

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra ochrany rostlin



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

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

Diplomová práce

**Bc. Anežka Rásochová
Výživa a ochrana rostlin**

Ing. Marie Maňasová, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Biologická ochrana proti patogenu *Verticillium longisporum* v řízených podmínkách" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26. dubna 2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí diplomové práce paní Ing. Marii Maňasové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc při řešení této práce, cenné rady, vstřícnost a trpělivost, kterou se mnou měla. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Evě Zuskové za pomoc jak s laboratorními analýzami, tak při statistickém zpracování dat a také za odborné připomínky v průběhu celé práce.

Biologická ochrana proti patogenu *Verticillium longisporum* v řízených podmínkách

Souhrn

Předkládaná diplomová práce se zabývá problematikou houbového patogenu řepky *Verticillium longisporum* a možnostmi ochrany řepky před tímto patogenem, zejména biologickou ochranou. Práce se zaměřuje na ochranu pomocí biologických přípravků obsahujících houby *Pythium oligandrum*, *Coniothyrium minitans*, *Clonostachys rosea* a *Trichoderma* spp. a bakterie *Bacillus* spp. a *Pseudomonas veronii*. Tyto organismy svým působením v okolí kořenů ošetřené plodiny různými mechanismy omezují napadání plodiny patogenním organismem, v tomto případě *V. longisporum*.

Pokusy v rámci experimentální části této práce probíhaly ve sklenicích České zemědělské univerzity. Byly použity rostliny řepky odrůd Croquet a Inspiration, které byly vypěstovány v substrátu infikovaném patogenem *V. longisporum* a jednotlivé varianty byly ošetřené biologickými přípravky Clonoplus, Contans, Gliorex, Hirundo, Integral Pro, Polyversum, Prometheus a Xilon.

Na konci skleníkového pokusu bylo z každé varianty odebráno 10 rostlin BBCH 14-16 pro účel laboratorních analýz. Z jednotlivých vzorků byla nejprve izolována DNA patogenu *V. longisporum* pomocí metody CTAB a poté byl zjištěn finální obsah DNA pomocí Real-Time PCR.

Výsledky pokusu byly vyhodnoceny v programu STATISTICA.

S různou úspěšností byla ověřena účinnost biologických přípravků. Nejlepší účinky proti patogenu *V. longisporum* prokázaly přípravky Contans a Xilon, kdy přítomnost patogenu nebyla detekována ani u jedné odrůdy řepky. Naopak ve variantách s přípravky Hirundo a Integral Pro byl patogen detekován u obou odrůd. Zdaleka největší obsah patogenu vykazala varianta odrůdy Croquet ošetřená přípravkem Clonoplus, i když ve variantě odrůdy Inspiration ošetřené stejným přípravkem patogen nebyl přítomen vůbec.

Klíčová slova: *Verticillium longisporum*, řepka ozimá, biologické přípravky, biologická ochrana

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

Summary

This thesis is concerned with the fungal pathogen of winter oilseed rape *Verticillium longisporum* and possible methods of control against this pathogen, mainly biological control. It focuses mainly on biological control by using fungal bioagents *Pythium oligandrum*, *Coniothyrium minitans*, *Clonostachys rosea*, and *Trichoderma* spp. and bacterial bioagents *Bacillus* spp. and *Pseudomonas veronii*. After application into the substrate these organisms establish and use various mechanisms to control the growth and infection by the fungal Pathogen *V. longisporum*.

Experiments included in this thesis were conducted in the greenhouses of the University of Life Sciences in Prague. The experiment used two winter oilseed rape varieties – Croquet and Inspiration. These plants were grown in substrate infected with *V. longisporum* and corresponding variations were treated with biological preparations Clonoplus, Contans, Gliorex, Hirundo, Integral Pro, Polyversum, Prometheus, and Xilon.

For the purpose of laboratory evaluations of the experiment 10 plants from each variant were harvested. DNA from each sample was extracted by CTAB DNA isolation and later measured using Real-Time PCR.

The results were evaluated by STATISTICA.

Biological preparates were tested with varying degrees of success. The best results in control of the fungal pathogen *V. longisporum* were detected in variants treated with preparates Contans and Xilon. In both winter oilseed rape varieties no presence of *V. longisporum* was detected while using these preparates. On the contrary both varieties were infected with the pathogen in variants treated with Hirundo and Integral Pro. By far the biggest amount of pathogen was detected in the variety of winter rape Croquet treated with biological prepare Clonoplus even though the other variety, Inspiration, didn't register any amount of the pathogen while being treated with the same prepare.

Keywords: *Verticillium longisporum*, winter oilseed rape, biological preparates, biological control

Obsah

1 Úvod	1
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	2
3 Literární řešerše	3
3.1 <i>Brassica napus napus</i>	3
3.1.1 Pěstování	3
3.1.2 Odrůdy	4
3.1.3 Fáze růstu	5
3.1.4 Houbové choroby řepky	6
3.2 <i>Verticillium longisporum</i>	7
3.2.1 Taxonomické zařazení.....	7
3.2.2 Příznaky napadení	7
3.2.3 Životní cyklus <i>V. longisporum</i>	9
3.2.4 Hostitelský okruh	11
3.2.5 Geografické rozšíření	11
3.2.6 Škodlivost.....	11
3.2.7 Ochrana proti <i>V. longisporum</i>	12
3.3 Biologická ochrana	13
3.3.1 Strategie použití biologické ochrany	14
3.3.2 Mechanismy biologické ochrany.....	14
4 Metodika	17
4.1 Skleníkové pokusy	17
4.1.1 Použitý materiál.....	17
4.1.1.1 Odrůdy řepky použité v diplomové práci	17
4.1.1.2 Biologické přípravky použité v diplomové práci	18
4.1.1.3 Inokulum <i>Verticillium longisporum</i>	21
4.1.2 Design experimentu.....	21
4.1.3 Hodnocení experimentu	22
4.2 Laboratorní analýza	22
4.2.1 Příprava vzorků	22
4.2.2 Izolace celkové DNA pomocí CTAB.....	22
4.2.3 Quantitative polymerase chain reaction (Real-Time PCR)	24
4.2.4 Hodnocení výsledků	25
5 Výsledky	26
5.1 Diagnostické laboratorní analýzy	26
5.2 Statistické zpracování	28
6 Diskuze	38

7 Závěr	43
8 Literatura	44
9 Seznam použitých zkratek	57
10 Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Brukev řepka olejka je jednou z nejdůležitějších plodin a v současné době, ať už ve formě jarní či ozimé, tvoří velkou část osevních postupů nejen v České republice a v Evropě, ale i ve světě. Pro pěstitele je důležitou plodinou nejen z hlediska ekonomického, ale také z hlediska ekologického. Je jednou z mála zlepšujících plodin, které se pěstují ve větší míře, funguje jako dobrý přerušovač obilných osevních sledů.

Kvůli častému výskytu na poli je třeba dbát na dobrou ochranu, protože může narůstat tlak chorob a škůdců, kteří řepku napadají. Nejčastějšími škodlivými organismy napadajícími řepku jsou houbové patogeny, mezi které patří i *Verticillium longisporum*. Poslední dobou se řepka setkává s několika problémy. Kromě již zmíněného fytopatogenního tlaku i se směrem, kterým se evropská politika v současnosti ubírá, co se ochrany rostlin týče. Se stále se snižujícím počtem povolených chemických látek přichází čas, kdy je třeba věnovat pozornost i jiným metodám ochrany řepky bez použití chemické ochrany, nebo pouze s jejím nezbytným množstvím.

Jednou z takových metod je biologická ochrana, která může být použita samostatně či v kombinaci s chemickými přípravky. Regulace výskytu *V. longisporum* je náročná z toho důvodu, že patogen přežívá i napadá rostlinu v půdě, a proto je jeho zasažení přípravky složité. V tomto tví jedna z výhod biologické ochrany, která dokáže patogen v půdě regulovat a tím řepku ochránit (Zhang et al. 2014).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotéza: Existují biologické přípravky (pomocné látky), které jsou účinné proti patogenu *Verticillium longisporum* v řízených podmínkách.

Hlavním cílem bylo otestovat vybrané biologické přípravky (pomocné látky) proti patogenu *V. longisporum* a zaznamenat jejich případnou účinnost pomocí laboratorních diagnostických metod.

Dílčími cíli bylo:

- 1) Otestovat metodiku aplikace inokula *V. longisporum* do substrátu v řízených podmínkách.
- 2) Otestovat účinnost půdní aplikace vybraných biologických přípravků (pomocných látek) proti patogenu *V. longisporum*.
- 3) Otestovat případné rozdíly mezi potenciálně odolnou variantou řepky ozimé a variantou prokazatelně náchylnou (na základě dosavadních sledování).

3 Literární rešerše

3.1 *Brassica napus napus*

Počátek pěstování *Brassica napus napus*, neboli řepky olejky, lze v Evropě datovat do 19. století, její výraznější zastoupení v osevním postupu lze pak pozorovat od 70. let 20. století. Velký vývoj řepka zaznamenala v 90. letech. Hojné pěstování řepky se dá přiřadit několika faktorům. Jako hlavní je pravděpodobně její ekonomická zajímavost, poté také fakt, že je v dnešní době, kdy velkou část osevního postupu často tvoří obiloviny, jednou z mála zlepšujících plodin. Nahrazuje tím funkci dalších plodin, které z osevních postupů ustoupily z důvodů ekonomických nebo technologických, nebo také po snížení stavů hospodářských zvířat. Velké zastoupení této plodiny v osevním postupu sebou samozřejmě nese i negativní stránky, jako jsou například fytopatogenetické problémy (Baranyk et al. 2007; Bečka et al. 2007).

V současné době se mezi největší pěstitele řepky řadí Kanada, Čína, Indie, dále Francie, Německo, Austrálie a Ukrajina. V roce 2019 bylo ve světě řepkou oseto celkem 34 mil. ha, z toho v Evropě to bylo 8,8 mil. ha (FAO 2021). V České republice byla výměra řepky v roce 2019 379 780 ha, v roce 2020 to bylo 368 214 ha a v roce 2021 plocha řepky ke sklizni poklesla na 350 440 ha. Mezi roky 2020 a 2021 se jedná o pokles ploch o 4,8 %. Osevní plochy pro sklizeň v roce 2021 jsou nejnižší za dlouhou dobu, na menší ploše byla řepka zasetá naposledy v roce 2007 (FAO 2021; ČSÚ 2021).

3.1.1 Pěstování

Požadavky na prostředí

Faktory, které nejvíce ovlivňují pěstování řepky, jsou vláha při zakládání porostů a vhodné zimní počasí, které umožní úspěšné přezimování porostů řepky (Baranyk et al. 2010).

V současné době se v České republice pěstuje téměř pouze ozimá forma řepky s vegetační dobou dlouhou 300 – 340 dní (Hůla & Procházková 2008).

I když se nyní řepka v České republice pěstuje ve všech výrobních oblastech, můžeme charakterizovat, jaké podmínky řepce vyhovují nejlépe:

- nadmořská výška 400 – 600 metrů (ale roste i v oblastech až do 700 metrů)
- průměrná roční teplota 6,5 – 8,5 °C a roční úhrn srážek 450 – 750 milimetrů
- půda lehká až střední, hlinitopísčité až hlinitá
- oblasti, kde je v období výsevu řepky dostatečná vláha

Oblasti, ve kterých se řepka pěstuje, se postupem času změnily. Nejprve se pěstovala v úrodných nížinách (v kukuřičné a řepařské výrobní oblasti), zde konkurovala řepě cukrové o chlévský hnůj. Kvůli tomu se dále rozšířila do vyšších poloh, kde má pro růst ideální podmínky – je zde dostatek vláhy, sněhová pokrývka chrání v zimě porost proti holomrazům a výskyt škůdců zde není tak intenzivní, i když podmínky v jednotlivých letech se samozřejmě mohou lišit (Baranyk et al. 2007).

Podmínky, ve kterých se řepce nedaří, popsali Bečka et al. (2007) následovně:

- půda, která je na jaře či na podzim zamokřená déle než týden (dochází k vyhnívání)

- půda s vyoranou mrtvinou a špatně zapravenými posklizňovými zbytky (ztěžuje vzcházení)
- oblasti s holomrazy pod -20 °C (dochází k vymrzání)
- půda těžká, s hroudami nebo utužená (ztěžuje vzcházení)

Zařazení do osevního postupu

Jak již bylo zmíněno, řepka má mezi plodinami pěstovanými v České republice zvláštní místo. Nejprve bylo její zastoupení v osevním postupu doporučováno na 12,5 % (jednou za 8 let), poté do 17 % (jednou za 6 let), nyní se stalo normou tento interval zkracovat na 4 – 5 let, ale ne ojediněle pěstitelé na pozemcích střídají pouze pšenici ozimou a řepku ozimou. Řepka tedy v takových případech tvoří 50 % osevního postupu (Šnobl et al. 2005; Baranyk et al. 2010).

Základním požadavkem, který plodina musí splňovat, aby mohla být předplodinou pro řepku je, aby byla sklizena tak, aby mohla být řepka včas v srpnu zasetá. Řepka v osevním postupu často následuje po obilnině. Mezi vhodné předplodiny patří ozimý ječmen, ozimá pšenice, žito i tritikale (Šnobl et al. 2005). Za velmi dobré předplodiny pro řepku jsou považovány jarní a ozimé směsky, rané brambory, raná zelenina, kmín či hrách (Hůla & Procházková 2008).

