland WP, Benny U, Leong S, Williams P. 1987. Relatedness of Strains of *Fusarium oxysporum* from Crucifers Measured by Examination of Mitochondrial and Ribosomal DNA. *Phytopathology* **77**:1289-1293.

Kistler CH. 1997. Genetic Diversity in the Plant-Pathogenic Fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* **87**: 474-479.

Kendrick JB. 1930. Kale yellows in California, caused by *Fusarium conglutinans* Wollenw. *Hilgardia* **5**: 1-15.

Kochman J. (2007): *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* Fusarium wilt of canola. Plant Health Australia. Available from <http://www.planthealthaustralia.com.au/pests/fusarium-wilt-of-canola/> (accessed December 2018).

Koike TS, Gladders P, Paulus OA. 2007. Vegetables diseases. Manson Publishing Ltd. London.

Koike ST, Cahn M, Cantwell M, Fennimore S, Le Strange M, Natwick E, Smith FR, Takele E. 2009. Cauliflower production in California. University of California. Available from <https://anrcatalog.ucanr.edu/pdf/7219.pdf> (accessed October 2019).

Kovaříková K. Kocourek F. 2017. Zápředníček polní - významný škůdce brukvovité zeleniny a řepky. Agromanuál. Available from: <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/skudci/zaprednicek-polni-vyznamny-skudce-brukvovite-zeleniny-a-repky> (accessed September 2019)

Laksmidevi P, Gopalakrishnan P, Karthikeyan G. 2015. In Vitro Evaluation of *Pseudomonas Fluorescens* Strains Against *Fusarium Oxysporum* f. sp. *Lycopersici* Causing Wilt Disease of Tomato. *International Journal of Tropical Agriculture* **33**: 3360-3365.

Landa BB, Navas-Cotés AJ, Jimenez-Gasco del MM, Katan J, Retig B, Jimenez-Díaz MR. 2006. Temperature response of chickpea cultivars to races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, causal agent of Fusarium wilt. *Plant Diseases* **90**: 365-374.

Lange RM, Gossmann M, Büttner C. 2007. Yield loss in susceptible cultivars of spring rapeseed due to Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum*. *Communications in agricultural and applied biological sciences* **72**: 723-734.

Larkin PR, Fravel RD. 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of Fusarium wilt of tomato. *Plant Disease* **82**: 1022-1028.

Larkin PR, Fravel RD. 1999. Mechanisms of Action and Dose-Response Relationships Governing Biological Control of Fusarium Wilt of Tomato by Nonpathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology* **89**: 1152-1161.

Larkin PR, Fravel RD. 2002. Effects of Varying Environmental Conditions on Biological Control of Fusarium Wilt of Tomato by Nonpathogenic *Fusarium* spp.. *Phytopathology* **92**:1160-1166.

Le Strange M, Cahn DM, Koike TS, Smith FR, Daugovish O, Fennimore AS, Natwick TE, Dara KS, Takele E, Cantwell IM. 2010. AgriFoodGateway. University of California. Available from <https://hortintl.cals.ncsu.edu/articles/broccoli-production-california> (accessed October 2019).

Leslie FJ, Summerell AB. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing.

Li B, Li Q, Xu Z, Zhang N, Shen Q, Zhang R. 2014. Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. *Frontiers in Microbiology* **5**: 1-10.

Li E, Ling J, Wang G, Xioa J, Yang Y, Mao Z, Wang X, Xie B. 2015. Comparative Proteomics Analyses of Two Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* that Differ in Pathogenicity. *Scientific Reports*. DOI:[10.1038/srep13663](https://doi.org/10.1038/srep13663)

Li L, Ma J, Li Y, Wang Z, Gao T, Wang Q. 2012. Screening and partial characterization of *Bacillus* with potential applications in biocontrol of cucumber Fusarium wilt. *Crop Protection* **35**: 29-35.

Liu X, Ling J, Xiao Z, Xie B, Fang Z, Yang L, Zhang Y, Lv H, Yang Y. 2017. Journal of phytopatology. Characterization of emerging populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* causing cabbage wilt in China **165**: 813-821.

Luhová L, Lebeda A, Kutrová E, Hedererová D, Peč P. 2006. Peroxidase, catalase, amine oxidase and acid phosphatase activities in *Pisum sativum* during infection with *Fusarium oxysporum* and *F. solani*. *Biologia Plantarum* **50**: 675-682.