Jak již bylo řečeno výše, v současnosti vysoké zastoupení řepky v osevním postupu přináší i jistá negativa. Jedním z nich je fakt, že se řepka může stát zaplevelující rostlinou. Semena řepky si v půdě uchovávají klíčivost i přes 20 let. Proto je vhodné po sklizni řepky pole nepodmítat, nechat výdrol vyklíčit a poté porost zaorat před setím další plodiny (Bečka et al. 2007). Druhé negativum, který vysoké zastoupení řepky přináší, jsou již zmíněné fytopatogenetické problémy. Jednak dochází k infekci houbovými chorobami přes půdu, ale také kvůli častému sousedění nově založených porostů s plochami, kde byla řepka pěstována předešlou sezónou, dochází i k migraci škůdců a přeletu spor původců chorob na nový porost (Baranyk et al. 2007).

3.1.2 Odrůdy

Abychom mohli řepku úspěšně pěstovat, je nutný správný výběr odrůdy. Na trhu je k dispozici velké množství odrůd a další šlechtění stále probíhá. Vlastnosti, na které se šlechtění v současné době zaměřuje, jsou odolnost vůči houbovým chorobám, odolnost vůči suchu, nepukavost šesulí a v neposlední řadě i kvalita semene. Vlastnosti, které je žádoucí během šlechtění zachovat, jsou výnos, mrazuvzdornost a odolnost vůči poléhání. Pro pěstitele je nejdůležitějším faktorem při výběru odrůdy výnos, ke kterému se vážou další vlastnosti, jako je rychlost jarní regenerace, síla podzimního růstu a ranost sklizně. V současnosti jsou odrůdy, co se týče výnosu, dost vyrovnané, záleží více na správném umístění do vhodných oblastí a podmínek (Bečka et al. 2018).

Při výběru odrůdy bere pěstitel v potaz dvě věci, a to odrůdové vlastnosti: výnos semene, výnos oleje, zdravotní stav, přezimování, ranost/pozdnost a společenské vlivy: objektivní informace, cena osiva, firemní motivace (Baranyk et al. 2010).

Jak již bylo řečeno, v poslední době se šlechtitelé zaměřují na selekci odrůd, které by měly zvýšenou odolnost vůči verticiliovému vadnutí. Tento termín je často používán, ovšem podle výsledků z pokusů vedených ÚKZÚZ vyplývá, že ani nově registrované odrůdy

nevykazují v této oblasti velký posun k lepšímu. Zatím se nepovedlo nalézt vhodný genetický materiál k vyšlechtění odolných odrůd (Baranyk 2019).

Nové strategie s velkým potenciálem ke zlepšení odolnosti rostlin vůči chorobám představili Pröbsting et al. (2020), když úpravou genomu řepky, konkrétně knokautem jednoho genu, dosáhli celkového snížení náchylnosti rostlin k napadení *Verticillium longisporum*. Vědci z tohoto týmu se domnívají, že houba je schopna svým působením změnit fyziologické procesy v rostlině a tím jí udělat více náchylnou, čímž se vytvoří vhodné podmínky pro nákazu.

3.1.3 Fáze růstu

Prof. Andrejem Fábrym byla zpracována fenologická klasifikace ozimé řepky, která se posléze stala podkladem pro tvorbu dalších klasifikací, mimo jiné také pro klasifikaci BBCH – mezinárodně používanou stupnici růstových a vývojových fází rostlin. Klasifikace BBCH se používá pro upřesnění pěstitelské technologie, v pokusnictví, v ochraně rostlin (např. v jaké fázi se začnou projevovat symptomy rostlin, v jakých fázích aplikovat přípravky na ochranu rostlin apod.) a celkově ve výzkumu (Baranyk et al. 2007).

Klíčení	
Suché osivo	00
Nabobtnalé osivo	01
Objevení kořínku	05
Vzcházení	
Objevuje se zahnutá osní část (hypokotyl) se složenými děložními lístky	07
Děložní lístky se objeví nad povrchem	08
Děložní lístky se rozvíjejí	09
Objevuje se základ epikotylu (nadděložní část) a vzrostného vrcholu	10
Růst vegetativních orgánů – tvorba listové růžice	
Rozvinutí prvních 2 pravých listů	12
Rozvinutí 4 pravých listů	14
Rozvinutí 6 pravých listů	16
Rozvinutí 8 a více pravých listů	18
Období dlouhivého růstu	
Začátek dlouhivého růstu	30
Vzdálenost mezi inzercí děložích listů a vzrostným vrcholem 5 – 10 cm	31
Vzdálenost mezi inzercí děložích listů a vzrostným vrcholem 10 – 20 cm	33
Butonizace	
Poupata vrcholového květenství částečně zakrytá lodyžními lístky	50
Objevují se poupata vrcholového květenství	52
První dorostlá poupata vrcholového květenství	55
Kvetení	
Prosvítání korunních plátků	59
První květy se otevírají	60
Začátek kvetení u 10 % květů vrcholového květenství	61
Plný květ – kvete 75 % květů vrcholového květenství a tvoří se šešule naspodu květenství	67
Odkvět – kvete méně než 10 % květů, převažují šešule nad počtem květů, šešule na spodní části květenství mají vytvořená semena	69

Kvetení ukončeno – ojedinelé květy, u převážné většiny šešulí jsou semena dorostlá do normální velikosti	71
Zrání	
Zelená zralost	79
První technická (vazačová) zralost	81
Druhá technická (kombajnová) zralost	89
Plná zralost	99

Tabulka 1: Klasifikace BBCH (Baranyk et al. 2007)

3.1.4 Houbové choroby řepky

Houby napadající řepku na ní mohou způsobovat velké ztráty, výnos se může snižovat o 20 – 50 %. Nejčastější houbové choroby, které na řepce nacházíme, jsou fomová hniloba, sklerotiniová hniloba, čern řepková a plíseň šedá (Bečka et al. 2007).

Padlí brukvovitých

Původce: *Erysiphe cruciferarum*

Symptomy napadení padlím se vyskytují až těsně před dozráním, mnohdy jsou šešule pokryté bílým, moučnatým, sporulujícím povlakem. V tomto případě se nevyskytují pro padlí typické bílé skvrny. Málokdy se v polních podmínkách vyskytuje na listech řepky, protože řepka ve fázi, kdy se padlí objevuje, často už listy nemá. Poměrně často se však vyskytuje na řepce pěstované ve sklenících. Zpravidla při napadení padlím nedochází k výnosovým ztrátám, ale snižuje se kvalita. V případě silného infekčního tlaku může patogen způsobovat významné ekonomické ztráty (Lebeda et al. 2017).

Sklerotiniová hniloba

Původce: *Sclerotinia sclerotiorum*

Příznaky napadením sclerotiniovou hnilobou se na rostlinách řepky začínají projevovat v období pozdního kvetení a odkvétání. Nejprve se na stonku objevují dlouhé a vodnaté léze, které šednou a pokožka se začíná loupát. Ve stonku se v místě napadení vytváří bílé vatovité mycelium, ze kterého se tvoří tmavá tvrdá tělíska zvaná sklerocia. Při silném napadení dochází k lámání stonků. Může docházet i k napadení šešulí, ty žloutnou a zasychají, uvnitř se také tvoří mycelium a sklerocia. Sklerocia se po sklizni dostávají do půdy, kde mohou přežívat i 10 let. Význam a rozšíření této choroby jsou způsobeny rozšířením pěstováním řepky a úzkými osevními sledy (Kazda 2010; Kocourek et al. 2018).

Fómová hniloba

Původce: *Phoma lingam/Leptosphaeria maculans*

Původce choroby, houbový patogen *Phoma lingam* může napadat listy řepky již na podzim. Tvoří na nich ostře ohraničené skvrny s šedým středem. Napadení listů na výnos velký vliv nemá, ale nebezpečné jsou následné infekce stonku, které přicházejí v období pozdního jara a před sklizní. Pletivo uvnitř stonku trouchniví a rozpadá se, což způsobuje nouzové dozrávání řepky nebo až lámání stonků a poléhání porostu. Po sklizni patogen přežívá na posklizňových zbytcích, ze kterých se šíří vodou nebo větrem, ale spory patogenu se mohou

při sklizni dostávat i na osivo a šířit se tímto způsobem (Mazáková et al. 2017; Rouxel & Balesdent 2005).

Verticiliové vadnutí

Původce: *Verticillium longisporum*

Viz kapitola 3.2

3.2 *Verticillium longisporum*

3.2.1 Taxonomické zařazení

Říše: Fungi

Oddělení: Ascomycota

Pododdělení: Peizomycotina

Třída: Sordariomycetes

Podtřída: Hypocreomycetidae

Řád: Glomerellales

Čeleď: Plectosphaerellaceae

Rod: *Verticillium*

Druh: *Verticillium longisporum* (C. Stark) Karapapa, Bainbridge & Heale (1997)

Houbové patogeny *Verticillium* spp. jsou zodpovědné za choroby způsobující škody na zelenině, polních plodinách, stromech i okrasných rostlinách. Největší škody na polních plodinách vyvolávají *Verticillium albo-atrum* a *Verticillium dahliae* (Schnathorst 1981). *V. dahliae* bylo považováno za původce verticiliového vadnutí řepky, avšak v roce 1961 byl izolován kmen *V. dahliae*, jehož konidie byly delší než konidie již známých kmenů. Tento kmen byl pojmenován *Verticillium dahliae* var. *longisporum* (Stark 1961). Za samostatný druh bylo *V. longisporum* označeno až o mnoho let později, v roce 1997. Hlavní charakteristiky, kterými se *V. longisporum* odlišuje od *V. dahliae*, jsou již zmiňované dlouhé konidie, dále protáhlý tvar sklerocií a také okruh hostitelů, *V. longisporum* se orientuje zejména na rostliny z čeledi Brassicaceae (Karapapa et al. 1997). Rozlišování těchto dvou druhů pouze na základě uvedených charakteristik ovšem není vždy spolehlivé, protože některé druhy *V. longisporum* se mohou morfologicky lišit a podobat se *V. dahliae* (Depotter et al. 2016). Proto je vhodné mikroskopickou diagnostiku při identifikaci patogenu doplnit ještě některou molekulárně-biologickou metodou (Ryšánek et al. 2018).

3.2.2 Příznaky napadení

Patogen *Verticillium longisporum* způsobuje na řepce chorobu, která je známá jako verticiliové vadnutí, v angličtině „verticillium wilt“. Příznaky napadení řepky se ovšem od příznaků, kterými se tato choroba projevuje na jiných rostlinách z čeledi Brassicaceae, tedy vadnutí a usychání poškozené rostliny, liší. Proto Depotter et al. (2016) u řepky navrhuji používání nového anglického označení „verticillium stem stripping“.

Symptomy napadení řepky *V. longisporum* jsou poměrně nespecifické, což velmi ztěžuje diagnózu této choroby v porostu, dále také může dojít ke snadnému zaměnění s jiným patogenem. Symptomy, podle kterých se verticiliové vadnutí dá diagnostikovat už lépe se v porostu většinou neobjevují dříve než 3 – 4 týdny před sklizní (Dunker et al. 2008). Kvůli tomu, že se příznaky na napadených rostlinách objevují až v pozdější fázi růstu, se začátkem dozrávání, je běžné jejich zaměnění s projevem stárnutí. Také je nutné podotknout, že projev příznaků choroby v polních podmínkách a v regulovaných podmínkách (na uměle inokulovaných rostlinách) se často velmi liší (Johansson et al. 2006).