Manning JW, Feder AW, Papia MP, Perkins I. 1971. Effect of low levels of ozone on growth and susceptibility of cabbage plants to *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*. *Plant disease* **55**: 47-49.

Manikandan R, Saravanakumar D, Rajendran L, Raguchander T, Samiyappan R. 2010. Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for its efficacy against *Fusarium* wilt of tomato. *Biological Control*. **54**: 83–89.

Malý I. 2003. Pěstujeme květák, zelí a další košťálové zeleniny. Grada publishing. Praha.

Malý I, Petříková K. 1998. Základy pěstování kořenové zeleniny. Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR v Praze. Praha.

Marzano M, Gallo A, Altomare C. 2013. Improvement of biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum* vs. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through UV-induced tolerance to fusaric acid. *Biological Control* **67**: 397–408.

Masabni J. 2014. Growing turnip and mustard greens. Texas A&M AgriLife Extension. Available from <https://agriflifeextension.tamu.edu/browse/featured-solutions/gardening-landscaping/turnip-and-mustard-greens/> (accessed October 2019).

Meenu G, Vikram A, Bharat N. (2013). Black rot- a devastating disease of crucifers: A Review. *Agricultural reviews* **34**: 269-278.

Mogensens MJ, Nielsen FK, Samson AR, Frisvad J, Thrane U. 2009. Effect of temperature and water activity on the production of fumonisins by *Aspergillus niger* and different *Fusarium* species. *BMC Microbiology* **9**: 281–292.

Mohsen YL, Al-Janabi AKJ, Jebor AM. 2016. The effect of some environmental conditions on the growth and activity of the external enzymes for five sp. of *Fusarium*. *Journal of Babylon University/Pure and Applied Sciences* **24**: 630-646

Morrison JM, McVetty PBE, Shaykewich CF. 1989. The determination and verification of a baseline temperature for the growth of Westar summer rape. *Canadian journal of plant science* **69**: 455–464.

Morsy ME, Abdel-Kawi AK, Khalil ANM. 2009. Efficiency of *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilis* as Biocontrol Agents against *Fusarium solani* on Tomato Plants. *Egypt Journal Phytopathology* **37**: 47-57.

Myresiotis Ch, Karaoglanidis SG, Vryzas Z, Papadopoulou-Mourkidou E. 2011. Evaluation of plant-growth-promoting rhizobacteria, acibenzolar-S-methyl and hymexazol for integrated control of *Fusarium* crown and root rot on tomato. *Pest management science* **68**: 404–411.

Nagao H, Hattori T. 1983. Chlamydospore formation in hyphae of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphanin*. *Journal gen applied microbiology* **29**: 187-193.

Navas-Cortéz AJ, Landa BB, Méndez-Rodríguez AM, Díaz-Jiménez MR. 2007. Quantitative modeling of the effects of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* races 0 and 5 on development of *Fusarium* wilt in chickpea cultivars. *Phytopathology* **97**:564-573.

Nagendra-Prasad D, Sudhakar N, Murugesan K, Mohan N. 2009. Application of ozone on induction of resistance in *Vigna unguiculata* cv. Co 6, against *Fusarium* wilt. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* **42**: 633-642.

New England vegetable management guide. Radish. University of Massachusetts Amherst. Available from <https://nevegetable.org/crops/radish> (accessed October 2019).

Novák J, Skalický M. 2012. *Botanika*. Powerprint. Praha.

Otadoh AJ, Okoth AS, Ochanda J, Kahindi PJ. 2011. Assessment of *Trichoderma* isolates for virulence efficacy on *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli*. Tropical and Subtropical Agroecosystems **13**: 99-107.

Özaktan H, Bora, T. 2000. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* by the formulations of fluorescent pseudomonads. Journal of Turkish Phytopathology **29**: 133-149.

Ozontech. Informace o ozonu a ozonizaci. Ozontech. Available from <https://www.ozontech.cz/cs/o-ozonu> (accessed December 2015).

Perchepped L, Pitrat P. 2004. Polygenic Inheritance of Partial Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* Race 1.2 in Melon. Phytopathology **94**: 1331-1336.