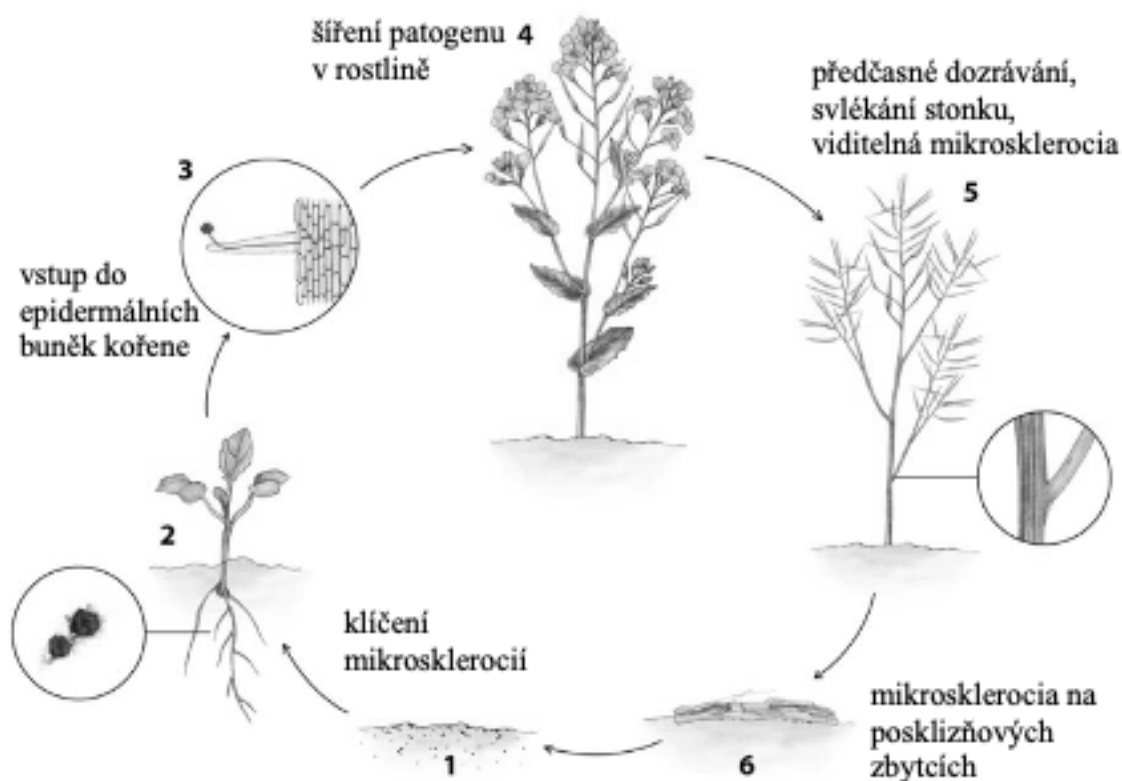
Mezi brzké symptomy se řadí chloróza postranních větví a listů (Dunker et al. 2008), někdy také žloutnutí jedné poloviny starších listů, které se objevuje během fáze květu (Eastburn & Paul 2007). Později se mikrosklerocia stanou viditelnými pod epidermis, v dřeni a také v kořenové tkáni (Knüfer 2011). Žloutnutím jedné poloviny listů se projevuje i další vaskulární patogen řepky, *Fusarium oxysporum*, avšak ten není zatím považován za vážného patogena řepky v České republice, protože jeho výskyt je dokumentován zejména v suchých a teplých podmínkách (Johansson et al. 2006). Žloutnutí jedné poloviny listů by mohlo být bráno za přesvědčivější příznak napadení *V. longisporum*, pokud by se neobjevilo pouze u jednoho listu, ale bylo pozorovatelné u více listů na jedné rostlině (Gladders 2009).

Za typický a nejspolehlivější symptom při určování, zda je napadení rostliny způsobené patogenem *V. longisporum*, je považován nejprve žlutý a posléze hnědnoucí pruh různé šířky táhnoucí se po jedné straně stonku až do postranních větví. Tento pruh může být pouze na malé části obvodu stonku či větve, ale u některých rostlin může být po celém obvodu. Tyto silně napadené rostliny rychle předčasně dozrávají nebo umírají. Pruhy se objevují, když jsou rostliny ještě zelené a postupně tmavnou a šednou. V primární kůře pod epidermis se tvoří šeda mikrosklerocia. Epidermis následně praská a jde ji ze stonku lehce oškrábat, čímž se mikrosklerocia odhalují (Johansson 2006).

Mikrosklerocia se formují také na kořenech, kde se napadené pletivo zbarvuje do šeda (Gladders 2009). Tmavé zbarvení kořenů a také stonků nezpůsobuje pouze tvorba mikrosklerocií. Napadení vnitřku stonků a kořenů se projevuje tmavě hnědým zbarvením cévních svazků. Toto zbarvení je způsobováno ochranným ucpáváním cévních svazků fenol-pektinovým materiálem, čímž se rostlina brání proti šíření choroby. Při příčném přeríznutí stonku rostlin napadených *Verticillium* spp. je možné vidět tmavé kruhy cévních svazků už v brzkých fázích růstu, ale u řepky je těžké tento symptom detekovat včas. Příznaky verticiliového vadnutí mohou být poměrně snadno zaměněny s příznaky fomového černání stonku řepky, zmatení napomáhá i fakt, že se choroby na řepce vyskytují ve stejnou dobu (Johansson 2006).

Při skleníkových pokusech s umělou inokulací *V. longisporum* na inokulovaných rostlinách způsobovalo během prvních 5 týdnů žloutnutí děložních lístků a pravých listů, tmavnutí žilek na listech a zpomalení růstu rostlin (Karapapa et al. 1997). Zpomalení růstu rostlin je symptom, který je typický pro skleníkové pokusy a který se na rostlinách v běžném polním porostu vůbec neobjevuje. Po inokulaci rostlin konidii pomocí namočení kořenového systému se symptomy napadení dostavily dříve a ve větší míře než při druhým způsobem inokulace, kdy byla mikrosklerocia zapravena do půdy (Dunker et al. 2008).

3.2.3 Životní cyklus *V. longisporum*



Obrázek 1: Životní cyklus *Verticillium longisporum* (Depotter et al. 2016, upraveno)

Verticillium longisporum se vyznačuje monocyklickým životním cyklem, což znamená, že během jedné vegetační sezóny je patogen schopen dokončit pouze jeden životní cyklus, nemůže se tedy stát, že by vytvářel sekundární inokulum. Pohlavní stádium tohoto patogenu nebylo zatím pozorováno (Ryšánek et al. 2018).

Životní cyklus *V. longisporum* je různými zdroji rozdělován buď na tři fáze – dormantní, parazitickou a saprofytickou (Schnathorst 1981) nebo na fáze čtyři – fázi biotrofní, endofytickou, nekrotrofní a nakonec fázi dormantní (von Tiedemann 2020).

Fáze biotrofní

Exudáty produkované kořeny vyvolávají klíčení mikrosklerocií, které čekají v půdě. Může se jednat o kořenové exudáty hostitelské rostliny, ale klíčení mikrosklerocií mohou vyvolat i kořenové exudáty rostlin, které *V. longisporum* nenapadá (Gödecke 2007, Schnathorst 1981). Hyfy vyrůstají z mikrosklerocia směrem ke kořenu rostliny (Berlanger & Powelson 2000), hustě porůstají povrch kořenového vlášení, ale prozatím nepronikají do buněk a pokračují v růstu směrem k postranním kořenům. Později se hyfy přichytí k rhizodermis a prorůstají dovnitř buňky. Hyfy patogenu do hostitele vstupují hlavně postranními kořeny a vlášením. Zhou et al. (2006) pozorovali vnik hyf do rostliny i skrz buňky kořenového vlášení a přes kořenovou špičku, to ovšem nebylo Eynck et al. (2007) potvrzeno. Po proniknutí hyfy do hostitele je kolonizována primární kůra (kortex), ve které se hyfy rozrůstají intracelulárně

i extracelulárně. V této fázi buňky na napadení nijak nereagují, nebyla pozorována žádná změna barvy kořenů. Hyfy prorůstají kortexem a směřují dovnitř směrem ke střednímu válci. Tato fáze je poměrně krátká (Eynck et al 2007).

Fáze endofytická

Následuje endofytická fáze, která je už o poznání delší. Endofytická fáze se vyznačuje tím, že hyfy prorůstají cévami xylému, do kterého se dostávají ve středním válci. Cévy ovšem nejsou kolonizovány všechny, mikroskopicky bylo pozorováno, že některé z cév jsou kompletně vyplněny hyfami a cévy s nimi sousedící mohou být úplně prázdné (Eynck et al. 2007). Vypadá to tedy, že řepka má schopnost určitým způsobem omezit boční rozrůstání mycelia do dalších cév, rozrůstání v rostlině probíhá pouze lineárně. I při poměrně silném napadení rostliny proto často zůstává podstatné množství volných cév, které dále dokážou transportovat vodu, proto tedy jedním z příznaků u řepky není vadnutí rostlin, jak již bylo zmíněno dříve (Knüfer 2011). Mycélium může produkovat konidie, které jsou unášeny transpiračním proudem do dalších nadzemních částí rostlin, kde se zachytávají, klíčí a mohou být zdrojem dalších kolonií patogenu (Eynck et al. 2007; Garber & Houston 1966).

Rozrůstání houby cévami hostitele je ovlivněno teplotou půdy. První kolonizace se objevuje už na podzim (do konce září), v růstové fázi řepky BBCH 14. Ale pak na dlouhou dobu ustává a znovu se obnovuje až během pozdního jara (kolem poloviny května), kolem BBCH 63, kdy teplota půdy začíná stoupat nad 12 – 15 °C (Siebold & von Tiedemann 2013).

Fáze nekrotrofní

Fáze nekrotrofní je pravděpodobně nejznámější, protože je už dobře vizuálně pozorovatelná ve formě symptomů, které se na rostlině objevují. Jsou to již zmíněné postupně tmavnoucí skvrny na stonku a větvích, poté lze na poškozeném pletivu pozorovat i mikrosklerocia. Nejprve je šíření patogenu omezeno pouze na vaskulární systém, ale později spolu se stárnutím rostliny se infekce rozšiřuje i do okolního pletiva, až nakonec vytváří mikrosklerocia. Produkce mikrosklerocií způsobuje typickou šedou či černou diskoloraci stonků (Gladders 2009).

Fáze dormantní

Mikrosklerocia jsou shluky tlustostěnných a melanizovaných (tmavě zbarvených) buněk. Utvářejí se na cévních svazcích, ale pronikají primární kůrou (kortexem) až na svrchní vrstvu epidermis (Schnathorst 1981). Mikrosklerocia jsou do půdy uvolňována během rozkladu rostlinného pletiva, na kterém vyrostla. Protože jsou velmi odolná k vnějším vlivům, jako jsou extrémní teploty, sucho a další, dokážou v půdě vydržet dlouhou dobu a zachovávají si schopnost infikovat hostitelskou rostlinu. Heale & Karapapa (1999) uvádějí, že tato dormantní fáze může u *V. dahliae* trvat 10 – 15 let, lze tedy předpokládat, že u *V. longisporum* bude délka této fáze obdobná (Ryšánek et al. 2018). Jsou popsány případy, kdy se silné poškození porostu způsobené napadením *V. longisporum* objevilo i po 8 – 10 letech po pěstování řepky, což může potvrdit tuto hypotézu (Eastburn & Paul 2007). Dormantní fáze končí, když mikrosklerocia začínají klíčit směrem k hostitelské rostlině.

3.2.4 Hostitelský okruh

Patogen *Verticillium longisporum* se specializuje hlavně na hostitele z čeledi *Brassicaceae* (Zeise & von Tiedemann 2002), ovšem ne všechny brukvovité rostliny tomuto patogenu podléhají, jednou z výjimek je například brokolice (Njoroge et al. 2011). Plodiny, u kterých bylo napadení popsáno, jsou například květák (Debode et al. 2005), zelí (Inderbitzin et al. 2011), růžičková kapusta (Isaac 1957), čínské zelí (Watanabe et al. 1973) a vodnice (Carder & Barbara 1994).

První výskyt *V. longisporum* byl zaznamenán v Anglii na růžičkové kapustě (Isaac 1957) a potom na křenu (Stark 1961). Napadení řepky bylo poprvé pozorováno Kroekerem (1970) ve Švédsku v roce 1969.

Rozdělení hostitelských rostlin na ty, které jsou více napadány *V. dahliae* a které *V. longisporum*, není zcela jasné, protože se u obou patogenů jako příklady uvádějí řepka (Steventon et al. 2002), křen (Stark 1961) a cukrová řepa (Jackson & Heale 1985), ale je prokázáno, že *V. longisporum* je na rostlinách z čeledi *Brassicaceae* škodlivější, než *V. dahliae*.

Jak již bylo řečeno, *V. longisporum* napadá hlavně rostliny z čeledi *Brassicaceae*, ale v pokusech, kdy byly rostliny uměle infikovány, *V. longisporum* napadalo i heřmánkovec nevonný, hořčici polní, oves, pšenici (Johansson et al. 2006), dále také lilek, rajče, meloun vodní a salát (Novazaki 2015).

3.2.5 Geografické rozšíření

V. longisporum bylo ve Švédsku označováno za důležitou chorobu od roku 1960, ale známo bylo již v letech 50. (Svensson & Lerennius 1987). Jeho výskyt je také známý z Německa, kde jeho výskyt od 80. let 20. století prudce vzrostl (Dunker et al. 2008). Dále se vyskytuje také ve Francii, Polsku, jižním Rusku a na Ukrajině (Karapapa et al. 1997), na Slovensku (Bokor et al. 2013) a i Velké Británii (Gladders et al. 2011). Mimo Evropu se vyskytuje i v Kanadě (CFIA 2015), kde začíná způsobovat narůstající problémy (Depotter et al. 2016) a objevuje se i v Japonsku a USA, ale pouze na brukvovité zelenině (Subbarao 1995).

Byly zkoumány, zda je možný přenos choroby osivem, například v Kanadě bylo *V. longisporum* zaznamenáno až v roce 2014. Ačkoliv bylo u skleníkových pokusů detekováno DNA *V. longisporum* v semenech napadených rostlin, pouze u 2 % z těchto infikovaných semen vyrostly rostliny, na kterých se projeví příznaky napadení *V. longisporum*. U rostlin pěstovaných v polních podmínkách infekce semen byla ještě v menší míře a nevyrostly z nich žádné nakažené rostliny. Závěr tohoto pokusu byl takový, že semeny infikovanými na pozemku tento patogen nemůže být přenášen (Zheng et al. 2019).

3.2.6 Škodlivost

Ztráty na výnosu, které *V. longisporum* u řepky způsobuje, jsou velmi variabilní, záleží hlavně na intenzitě choroby a na rozsahu předčasného dozrávání řepky (Ryšánek et al. 2018). V pokusech bylo prokázáno, že v případě samostatně stojících rostlin způsobuje choroba ztráty 30 – 60 % v případě mírného až silného napadení. U celých porostů se objevuje tolerance až do 50 % napadení porostu, pak teprve přicházejí ztráty. Nebyl prokázán vliv choroby

na olejnatost semen (Dunker et al. 2008). Odhady ztrát vycházející z pozorování v polních podmínkách udávají, že výnosové ztráty způsobené předčasným dozráváním řepky mohou dosahovat až 50 %, v extrémních případech i 80 % (Bečka et al. 2007; Dunker et al. 2008).

3.2.7 Ochrana proti *V. longisporum*

Ochrana proti verticiliiovému vadnutí je značně náročná, jednak kvůli dlouhé perzistenci patogenu v půdě, ale také kvůli tomu, že jakmile se patogen rozšíří v cévních svazcích rostliny, je jakákoliv ochrana neúčinná. Protože patogen kolonizuje xylém napadené rostliny, chemické fungicidy při ochraně proti rodu *Verticillium* selhávají (Eynck et al. 2007; Zhou et al. 2006). Pro dosažení adekvátní ochrany by bylo možné použít kombinaci více způsobů ochranných zásahů, které jsou uvedené dále (Depotter et al. 2016).

Chemická ochrana, tepelná ošetření a solarizace

V současné době regulace *V. longisporum* pomocí fungicidů téměř není k dispozici, v České republice je do řepky registrován pouze jeden přípravek, Symetra (eAGRI 2021). Metoda fumigace půdy je sice účinným způsobem, jak zasáhnout mikroclerocia *V. dahliae* v půdě (Powelson & Carter 1973), ale již se nemůže v zemědělství používat kvůli škodlivému vlivu na životní prostředí (Subbarao 2002). Tepelná ošetření půdy mohou být účinná, ale zejména ošetření pomocí horké páry, ale i další varianty jsou velmi energeticky náročné a nákladné, proto se v běžném provozu takřka nepoužívají. Avšak solarizace půdy s použitím fólie je technicky a finančně přístupná (Pullman et al. 1981), byla prokázána jako účinná (Ashworth et al. 1982), ale použitelná pouze v oblastech, kde teploty vystoupají tak vysoko, že dokážou patogen zasáhnout (Stapleton 2000).

Regulace plevelů a osevní postup

Verticillium longisporum má na rozdíl od *V. dahliae* užší okruh hostitelských rostlin, což by teoreticky naznačovalo, že vhodný osevní postup by mohl být dostatečnou ochranou proti tomuto patogenu. Ovšem kvůli nedostatečné regulaci plevelných rostlin z čeledi Brassicaceae i čeledí jiných, které jsou hostitelskými rostlinami, a schopnosti mikroclerocí přežít v půdě a zachovávat si schopnost infikování hostitelské rostliny po mnoho let, se při současných úzkých osevních postupech o účinnou ochranu nejedná (Abuamsha 2011; Johansson et al. 2006).

Byly provedeny studie zkoumající, zda by došlo ke snížení množství sklerocí, pokud by se půda, kde se vyskytují, nechala ležet ladem jako úhor. Z výsledků vyplývá, že v půdě po dobu úhoru k poklesu koncentrace mikrosklerocí nedošlo (França et al. 2013; Subbarao & Hubbard 1999).

Rezistentní odrůdy řepky

Zatím se nepovedlo objevit jednoznačně použitelný genetický zdroj odolnosti proti verticiliiovému vadnutí a vyšlechtit s jeho pomocí výrazně odolnou odrůdu řepky. Ani u nově registrovaných odrůd nejsou rozdíly v odolnosti proti rodu *Verticillium* velké, ať už jsou tyto rozdíly posuzované mezi novými odrůdami navzájem či mezi odrůdami novými a staršími.

V pokusech byly pozorovány geneticky podmíněné rozdíly mezi odrůdami, ale žádná z nich není odolná (Baranyk 2019).

Biologická ochrana

V poslední době je po celém světě tendence používat metody ochrany rostlin šetrnější k přírodě (Hajieghrari et al. 2008). Z tohoto důvodu, a i z toho důvodu, že nejsou dostupné téměř žádné efektivní metody ochrany proti rodu *Verticillium*, se stále více se zvyšuje zájem o biologickou ochranu, v případě houbových chorob o prospěšné houby a bakterie žijící přirozeně v půdě a v rhizosféře rostlin, které jsou přirozenými antagonisty houbových patogenů (Fotoohiyan et al. 2017).

3.3 Biologická ochrana

Biologická ochrana je charakterizována jako záměrné využívání přirozených nepřátel (tzv. bioagens) s cílem regulace populací škůdců, původců chorob rostlin a popřípadě i plevelů (Bagar 2011). Jedná se o potlačení růstu, infekce či rozmnožování jednoho organismu organismem druhým (Heydari & Pessarakli 2010). Co se chorob týče, tak jako bioagens bývají využívány hlavně bakterie a houby, které jsou izolované z půdy, možné je i použití virů (O'Brien 2017). V současné době přípravky na biologickou ochranu rostlin využívají okolo 100 druhů a kmenů mikroorganismů, 50 druhů makroorganismů a asi 50 druhů semiochemikálií, tedy látek, které organismy využívají pro přenos informací (Bagar 2011).

Pěstitelé při ochraně rostlin stále spoléhají pouze na využívání chemické ochrany, která se v současné době stává stále komplikovanější. Poslední dobou se stále více ukazuje, jaký vliv má užívání nadměrného množství agrochemikálií na životní prostředí, jak tyto chemikálie ovlivňují necílové organismy a jak se snižuje jejich účinnost kvůli vypěstování rezistence vůči účinným látkám u škodlivých organismů (Heydari & Pessarakli 2010). Stále stoupající obavy z vlivu fungicidů na přírodní prostředí a z jejich reziduí v potravinách měly za následek omezení používání velkého počtu fungicidních látek. Nutnost jejich náhrady zvýšila zájem o biologické přípravky (O'Brien 2017).

Na rozdíl od chemické ochrany má biologická ochrana výhodu v tom, že nezatěžuje životní prostředí, má nízkou toxicitu vůči lidem, teplokrevným živočichům a necílovým organismům. Díky její šetrnosti je možné ji používat i v chráněných oblastech, ochranných pásmech vod apod. (Bagar 2011). Mezi její výhody dále patří bezpečná a snadná manipulace a aplikace přípravku (Chandrashekara et al. 2012).

Ovšem pro úspěšné použití biologické ochrany je důležité správné určení škůdců a také znalost jejich způsobu života, podrobná znalost užitečných organismů, mechanismů působení biologických přípravků a jejich vztahu se škodlivými organismy. Nevýhodou použití biologické ochrany je pomalý nástup účinnosti některých přípravků. V těch případech je nutná aplikace s dostatečným předstihem. Přípravky také mohou mít kratší dobu skladovatelnosti z důvodu užití živých organismů (Bagar 2011). Dalšími nevýhodami je například velké ovlivnění účinnosti přípravků přírodními podmínkami a také nižší efektivita, než mají chemické fungicidy (Chandrashekara et al. 2012).

3.3.1 Strategie použití biologické ochrany

Jsou známy čtyři typy biologické ochrany: přírodní, konzervační, klasická a augmentativní (Eilenberg et al. 2001; Cock et al. 2010).

Přírodní biologická ochrana je funkce ekosystému, kdy jsou škodlivé organismy regulovány přirozeně se vyskytujícími antagonisty. Tato ochrana probíhá ve všech světových ekosystémech bez lidských zásahů a co se týče ekonomické stránky, je to nejvýznamnější část biologické ochrany v zemědělství (Waage & Greathead 1988).

Konzervační biologická ochrana je založena na ochraně a stimulaci běžně se vyskytujících přirozených nepřátel. Při ochraně proti rostlinným chorobám se zaměřuje na potlačování infekce pomocí mikroorganismů přirozeně se vyskytujících v půdě a také na mikroorganismy vyskytující se na a uvnitř rostlin, které podporují odolnost rostliny proti infekci patogenem (Mendes et al. 2011; Weller et al. 2002).

Při klasické biologické ochraně jsou bioagens sbírány v místě přirozeného výskytu patogenu a následně vypouštěny v místech s invazivním výskytem tohoto škodlivého organismu. Při použití této metody často dochází k trvalé regulaci populací (DeBach 1964).

Augmentativní metoda biologické ochrany spočívá v umělém pěstování přirozených nepřátel, které jsou následně ve velkém množství vypouštěny buď k okamžité regulaci škodlivých organismů v plodinách s krátkou vegetační dobou – inundativní biologická ochrana, nebo vypouštěny opakovaně pro regulaci škůdců s několika generacemi u plodiny dlouhou vegetační dobou – inokulativní biologická ochrana (Parnell et al. 2016; van Lenteren 2012).

3.3.2 Mechanismy biologické ochrany

Biologické organismy využívané v biologické ochraně mají různý mode of action, neboli způsob účinnosti, kterým působí na cílové organismy a tím je omezují a snižují jejich škodlivost vůči pěstovaným plodinám (O'Brien 2017).

Stimulace růstu rostlin

Častým výsledkem působení bioagens na rostlinu je urychlení jejího růstu. Mnoho bakterií a hub používaných v biologických přípravcích produkuje látky podobné fytohormonům regulujícím růst a metabolity, které růst podporují (Harman et al. 2004; Taghavi et al. 2009). To znamená, že výhoda použití biologické ochrany je ta, že i když se danou sezónou choroby v porostu nevyskytnou, u ošetřených plodin se zvýší výnos (Santoyo et al. 2012).

Látky podobné fytohormonům produkované některými endofytickými bakteriemi nejen že urychlují růst, ale také pomáhají rostlině zvládnout stresové situace jako je například sucho (Brader et al. 2014).

Vyvolání obranného mechanismu rostlin

Dalším běžně pozorovaným mechanismem biologické ochrany je vyvolání obranné odpovědi u hostitelské rostliny. Může se jednat o systemickou obrannou odpověď, která je charakterizována odolností vůči širokému spektru patogenů, také může být vyvolána

abiotickými stresory. Nebo také může jít o specifické obranné mechanismy, kdy bioagens vyvolá produkci specifických obranných látek (Shoresh et al. 2010).

Produkce enzymů

Produkce enzymů rozkládajících polysacharidy jako jsou chitinázy, proteázy a celulózy je znakem mnoha bioagens (Jan et al. 2011; Quecine et al. 2008). Tyto enzymy jsou schopné rozkládat buněčné stěny hyf, chlamydospor, oospor, konidií, sporangií a zoospor. To způsobuje smrt buněk a tím i přispívá k ochraně rostlin. Oligosacharidy, které se uvolňují při rozkladu houbových buněk působí jako signalizační molekuly, které spouštějí obranný mechanismus rostlin (O'Brien 2017).

Produkce antibiotik

Velký počet bakterií a hub používaných v biologických přípravcích produkuje antibiotika, která jim poskytují převahu nad škodlivými druhy bakterií a hub tím, že je eliminují. Jeden kmen organismu může produkovat i několik druhů antibiotik (Jan et al. 2011, Raaijmakers et al. 2010). Jako příklad můžeme uvést houbu *Trichoderma* spp., která je obsažena ve velkém počtu prodáváných přípravků. Ta produkuje celou řadu sekundárních metabolitů s antibiotickým účinkem (Druzhinina et al. 2011).

Mnohé studie se snažily prokázat účinnost produkovaných antibiotických látek tím, že proběhlo u bioagens narušení genů, které jsou za produkci těchto látek zodpovědné a následně bylo pozorováno, jestli stále dochází k potlačení patogenu. Debode et al. (2007) ve své studii prokázali, že u *Pseudomonas aeruginosa* a *Pseudomonas chlororaphis* po narušení produkce antibiotických látek došlo ke značnému omezení potlačování tvorby mikrosklerocií u *Verticillium* spp., avšak nedošlo k úplnému zastavení potlačování patogenu, což naznačuje, že jsou přítomny i jiné mechanismy biologické ochrany.

Biofilmy

Bakterie se na povrchu rostlin málokdy vyskytují jako jednotlivé buňky, ale vytvářejí seskupení nazývané biofilm (Bogino et al. 2013; Flemming et al. 2016). Biofilmy většinou obsahují více druhů bakterií nebo směsici bakterií a hub (Flemming et al. 2016; Frey-Klett et al. 2011).

V těchto biofilmech jsou buňky pokryty matrixem, látkou, která je ochraňuje před vysycháním, UV zářením, predací a také například antibiotiky. Biofilmy se skládají z látek produkovaných buňkami, které tyto biofilmy pokrývají. Obsahují polysacharidy, proteiny, lipidy, DNA a další látky. Biofilmy jsou sorbenty, které mohou akceptovat a akumulovat široké spektrum látek, které mohou být následně využity buňkami, které pokrývají. Biofilmy nepřijímají pouze živiny, ale také toxické látky, které jsou v matrixu fixovány, dokud nedojde k jeho rozkladu, nebo se z něj uvolní do vodní fáze půdy (Flemming et al. 2016).

Biofilmy se v biologické ochraně uplatňují tím, že zamezují patogenu přístup k povrchu rostliny a také produkují antibiotika (Morris & Monier 2003).

Kompetice

Soupeření o živiny na kořenech nebo v jejich těsné blízkosti, tedy v rhizosféře, je dalším mechanismem biologické ochrany. Bioagens soupeří s patogeny o zdroje potravy. Tím, že využívají stejné zdroje jako patogeny, bioagens předchází usídlení patogenů a následné infekci (Card et al. 2009; Ellis et al. 1999).