Petříková K, Hlušek J, Jánský J, Koudela M, Lošák T, Malý I, Pokluda R, Poláčková J, Rod J, Ryant P, Škarpa P. 2012. Zelenina, pěstování, výživa, ochrana a ekonomika. Profí Press. Praha.

Pokluda R. 2009. Pěstujeme zeleninu kapesní příručka pro zahrádkáře. TeMi CZ. Velké Bílovice.

Ramamoorthy V, Raguchander T, Samiyappan R. 2002. Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pf1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Plant and Soil **239**: 55-68.

Rathore SS, Saxena NS, Shurma KY, Mishra KB, Singh B. 2015. Effect of pH and salt levels on growth of *Fusarium oxysporum* f.sp.*cumini* isolate from cumin. International Journal of seed spices **5**: 100-101.

Rini RCA, Sulochana KK. 2007. Usefulness of *Trichoderma* and *Pseudomonas* against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* infecting tomato. Journal of Tropical Agriculture **45**: 21-28.

Rio DC, Ares JM, Hannom JG, Nilsen WT. 2011. RNA: A Laboratory Manual. CSHL Press. New York.

- Rod J. 2017. Choroby a škůdci na zahradě. Grada Publishing. Praha.
- Rosa SAE, Rodrigues FMP. 1998. The Effect of Light and Temperature on Glucosinolate Concentration in the Leaves and Roots of Cabbage Seedlings. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **78**: 208–212.
- Sahi YI, Khalid NA. 2007. In vitro biological control of *Fusarium oxysporum*- causing wilt in *Capsicum annuum*. *Mycopathology* **5**: 85-88.
- Sánchez AD, Viviana B, Graciela E, Cristina Sosa M. 2015. Biocontrol with *Trichoderma* spp. against *Fusarium oxysporum* causal of "damping off" in pre and post emergence in onion. *Revista de la Facultad de Agronomía* **114**: 61-70.
- Schmidt HR, Rodcrick EG. 2003. Food safety handbook. John Wiley & Sons publication. New Jersey.
- Scott CJ, Gordon RT, Shaw VD, Koike TS. (2010). Effect of Temperature on Severity of Fusarium Wilt of Lettuce Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. *Plant disease* **94**: 13-17.
- Shabani F, Kumar L, Esmaeili A. 2014. Future distributions of *Fusarium oxysporum* f. spp. in European, Middle Eastern and North African agricultural regions under climate change. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **197**: 96-105.
- Shishido M, Miwa C, Usami T, Amemiya Y, Johnson KB. 2005. Biological control efficiency of Fusarium wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo-B2 in different environments. *Phytopathology* **95**: 1072-1080.
- Silva JC, Bettiol W. 2005. Potential of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* isolates for control of Fusarium wilt of tomato. *Fytopatologia Brasileira* **30**: 409-412.
- Smith AH, Nino A, Webb ES. 2016. Insect Management for Crucifers (Cole Crops) (Broccoli, Cabbage, Cauliflower, Collards, Kale, Mustard, Radishes, Turnips). University of

Florida. Available from <https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IG/IG15000.pdf> (accessed October 2019).

Someya N, Tsuchiya K, Yoshida T, Tsujimoto-Noguchi M, Sawada H. 2007. Combined application of *Pseudomonas fluorescens* strain LRB3W1 with a low dosage of benomyl for control of cabbage yellows caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Conglutinans*. *Biocontrol Science and Technology* **17**: 21-31,

Somu R, Thammaiah N. 2015. Physiological studies of *fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causing panama wilt in banana. *The Bioscan* **10**: 1721-1724.

Srivastava R, Khalid A, Singh SU, Sharma KA. 2010. Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of tomato wilt. *Biological Control* **53**: 24–31.

Sundaramoorthy S, Balabaskar P. 2013. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* spp. against wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of Applied Biology & Biotechnology* **1**: 036-040.

Šlosár M. 2014. Okružhlica – zabudnutá zelenina. *Zahradnictví* **12**: 29.

Tamaki M, Kobayashi F, Ikeura H, Sato M. 2018. Disinfection by Ozone Microbubbles Can Cause Morphological Change of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* Spores. *Plant pathology journal* **34**: 335-340.

Tamietti G, Garibaldi A. 1978. Gravissime epifizie di Fusariosi vascolare (*Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*) su cavolo di bruxelles in Liguria. Istituto di Patologia vegetale Università degli studi di Torino.

Thomson PD, Metevia L, Vessel T. 1993. Influence of phi Alone and in Combination with Phenolic Antioxidants on Growth and Germination of Mycotoxigenic Species of *Fu sari urn* and *Penicillium*. *Journal of Food Protection* **56**: 134-137.

Tyagy S, Paudel R. 2014. Effect of different pH on the growth and sporulation of *Fusarium oxysporum*: The causal organism of wilt disease of Tomato. *International Journal of Basic and Applied Biology* **2**: 103-106.

University of Illinois. 1988. *Fusarium* yellows of cabbage and related crops. University of Illinois. Available from <https://ipm.illinois.edu/diseases/rpds/901.pdf> (accessed October 2019).

Validov S, Kamilova F, Qi S, Stephan D, Wang JJ, Makarova N, Lugtenberg B. 2006. Selection of bacteria able to control *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in stonewool substrate. *Journal of Applied Microbiology* **102**: 461-471.

Valkonen TPJ, Koponen H. 1990. The seed-borne fungi of Chinese cabbage (*Brassica pekinensis*), their pathogenicity and control. *Plant pathology* **39**: 510-516.

Valšíková M. 2019. Význam a pestovanie kapusty hlávkovej. *Zahradnictví* **17**: 20-23.

Verma M, Brar KS, Tyagi DR, Surampalli YR, Valéro RJ. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* **37**: 1-20.

Violleau F, Hadjeba K, Albet J, Cazalis R, Surel O. 2007. Increase of corn seeds germination by oxygen and ozone treatment. IOA Conference and Exhibition Valencia. Valencia Spain.

Vitullo D., Di Pietro A., Romano A., Lanzotti V., Lima G., (2012): Role of new bacterial surfactins in the antifungal interaction between *Bacillus amyloliquefaciens* and *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology* **61**: 689–699.

VŠÚO.2015-2016. Metodické listy OPVK: Diagnostické metody detekce patogenních organism. Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o. Holovousy. Available from http://www.vsuo.cz/common/cms_files_pr/files_to_download/A9_Diagnosticke_metody_detekce_patogennich_organismu.pdf (accessed October 2019).

Webb MK, Brenner T, Jacobsen JB. 2015. Temperature effects on the interactions of sugar beet with Fusarium yellows caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *betae*. Canadian Journal of Plant Pathology **37**: 353-362.

Wheeler AK, Hurdman FB, Pitt IJ. 1991. Influence of Ph on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. International journal of food microbiology **12**: 141-150.

Wong YM. 2003. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder and H.N. Hans. NC State university. Available from: https://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Fusarium/Fusarium_oxysporum.htm (accessed December 2015)

Wszelaki A, Kleinhenz DM. 2003. Yield and relationships among head traits in cabbage as influenced by planting date and cultivar. II. Processing. Hortscience **38**: 1355–1959.

Yaniv Z, Schafferman D, Zur M. 1995. The effect of temperature on oil quality and yield parameters of high- and low-erucic acid Cruciferae seeds (rape and mustard). Industrial crops and products **3**: 247–251.

Yang X, Chen L, Yong X, Shen Q. 2011. Formulations can affect rhizosphere colonization and biocontrol efficiency of *Trichoderma harzianum* SQR-T037 against Fusarium wilt of cucumbers. Biol Fertil Soils **47**: 239–248.

Yamamoto K, Tsuji Y, Kumagai H, Tochikura T. 1985. Induction and Purification of α -L-Fucosidase from *Fusarium oxysporum*. Agriculture and Biological Chemistry **50**: 1689-1695.

Yigit F, Dikilitas M. 2007. Control of Fusarium Wilt of Tomato by combination of *Fluorescens Pseudomonas*, Non-pathogen *Fusarium* and *Trichoderma harzianum* T-22 in greenhouse conditions. Plant Pathology Journal **6**: 159-163.

Yu X, Ai Ch, Zhou G. 2010. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on Fusarium wilt and promotes the growth of pepper. European Journal of Soil Biology **47**: 138-145.

Yuan J, Raza W, Shen Q, Huang Q. 2012. Antifungal Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 Volatile Compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Applied and Environmental Microbiology **78**: 5942–5944.

Zhao P, Quan Ch, Wang Y, Wang J, Fan S. 2012. *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*. Journal Basic Microbiology **54**: 448–456.