Z těchto důvodů je ideální použití hypovirulentních variant (kmenů) patogenů jako bioagens. Využívají stejných zdrojů, zabírají stejný prostor a mohou okupovat místa vstupu, která jsou využívána patogenem, čímž předchází rozvinutí infekce (Sneh 1998).

Deaktivace fytotoxinů

Hodně rostlinných patogenů produkuje fytotoxiny, které přispívají k patogenitě tím, že působí jako inhibitory enzymů, zasahují do správné funkce membrán nebo zabraňují spuštění obranného mechanismu rostlin. Bioagens ochraňují rostliny tím, že fytotoxiny deaktivují, nebo rovnou zabrání jejich produkci (O'Brien 2017).

4 Metodika

4.1 Skleníkové pokusy

Datum zahájení pokusu (inokulace sterilního substrátu inokulem): 11.3. 2020

Aplikace biologických přípravků: 12.3. 2020

Setí pokusu: 16.3. 2020

Sbírání vzorků na laboratorní analýzy: 14.5. 2020

Místo: skleníky České zemědělské univerzity

4.1.1 Použitý materiál

4.1.1.1 Odrůdy řepky použité v diplomové práci

Ve skleníkových pokusech byly použity dvě odrůdy řepky olejky – Croquet a Inspiration, ani jedna z nich nemá deklarovanou rezistenci k patogenu *V. longisporum*, ale ve sledování pokusů se odrůda Croquet jeví jako potenciálně odolná.

Setí pokusu probíhalo 5 dní od zahájení pokusu, řepka byla seta do sadbovače.

Croquet

Odrůda Croquet má deklarovanou rezistenci vůči nádorovitosti brukvovitých (*Plasmodiophora brassicae*) a také rezistenci vůči fómové hnilobě. Jedná se o hybrid se středním až pozdním termínem setí, je určen výhradně na pozemky s výskytem patogenu *Plasmodiophora*. Tato odrůda je vhodná na všechny druhy půd včetně těžkých jílovitých. Díky vysoké odolnosti proti poléhání a deklarovaným rezistencím je odrůda dobře vybavena pro náročné podmínky jako jsou vlhké a zamokřené pozemky zatížené jednak tlakem houbových chorob a také patogenem *P. brassicae*. Po zasetí má velmi rychlý podzimní start, velmi dobrý zdravotní stav a také vysokou regenerační schopnost, to vše zajišťuje dobré přezimování. Obsah oleje v semenech je velmi vysoký (Rapool 2021).

Inspiration

Odrůda Inspiration je středně raný až polopozdní hybrid, její habitus je masivní, včetně silného kořene. Vzdrost této odrůdy je střední až vyšší, výška se pohybuje kolem 151 cm. Inspiration má prodlouženou délku plodného patra. Obsah oleje v semenech této odrůdy je velmi vysoký. Je vhodná do různých oblastí, na lehké i střední půdy, ale zejména na půdy těžké. Ideální termín výsevu je raný až středně pozdní. Na jaře a na podzim se za standardní považuje ošetření regulátory růstu, které ještě podporuje již geneticky dané větvení. Má velmi dobrou odolnost k příušškům a také regenerační schopnost (Rapool 2019; Stárek 2012).

Inspiration má vyšší výnos v chladnějších oblastech, velmi dobře přezimuje a je výnosově indiferentní, což znamená, že příliš nereaguje na intenzitu agrotechniky (Baranyk et al. 2016).

V dřívějších pokusech prováděných na pracovišti KOR ČZU byla odrůda Inspiration vyhodnocena jako náchylná k houbovým patogenům.

4.1.1.2 Biologické přípravky použité v diplomové práci

Byly aplikovány biologické přípravky využívající houby a bakterie – Clonoplus (*Clonostachys* spp.), Contans (*Coniothyrium minitans*), Gliorex (*Clonostachys* spp., *Trichoderma* spp.), Hirundo (*Bacillus* spp.), Integral Pro (*Bacillus amyloliquefaciens* kmen MBI 600), Polyversum (*Pythium oligandrum*), Prometheus (*Pseudomonas veronii*), Xilon (*Trichoderma asperellum* kmen T34).

Aplikace biologických přípravků proběhla 4 dny před setím pokusu, přípravky byly aplikovány pipetou na povrch půdy, do stejného místa, kam bylo předtím aplikováno inokulum.

Clonoplus

Clonoplus je pomocný přípravek, který obsahuje konidie 4 kmenů hub *Clonostachys* spp., přípravek je distribuován ve formě dispergovatelného (smáčitelného) prášku bělavé barvy. V 1 g prášku je obsaženo 1×10^7 konidií hub *Clonostachys* spp.

Houby *Clonostachys* spp. se běžně vyskytují v půdě a pomáhají rozkládat organické zbytky, čímž u rostlin zvyšují příjem živin z půdy. Další pozitiva, která tyto houby pro rostliny přinášejí jsou podpora tvorby bakteriálních hlízek, zvýšení odolnosti rostlin proti stresu, zvýšení počtu vzešlých rostlin a také zvýšení dynamiky růstu rostlin. Přes zimní období jsou houby *Clonostachys* spp. schopny rozložit v půdě uložené zárodky (sklerocia, mikrosklerocia, gemy a chlamydostry) patogenních hub jako jsou např. *Claviceps* spp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solanii*, *Verticillium* spp. a také některé druhy fusarií.

Přípravek je určen k aplikaci do půdy, substrátů nebo na osivo a sadbu, není vhodná aplikace na nadzemní části rostlin. Dále také může být Clonoplus použit k ošetření kompostů. Doporučené dávkování je 4 kg/ha (Fytovita 2021).

Contans

Tento pomocný biologický přípravek obsahuje spory houby *Coniothyrium minitans* v koncentraci 1×10^{12} spor/1 kg přípravku. Přípravek je ve formě dispergovatelného granulátu, jehož doporučené dávkování je u řepky 1-2 kg/ha.

Konidie hub obsažené v přípravku po aplikaci na půdu či posklizňové zbytky a následném zapravení infikují a parazitují sklerocia houby *Sclerotinia* spp., která se následně rozpadají. Přípravek musí být dobře promíchán s půdou, parazitace sklerocií probíhá do hloubky 10 cm a při teplotách nad 1°C. Při zmrznutí půdy *Coniothyrium minitans* pozastavuje růst, ale neodumírá a po zvýšení teplot opět začíná parazitovat.

Contans se používá pro regulaci hub *Sclerotinia* spp. u řepky, hořčice, slunečnice, máku, aromatických a léčivých rostlin, luskovin, zeleniny a také okrasných rostlin a tabáku. U řepky se přípravek aplikuje před podzimním výsevem, možná je také aplikace po vzejití řepky, či ošetření posklizňových zbytků řepky, které obsahují sklerocia, čímž se předchází zamoření pozemku sklerocií (Agromanuál 2021; Bayer 2021).

Gliorex

Gliorex je biologický přípravek určený pro užití při ochraně rostlin proti houbovým patogenům jako jsou např. *Rhizoctonia solanii*, *Sclerotinia sclerotiorum* a *Botrytis cinerea*.

Je distribuován ve formě bílého smáčitelného prášku, který je ve vodě nerozpustný, ale tvoří suspenzi. V jednom gramu přípravku je 5×10^7 konidií hub *Clonostachys* spp. a *Trichoderma* spp. Přípravek je určen pro ošetření osiva či sadby, substrátu a půdy. Je také možné ho aplikovat jako zálivku.

Gliorex obsahuje konidie hub, které se přirozeně vyskytují v půdě. Konidie po aplikaci přípravku v půdě vyklíčí a v okolí kořenů ošetřené rostliny vyrostou mycelium, které nejen zabraňuje rozvoji patogenních hub, ale také rozkládá organické zbytky, čímž pro rostlinu zpřístupňuje živiny. Gliorex také podporuje rostliny při vzcházení. Během zimního období mohou mycelia hub obsažených v přípravku napadat a ničit klidová stadia patogenních hub, např. již zmíněných *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solanii* a v neposlední řadě také *Verticillium* spp. (Fytovita 2019).

Hirundo

Biologický přípravek Hirundo je registrován v kategorii hnojiv a je určen pro použití do porostů řepky, hořčice, máku a všech druhů zeleniny. Obsahuje bakterie *Bacillus* spp. a jeho formulace je tekutá a doporučená aplikační dávka je 1 l/ha.

Účinnost tohoto přípravku je založena na symbióze mezi kořeny hostitelské rostliny a bakteriemi. Bakterie kolonizují kořeny a produkují látky na bázi fytoalexinů, které udržují fytopatogenní houby (např. *Sclerotinia* spp., *Phoma lingam*, *Verticillium* spp. a *Botrytis cinerea*) v odstupu od kořenů. Bakterie rodu *Bacillus* také napomáhají mineralizaci organické hmoty, čímž zlepšují dostupnost živin a podporují růst rostlin.

Přípravek Hirundo je doporučen pro použití do půd s vysokým obsahem organických látek. Aplikace přípravku může být předset'ová, či přímo do porostu, ať už na podzim či na jaře. Bakterie snášejí široké rozmezí teplot, ale jsou citlivé na UV záření. Proto je doporučeno se při aplikaci vyvarovat ostrého slunečního svitu, je tedy vhodné aplikovat za oblačného počasí nebo navečer (Monastechnology 2021).

Integral Pro

Fungicidní biologický přípravek Integral Pro obsahuje bakterie *Bacillus amyloliquefaciens* kmene MBI 600 v koncentraci $2,2 \times 10^{10}$ CFU (jednotky tvořící kolonie)/1 ml přípravku. Integral Pro je ve formě kapalného suspenzního koncentrátu, je určen k moření osiva řepky a doporučené dávkování je 160 ml/100 kg osiva.

Mechanismus účinku tohoto přípravku je založen na osídlení kořenů hostitelské rostliny bakteriemi, které na nich vytvoří ochrannou zónu, jíž patogen nepronikne a ani jeho spóry v této zóně nemohou klíčit. Bakterie *Bacillus amyloliquefaciens* má silný fungicidní a antibakteriální účinek, a navíc u rostliny vyvolává systemickou obrannou odpověď vůči patogenům.

Integral Pro je určen k použití proti patogenu *Phoma lingam* a také je možná jeho aplikace za účelem stimulace růstu rostlin řepky, což napomáhá redukcii škod způsobených dřepčíky rodu *Psylliodes* a *Phyllotreta* (Agrofert 2019).

Polyversum

Tento přípravek obsahuje oospory organismu *Pythium oligandrum* v koncentraci 1×10^6 spor/1 g přípravku. Je distribuován ve formě smáčitelného prášku.

Je určen k ochraně mnoha plodin jako jsou řepka, pšenice, ječmen, brambory, cukrovka, mák, hrách, sója, slunečnice a dále chmel, vinná réva či jahody, okurky, rajčata a jiná zelenina. Využívá se k ochraně plodin proti antraknóze, fuzarióze, rzi, stéblolamu, helmintosporiíze, sklerotiniové hnilobě, fomové hnilobě a jiným houbovým chorobám.

Při ochraně řepky účinkuje proti sklerotiniové hnilobě, fomové hnilobě a v poloprovozních pokusech se prokázala účinnost i proti verticiliovému vadnutí. Aplikace probíhá ve třech termínech. První aplikace ve fázi BBCH 14-16 a má za cíl prevenci fomové hniloby a parazitaci na sklerociích hlízenky (*Sclerotinia sclerotiorum*) uložených v půdě. Druhá aplikace probíhá ve fázi BBCH 30-39 a jejím účelem je potlačení dalšího vývoje fomové hniloby, podpora rostliny během regenerace po zimním období a likvidace apothecií hlízenky. Poslední aplikace se provádí ve fázi BBCH 40-65 a zabraňuje dalšímu šíření hlízenky.

Mechanismy, kterými *Pythium oligandrum* reguluje patogenní organismy, jsou mykoparazitismus, indukovaná rezistence a stimulace růstu. Během mykoparazitismu *P. oligandrum* enzymaticky napadá a rozkládá tělo patogenního organismu. Při indukované rezistenci *P. oligandrum* u rostliny stimuluje mechanismus bariér v rostlinných pletivech. A také *P. oligandrum* stimuluje produkci růstově stimulujících látek (Biopreparáty 2019).

Prometheus

Prometheus je biologický pomocný přípravek, který jako bioagens používá živé bakterie bakterie rodu *Pseudomonas veronii* v tekutém médiu. Doporučená aplikační dávka je 1 l/ha. Přípravek je určen k použití do porostů řepky, máku, slunečnice a také na všechny druhy zeleniny.

Účinek tohoto přípravku je založený na volné symbióze mezi kořeny hostitelské rostliny a bakteriemi. Bakterie obsažené v přípravku Prometheus kolonizují kořeny, čímž rostlinu chrání před houbovými patogeny jako jsou *Sclerotinia* spp., *Phoma lingam*, *Verticillium* spp. *Botrytis cinerea*. Bakterie *Pseudomonas* spp. také produkují látky, které inhibují růst houbových patogenů a udržují je v odstupu od kořenů. I v letech, kdy není velký tlak houbových chorob, dosahují porosty ošetřené přípravkem Prometheus vyšších výnosů, a to díky schopnosti bakterií uvolňovat a zpřístupňovat živiny. Tento efekt je způsoben metabolickou aktivitou bakterií, která upravuje pH směrem k vyšším hodnotám a tím zpřístupňuje formy fosforu, uvolňuje živiny z organické hmoty její mineralizací a uvolňuje živiny, které jsou jinak pevně vázány v anorganických sloučeninách.

Prometheus je vhodný k užití na půdách s nižší bonitou, které nalezneme v podstatě na celém území České republiky kromě oblastí Polabí a Hané. Použití přípravku se nedoporučuje na půdách s vysokým obsahem organických látek a zásaditou reakcí.

Bakterie rodu *Pseudomonas* se používají při likvidaci kontaminace ropnými deriváty. V pokusech se prokázalo, že bakterie použité v přípravku Prometheus odbourávají rezidua pesticidů.

Při aplikaci je nutné se vyvarovat vystavení bakterií ostrému slunečnímu svitu, protože jsou citlivé na UV záření, je doporučeno přípravky aplikovat za oblačnosti nebo navečer. Přípravek by měl být aplikován do vlhké půdy nebo těsně před deštěm, aby se bakterie mohly dobře dostat do půdy a ke kořenům (Monastechnology 2021).

Xilon

Biologický fungicid Xilon obsahuje houbu *Trichoderma asperellum* kmen T34. Slouží k ochraně kukuřice, slunečnice a sóje proti houbovým chorobám přenosným z půdy, např. kořenomorce (*Rhizoctonia* spp.), fuzáriu (*Fusarium* spp.), hlízence obecné (*Sclerotinia sclerotiorum*) a rodu *Verticillium* (*Verticillium albo-atrum* a *Verticillium longisporum*).

Xilon kolonizuje kořeny, čímž chrání rostlinu proti napadení patogeny z půdy a vede k optimálnímu čerpání vody a živin, zvláště za sucha. Ve vlhkých letech dokáže významně snížit obsah škodlivých mykotoxinů v kukuřici. Dále houba obsažená v přípravku Xilon působí jako očkovací látka a posiluje imunitní systém rostliny, díky čemuž je rostlina schopná lépe odolávat napadení houbovými patogeny (VP AGRO 2021).

4.1.1.3 Inokulum *Verticillium longisporum*

Umělá inokulace proběhla aplikací 1 ml roztoku suspenze spor (8×10^7 spor v 1 ml). Příprava suspenze spor proběhla v laboratorních podmínkách.

Pro přípravu houbových patogenních kultur byly použity výřezy z agaru porostlého patogenem *V. longisporum*, které byly převedeny do 150 ml PDA broth tekutého živného média (PDA broth), a po dobu jednoho týdne ponechány inkubaci při 23 °C za neustálého míchání. Po sedmidenní inkubaci bylo mycelium přefiltrováno přes síto, a tak byla získána suspenze spor a naředěna na potřebnou koncentraci (8×10^7 spor v 1 ml) (Eynck 2008). Množství spor, které bylo aplikováno, bylo spočítáno pomocí Bürkerovy komůrky.

4.1.2 Design experimentu

Každá varianta s inokulovaným substrátem měla 4 opakování, ve kterých bylo 10 rostlin řepky ozimé. Varianty bez inokulovaného substrátu byly provedeny pouze ve dvou opakováních po 5 rostlinách, jak je patrné v následující tabulce č.2. Jednotlivá opakování byla náhodně rozmístěna ve skleníkové kóji.

Substrát		Substrát inokulovaný		Substrát bez inokulace	
Odrůda řepky		Croquet	Inspiration	Croquet	Inspiration
Přípravek	Clonoplus	4x10	4x10	2x5	2x5
	Contans	4x10	4x10	2x5	2x5
	Gliorex	4x10	4x10	2x5	2x5
	Hirundo	4x10	4x10	2x5	2x5
	Integral Pro	4x10	4x10	2x5	2x5
	Polyversum	4x10	4x10	2x5	2x5
	Prometheus	4x10	4x10	2x5	2x5
	Xilon	4x10	4x10	2x5	2x5
kontrola		2x5	2x5	2x5	2x5

Tabulka 2: Varianty a počty opakování ve skleníkovém pokusu.

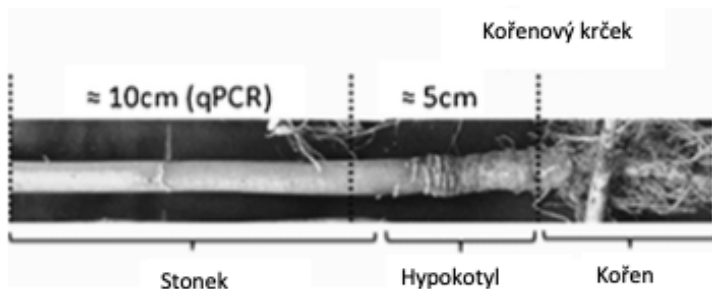
4.1.3 Hodnocení experimentu

Na konci skleníkového pokusu bylo z každé varianty odebráno 10 rostlin pro laboratorní analýzu. V době odběru byly rostliny ve fázi BBCH 14 – 16.

4.2 Laboratorní analýza

4.2.1 Příprava vzorků

Z rostlin určených pro laboratorní analýzu byla odebrána část stonku podle následujícího obrázku,



Obrázek 2: Část stonku nejvhodnější pro metodu qPCR (Knüfer et al. 2016, upraveno).

Rostliny byly zbaveny povrchových nečistot. Nejprve byly ponořeny do 70% ethanolu po dobu 2 minut, poté ponořeny do 30% přípravku Savo po dobu 10 minut, a nakonec dvakrát promyty destilovanou vodou.

Očištěné stonky byly zmrazeny na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a poté vysušeny v lyofilizátoru, následně byly rozdrceny v kulovém mlýně. Byly vytvořeny směsné vzorky vždy ze dvou odebraných rostlin, byl odvážen vzorek o hmotnosti 0,1 g a následně byla izolována celková DNA.

4.2.2 Izolace celkové DNA pomocí CTAB

1. Lyofilizovaný biologický materiál (kořeny řepky) byl rozdrcený v kulovém mlýnu na prášek, který byl převeden pomocí sterilní špachtle do mikrozkušavky (navážka 100 mg). Mikrozkušavka byla umístěna do tekutého dusíku a následně buď uskladněna v mrazícím boxu ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$), nebo ihned použita pro izolaci totální DNA.
2. Ke vzorku byly přidány tři drtící koule (o průměru 3 mm) a 100 μl CTAB pufru (těsně před použitím byl do pufru přidán 2-merkapt ethanol v poměru 1 ml CTAB/ 1,56 μl 2- merkapt ethanolu).
3. Vzorek byl homogenizován pomocí oscilačního mlýna po dobu 1,5 minuty rychlostí 30 kmitů za sekundu. Poté bylo do mikrozkušavky přidáno 400 μl CTAB pufru a vzorek byl podobu 2 minut třepán stejnou rychlostí.
4. Poté bylo do mikrozkušavky přidáno dalších 400 μl CTAB pufru a vzorek byl inkubován 1 hodinu při $64\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5. Ke vzorku byl přidáno 900 μ l směsi fenol DNA (pH 8) a chloroform-izoamylalkoholu (24:1) v poměru 1:1. Vzorek byl třepán (2200 RPM, 10 minut) a následně centrifugován (7000 x g, 10 minut, 4 °C).
6. Poté byla do nové zkumavky převedena vodní fáze a tento krok byl jednou zopakován [přidáno stejné množství fenol (pH 8): chloroform-izoamylalkoholu (24:1) v poměru 1:1, třepání, centrifugace].
7. Vodní fáze byla převedena do nové mikrozkušavky a ke směsi bylo přidáno stejné množství chloroform-izoamylalkoholu (24:1). Vzorek byl třepán (2200 RPM, 10 minut), poté centrifugován (7000 x g, 10 minut).
8. Vodní fáze byla převedena do nové mikrozkušavky, do které bylo následně přidáno stejné množství ledového izopropylalkoholu. Směs byla promíchána (několikrát převrácena v ruce) a ponechána přes noc v mrazícím boxu (-24 °C), popřípadě pro urychlení postupu byl vzorek ponechán 3 x 3 minuty v tekutém dusíku.
9. Poté byl vzorek centrifugován (10 000 x g, 10 minut, 4 °C) a vodní fáze byla odstraněna. Peleta byla promyta ve 400 μ l chlazeného etanolu (70 %) a centrifugována (10 000 x g, 10 minut).
10. Po odstranění etanolové fáze byla mikrozkušavka ponechána při laboratorní teplotě inkubovat 10 minut, pro vysušení etanolu. Peleta byla rozpuštěna v 50 μ l TE pufru a vzorek byl uskladněn v mrazícím boxu (-28 °C) či ihned použit pro další analýzy.

složení CTAB pufr

2 % CTAB (cetyltrimethylamonium bromid)
0,1 M Tris (pH 8,0)
20 mM EDTA
0,7 M NaCl
2-merkaptetanol

přístrojové vybavení použité při izolaci

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

4.2.3 Quantitative polymerase chain reaction (Real-Time PCR)

Reakční směs:

SYBR Select Master mix 5 μ l (Applied Biosystems)

Primer mix 0,2 μ l

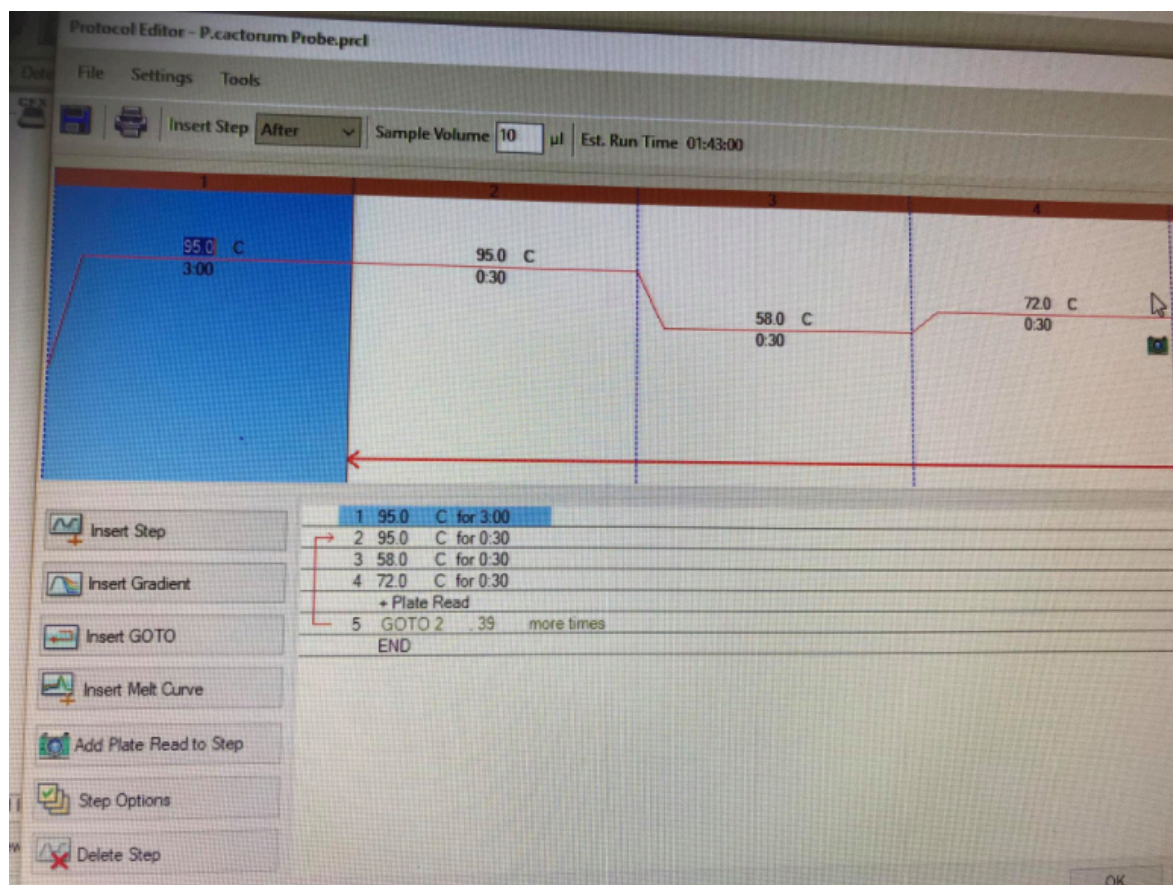
ddH₂O 3,8 μ l

DNA 1 μ l

Program:

Krok 1 aktivace při 95 °C 3 minuty, pak následoval krok 2 denaturace při 95 °C 30 sekund, krok 3 annealing při 58 °C 30 sekund a krok 4 amplifikace při 72 °C 30 sekund. Program měl od kroku 2 dalších 39 opakování.

Pro analýzu byl použit cycler BioRad CFX Connect Real-Time PCR Systém, na následujícím obrázku je vidět počítačový program použitý pro analýzu.



Obrázek 3: Program použitý pro Real-Time PCR

Primer (Knüfer 2011):

*OLG 70	Forward	CAGCGAAACGCGATATGTAG	261 bp
OLG 71	Reverse	GGCTTGTTAGGGGTTTAGA	

4.2.4 Hodnocení výsledků

Výsledky byly zpracovány v programech Microsoft Excel a STATISTICA 12.0 StatSoft. V programu STATISTICA proběhlo hodnocení pomocí jednofaktorové metody ANOVA či ANOVA s interakcemi a následně byly případné statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými variantami detekovány pomocí Tukeyova testu při post-hoc analýze.