Zhao Q, Ran W, Wang H, Li X, Shen Q, Shen S, Xu Y. 2013. Biocontrol of Fusarium wilt disease in muskmelon with *Bacillus subtilis* Y-IVI. BioControl **58**: 283–292.

Zhang J, Ling J, Xie B, Yang Y. 2014. Rapid detection and identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* race 1 and race 2. Acta phytopathologica sinica **44**: 586-594.

Zitter AT. 1998. Fusarium Diseases of Cucurbits. Cornell University. January 1998. Available from: http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/factsheets/Cucurbits_Fusarium.htm (Accessed December 2015).

Zhou XG, Everts LK. 2003. Races and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in commercial watermelon fields in Maryland and Delaware. Plant disease **87**: 692-698.

Zhou ZZ, Zheng, J, Li J. 2009. Inhibition effect of ozone on soil-borne pathogenic fungi of vegetables. Journal of China Agricultural University **14**: 56-60.

9 Přílohy

9.1 Fotografie duálních testů kolonie *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* (Foc) rasa 1 s vybranými antagonistickými mikroorganismy na konci experimentu



Obrázek 5: vlevo Foc x vpravo *Erwinia herbicola*



Obrázek 6: vlevo Foc x vpravo *Bacillus amynoliquifascinet*



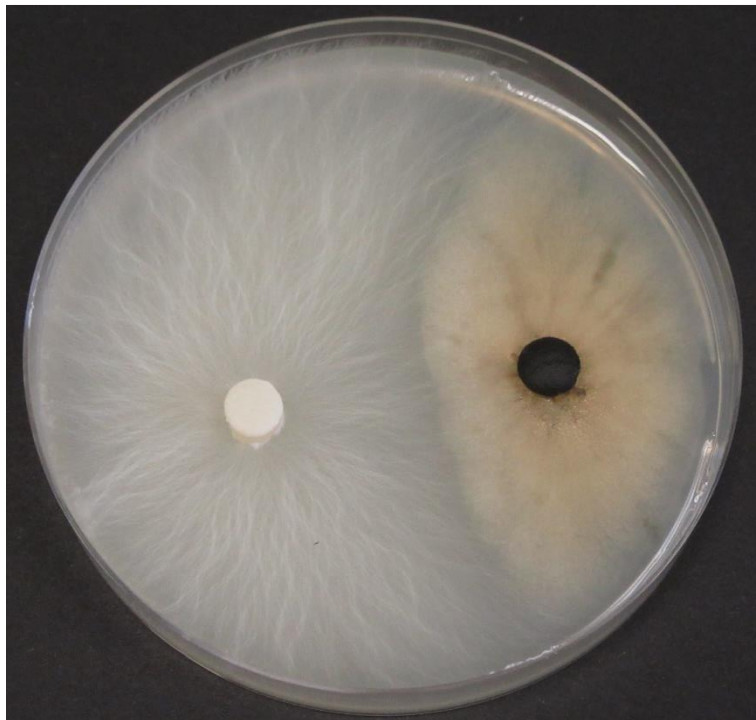
Obrázek 7: vlevo Foc x vpravo *Pseudomonas aeruginosa*



Obrázek 8: vlevo Foc x vpravo *Pseudomonas fluorescens*



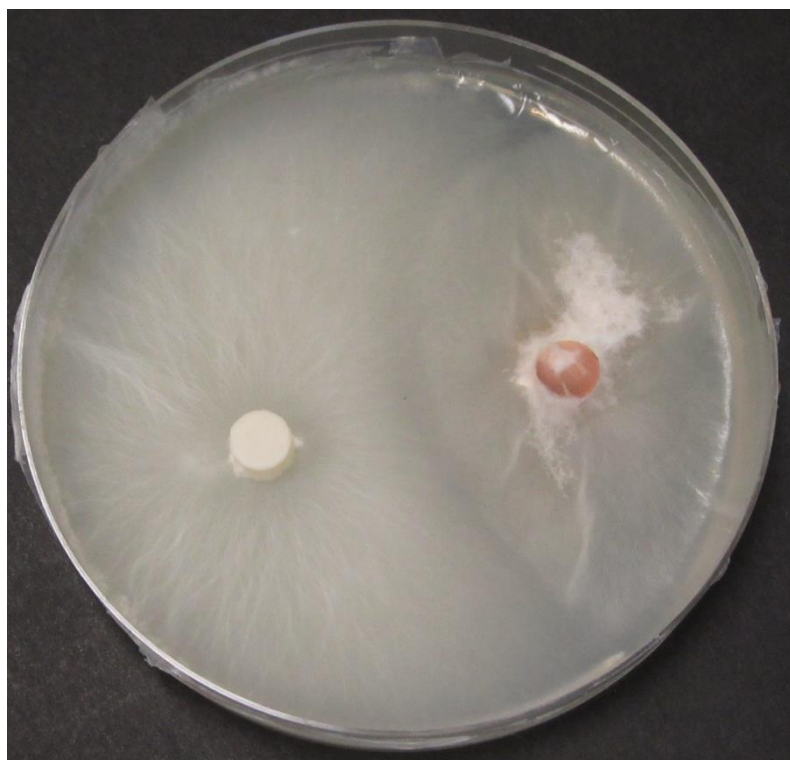
Obrázek 9: vlevo Foc x vpravo *Bacillus subtilis*



Obrázek 10: vlevo Foc x vpravo *Aurerobasidium pullulans*



Obrázek 11: vlevo Foc x vpravo *Cladosporium herbarum*



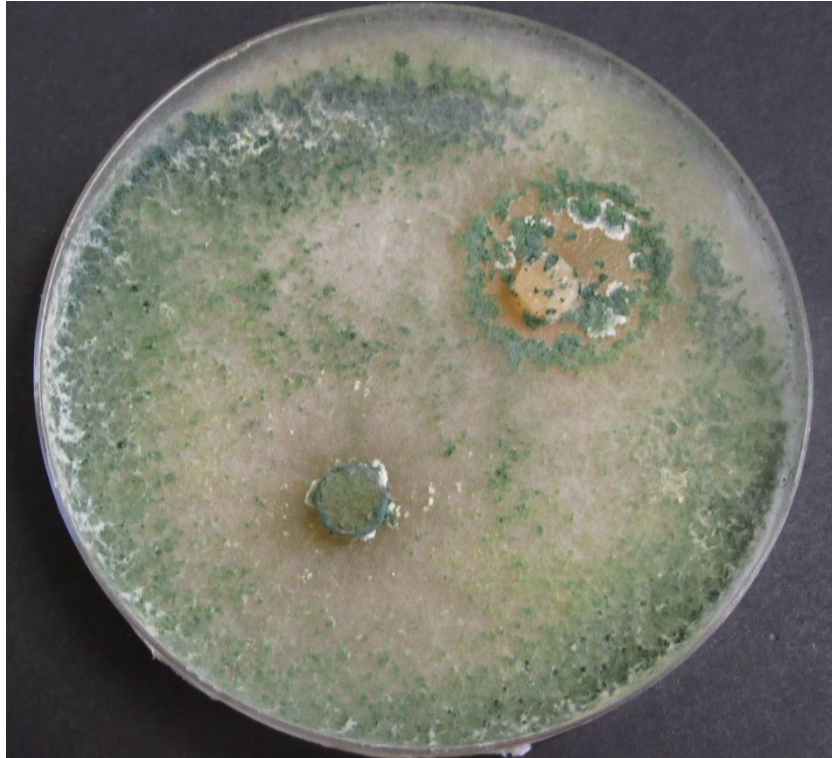
Obrázek 12: vlevo Foc x vpravo *Fusarium lateritium*