5 Výsledky

5.1 Diagnostické laboratorní analýzy

	Verticillium		kontrola	
	Croquet	Inspiration	Croquet	Inspiration
kontrola	0	0,000010902511	0	0
	0	0,000010784255	0	0
	0	0,001275706580		
	0	0,000010512611		
	0	0,000010983254		
průměr	0	0,000263777842	0	0
Hirundo	0,000010738408	0,000000980852	0	0
	0,000012738508	0,000000970850	0	0
	0,000001042015	0,000000969850		
	0,000010238907	0,000000960851		
	0,000001242035	0,000000960851		
průměr	0,000007199975	0,000000968651	0	0
Prometheus	0,000001034211	0	0	0
	0	0	0	0
	0,000001024221	0		
	0	0		
	0,000001037213	0		
průměr	0,000000619129	0	0	0
Polyversum	0	0,000001005958	0	0
	0	0	0	0
	0	0,000001006259		
	0	0		
	0	0,000001011258		
průměr	0	0,000000604695	0	0
Xilon	0	0	0	0
	0	0	0	0
	0	0		
	0	0		
	0	0		
průměr	0	0	0	0
Clonoplus	0,001493305951	0	0	0
	0	0	0	0
	0,001323306251	0		
	0	0		
	0,001625305952	0		
průměr	0,000888383631	0	0	0

Gliorex	0	0,000001020404	0	0
	0	0,000000925663	0	0
	0	0,000001130453		
	0	0,000000978365		
	0	0,000000966363		
průměr	0	0,000001004249	0	0
Integral Pro	0,000001034755	0	0	0
	0,000001016512	0,000001028633	0	0
	0,000001037554	0,000001029632		
	0,000001016816	0,000001027635		
	0,000001036453	0		
průměr	0,000001028418	0,000000617180	0	0
Contans	0	0	0	0
	0	0	0	0
	0	0		
	0	0		
	0	0		
průměr	0	0	0	0

Tabulka 3: Množství DNA naměřené diagnostickou metodou Real-Time PCR v gramech DNA patogenu *Verticillium longisporum* na gram rostlinného materiálu

Hodnoty získané diagnostickou metodou Real-Time PCR uvedené ve výše uvedené tabulce č.3 ukazují, že u variant, které byly ošetřeny přípravky Contans a Xilon nebyl zaznamenán žádný výskyt patogenu *V. longisporum* ani u jedné z odrůd řepky.

U odrůdy Croquet dále nebyl zaznamenán výskyt patogenu u variant ošetřených přípravky Polyversum a Gliorex.

Odrůda Inspiration nebyla kromě již uvedených variant napadena patogenem ani ve variantách ošetřených přípravky Prometheus a Clonoplus.

Naopak u variant ošetřených přípravky Hirundo a Integral Pro byly patogenem napadeny obě odrůdy řepky.

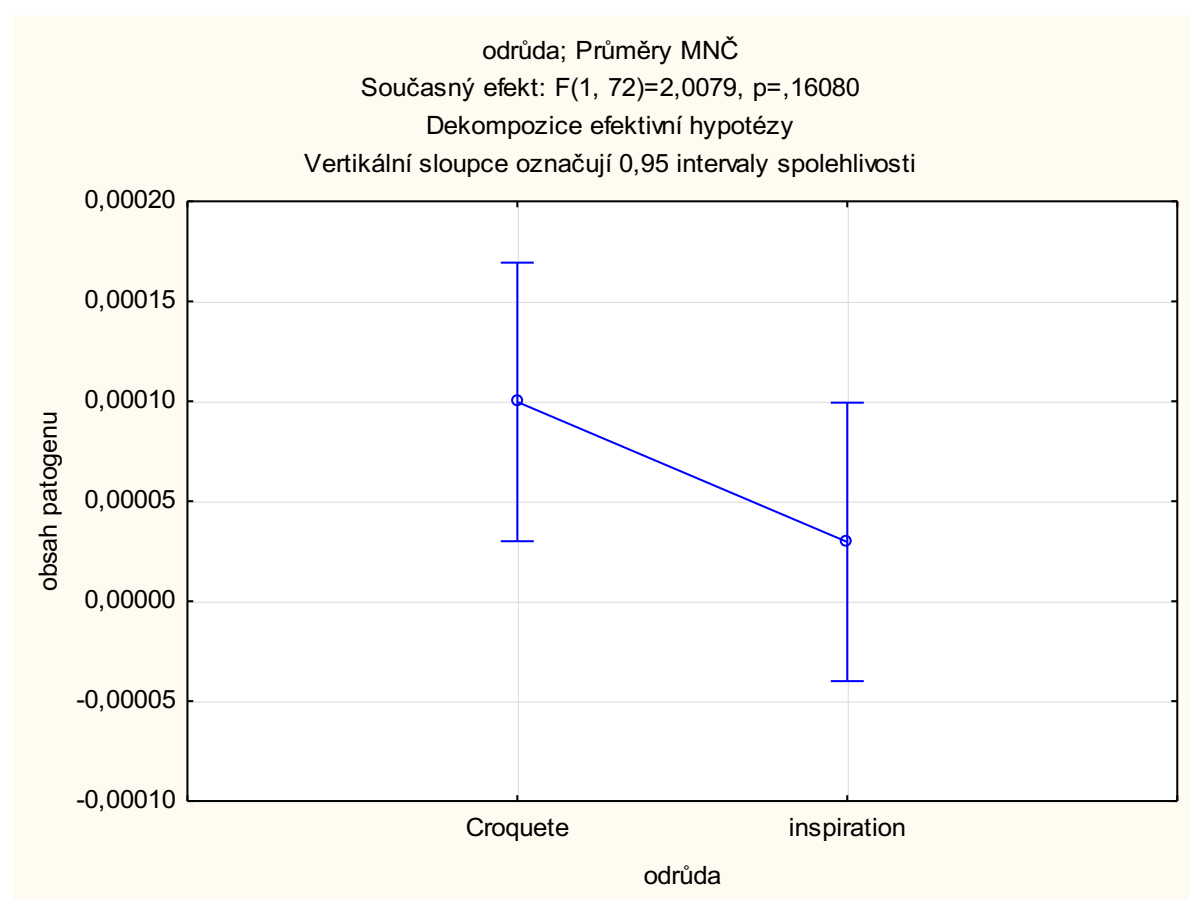
5.2 Statistické zpracování

Výsledky byly zpracovány v programu STATISTICA pomocí jednofaktorové metody ANOVA či metody ANOVA s interakcemi, při statisticky významných rozdílech následovala post-hoc analýza pomocí Tukeyova testu.

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro obsah patogenu Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. člen	0,000000	1	0,000000	6,850973	0,010791
odrůda	0,000000	1	0,000000	2,007852	0,160799
varianta	0,000002	8	0,000000	4,027643	0,000536
odrůda*varianta	0,000002	8	0,000000	4,632860	0,000136
chyba	0,000004	72	0,000000		

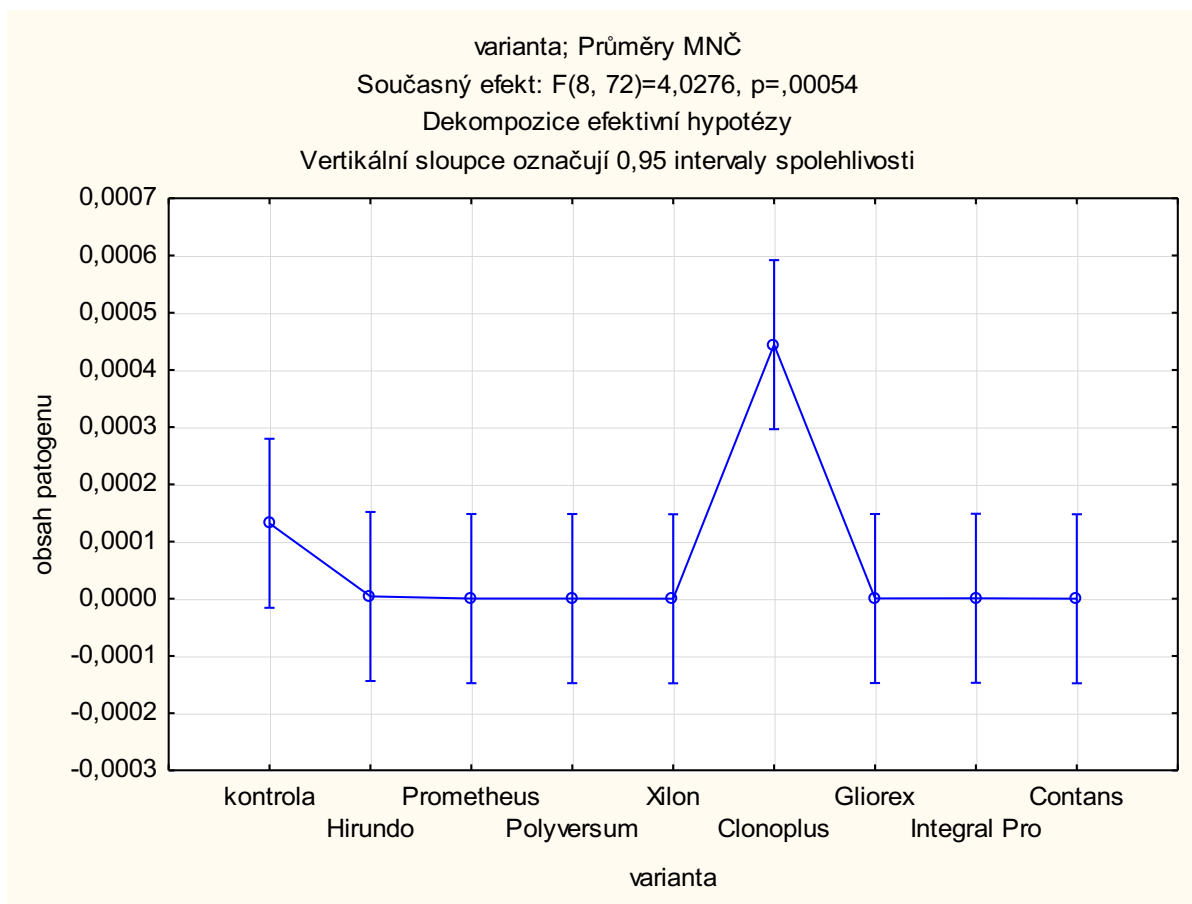
Tabulka 4: Jednorozměrné testy významnosti pro obsah patogenu.

ANOVA s interakcemi ukázala statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými variantami bez ohledu na odrůdu i v kombinaci odrůda-varianta. Nebyl ovšem prokázán žádný statisticky významný rozdíl mezi odrůdami řepky, co se obsahu patogenu týče.



Graf 1: Statistický rozdíl v obsahu patogenu mezi odrůdami řepky

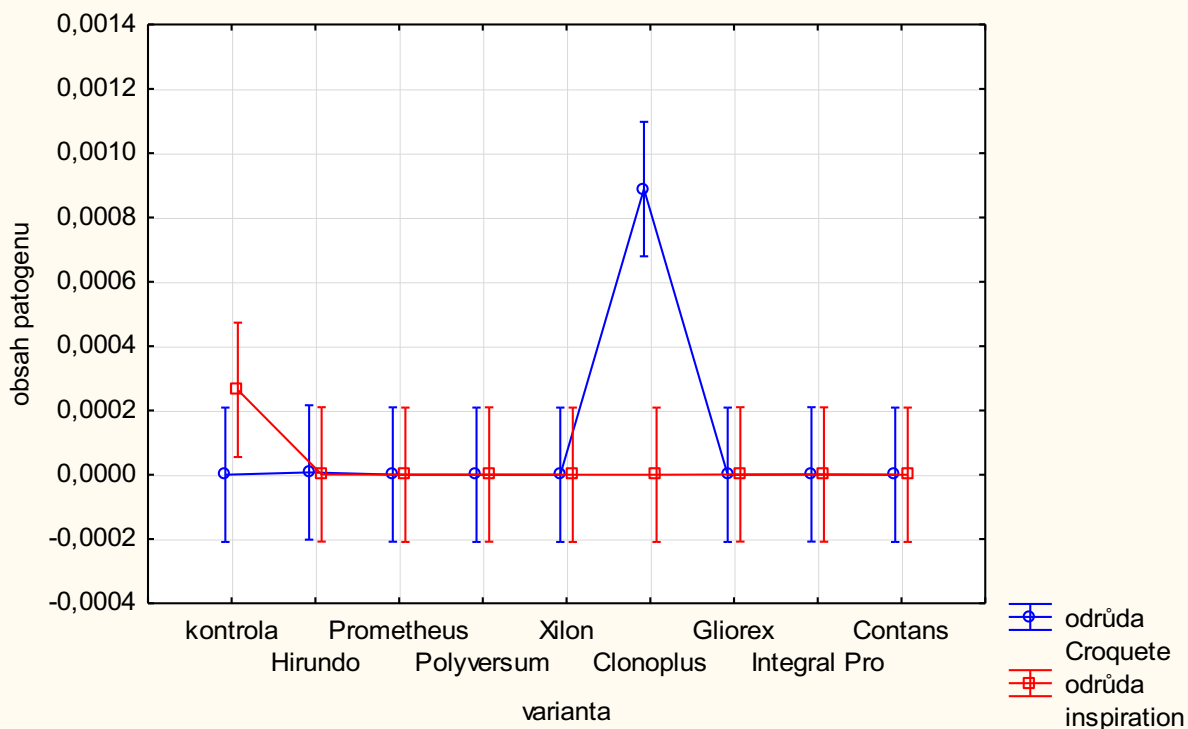
Ze statistického hodnocení uvedeného v grafu č.1 vyplývá, že mezi hodnotami DNA naměřenými u jednotlivých odrůd bez ohledu na variantu, není statisticky významný rozdíl.