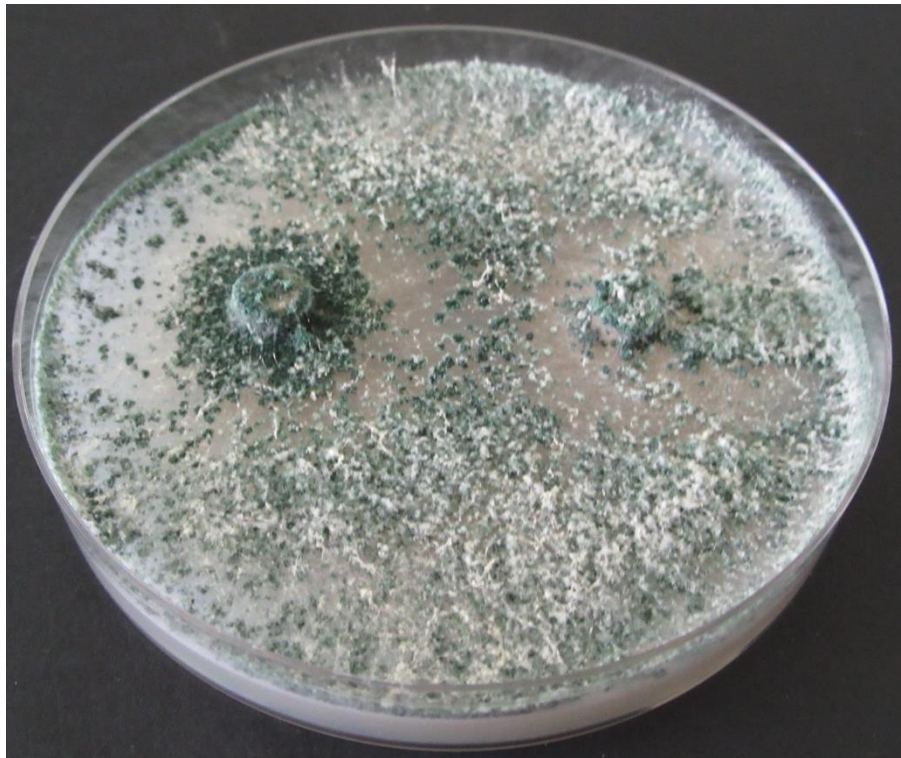
Obrázek 13: vlevo Foc x vpravo nepatogenní kmen *Fusarium oxysporum* 3428



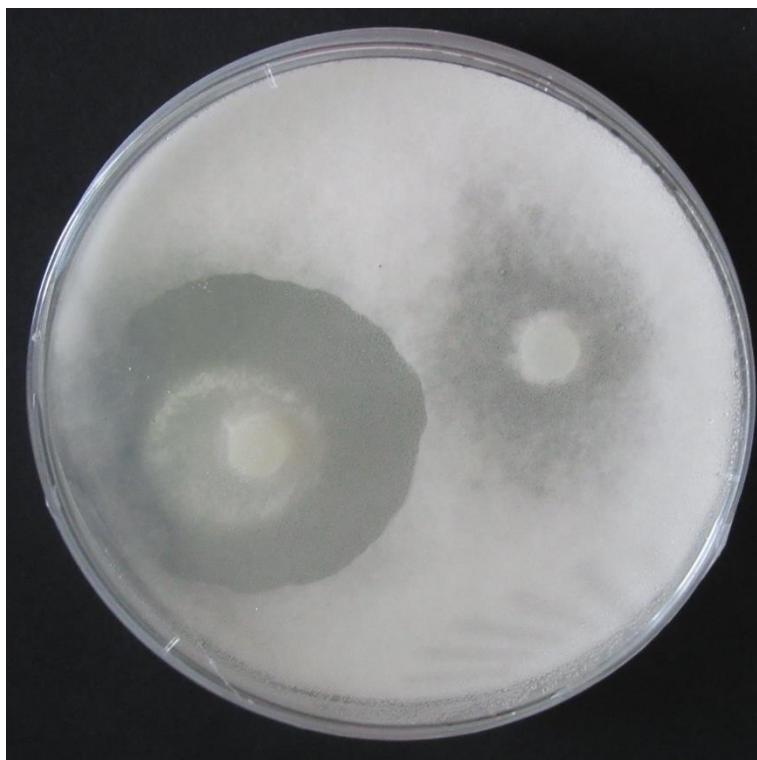
Obrázek 14: vlevo *Trichoderma hamatum* x vpravo Foc



Obrázek 15: vlevo *Trichoderma harzianum* x vpravo *Foc*



Obrázek 16: vlevo *Trichoderma asperellum* x vpravo *Foc*

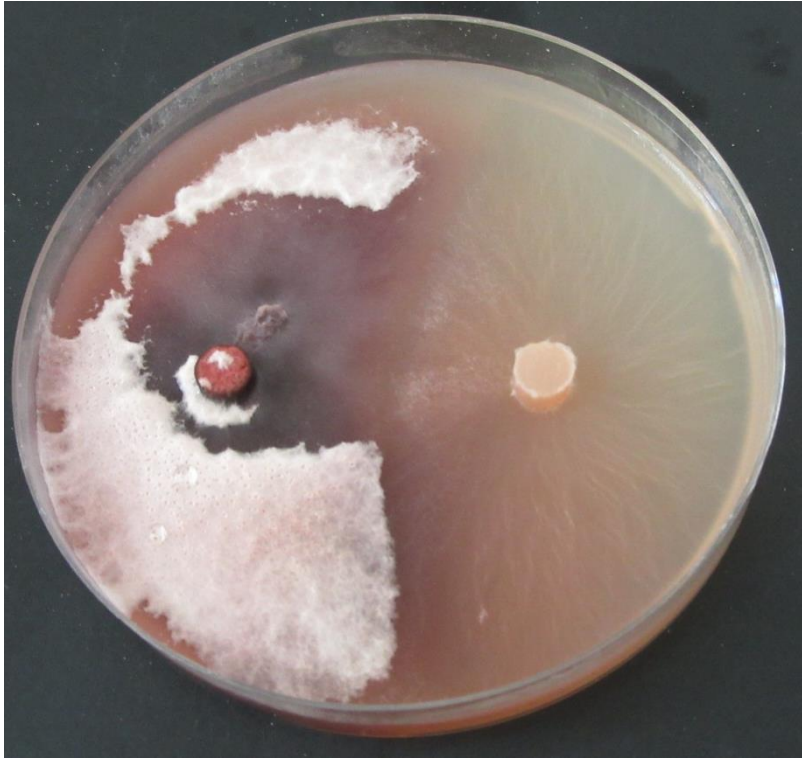


Obrázek 17: vlevo Foc x vpravo *Pythium oligandrum*

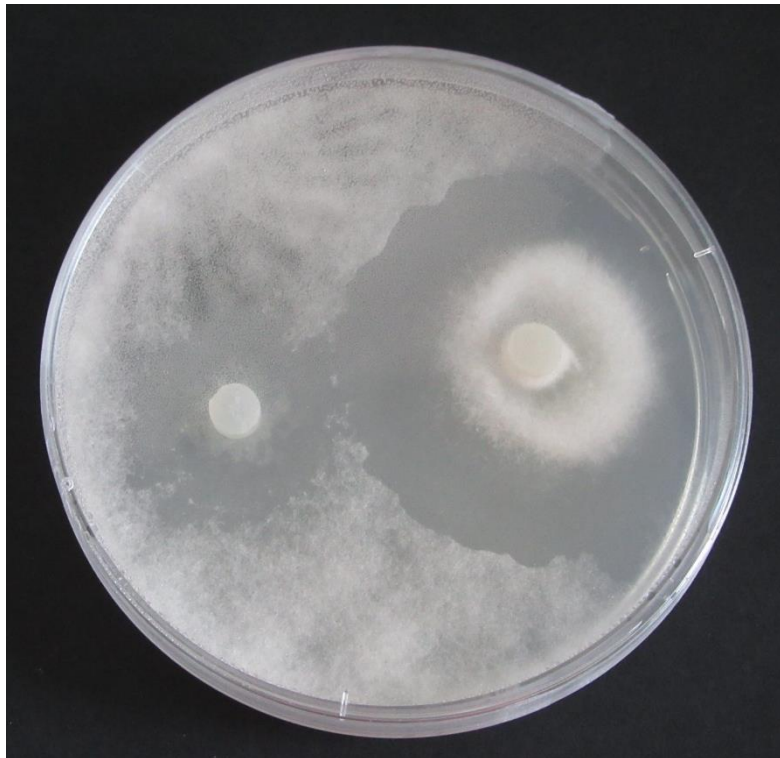
9.1 Fotografie duálních testů kolonie *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* (Foc) rasa 2 s vybranými antagonistickými mikroorganismy na konci experimentu



Obrázek 18: vlevo *Bacillus amyloliquefascient* x vpravo Foc



Obrázek 19: vlevo nepatogenní kmen *Fusarium oxysporum* 3428 x vpravo Foc 2



Obrázek 20: vlevo *Pythium oligandrum* x vpravo Foc 2



Obrázek 21: vlevo *Trichoderma hamatum* x vpravo Foc 2



Obrázek 22: vlevo *Trichoderma harzianum* x vpravo Foc 2



Obrázek 23: vlevo *Trichoderma asperellum* x vpravo Foc 2