Graf 2: Statistické rozdíly v obsahu patogenu mezi variantami bez ohledu na odrůdu řepky.

Při statistickém hodnocení jednotlivých variant bez ohledu na použitou odrůdu bylo dosaženo statisticky významného rozdílu. To tedy znamená, že některé varianty se významně statisticky liší v obsahu patogenu.

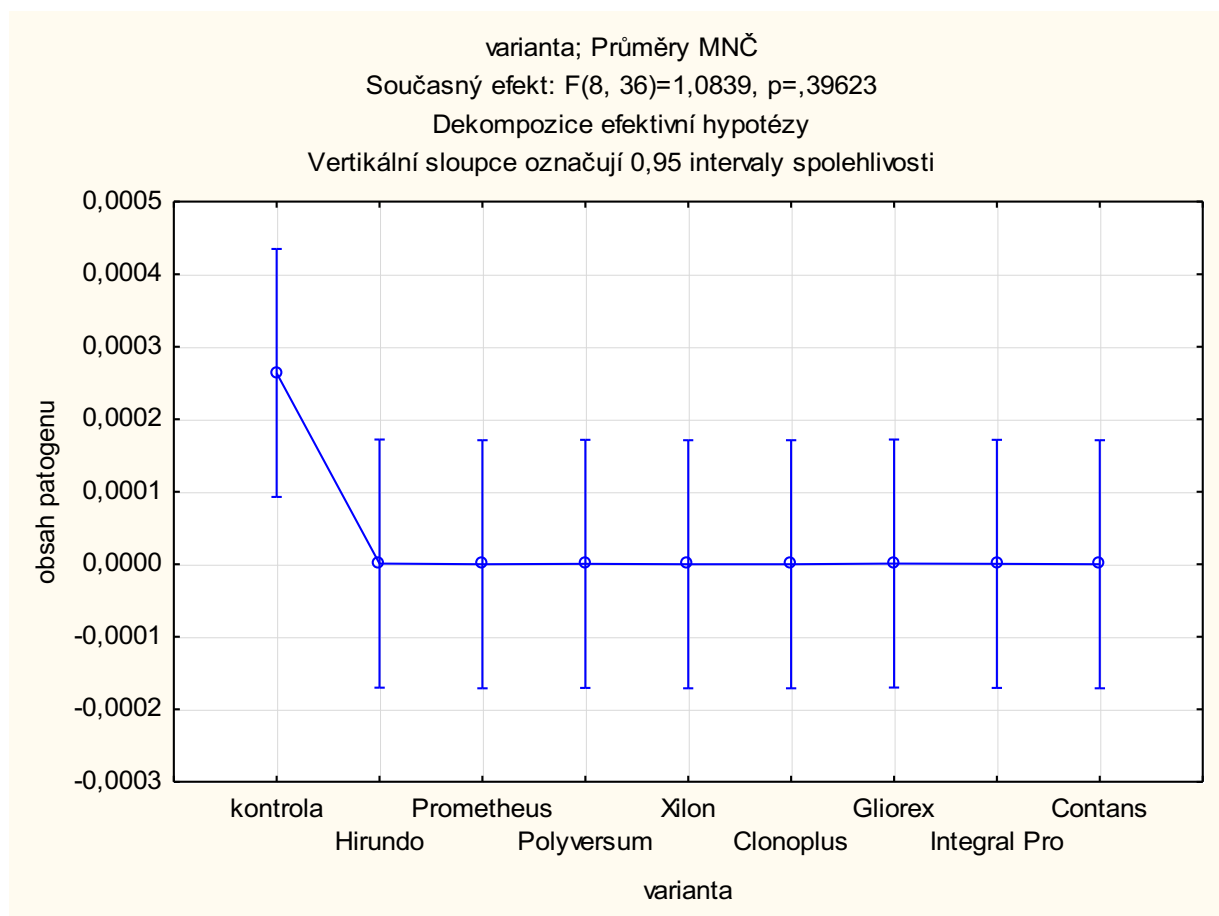
odrůda*varianta; Průměry MNČ
 Současný efekt: $F(8, 72)=4,6329$, $p=,00014$
 Dekompozice efektivní hypotézy
 Vertikální sloupce označují 0,95 intervaly spolehlivosti



Graf 3: Statistické rozdíly mezi odrůdami řepky i variantami ošetření

Výše uveden je souhrnný graf porovnávající mezi sebou jednak odrůdy, a zároveň i varianty ošetření. Byly zjištěny statisticky významné rozdíly.

Odrůda řepky Inspiration



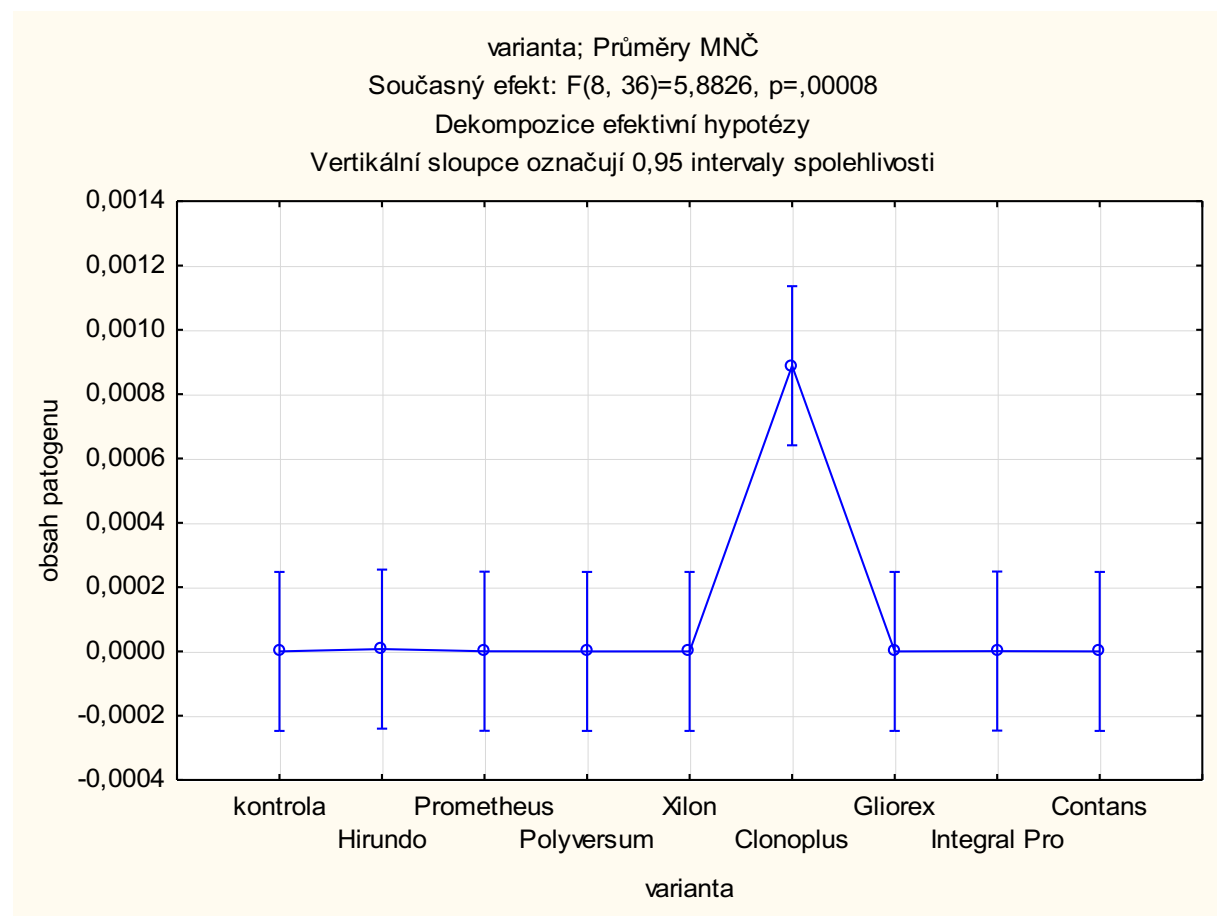
Graf 4: Statistické rozdíly mezi variantami ošetření u odrůdy Inspiration

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná obsah patogenu Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. $P\check{c} = ,00000$, $sv = 36,000$									
	varianta	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	kontrola		0,424952	0,420071	0,423113	0,420071	0,420071	0,425131	0,423176	0,420071
2	Hirundo	0,424952		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
3	Prometheus	0,420071	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
4	Polyversum	0,423113	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
5	Xilon	0,420071	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
6	Clonoplus	0,420071	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
7	Gliorex	0,425131	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
8	Integral Pro	0,423176	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
9	Contans	0,420071	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

Tabulka 5: Tukeyův HSD test, odrůda Inspiration

U jednotlivých variant odrůdy Inspiration nebyly zaznamenány významné statistické rozdíly. Nebyl tedy proveden post-hoc test.

Odrůda řepky Croquet



Graf 5: Statistické rozdíly mezi variantami ošetření u odrůdy Croquet

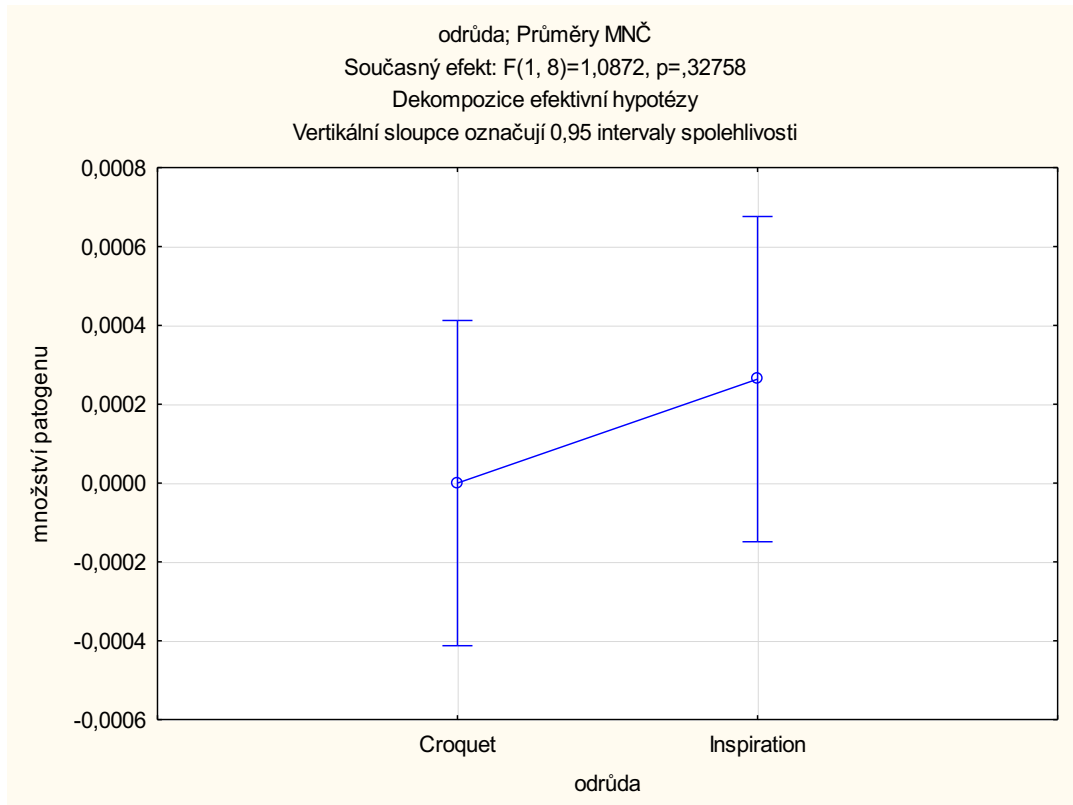
Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná obsah patogenu Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. $P\hat{C} = ,00000$, $sv = 36,000$									
	varianta	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		0,0000	,00001	,00000	0,0000	0,0000	,00089	0,0000	,00000	0,0000
1	kontrola		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,000411	1,000000	1,000000	1,000000
2	Hirundo	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,000448	1,000000	1,000000	1,000000
3	Prometheus	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	0,000414	1,000000	1,000000	1,000000
4	Polyversum	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	0,000411	1,000000	1,000000	1,000000
5	Xilon	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		0,000411	1,000000	1,000000	1,000000
6	Clonoplus	0,000411	0,000448	0,000414	0,000411	0,000411		0,000411	0,000416	0,000411
7	Gliorex	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,000411		1,000000	1,000000
8	Integral Pro	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,000416	1,000000		1,000000
9	Contans	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,000411	1,000000	1,000000	

Tabulka 6: Tukeyův HSD test, odrůda Croquet

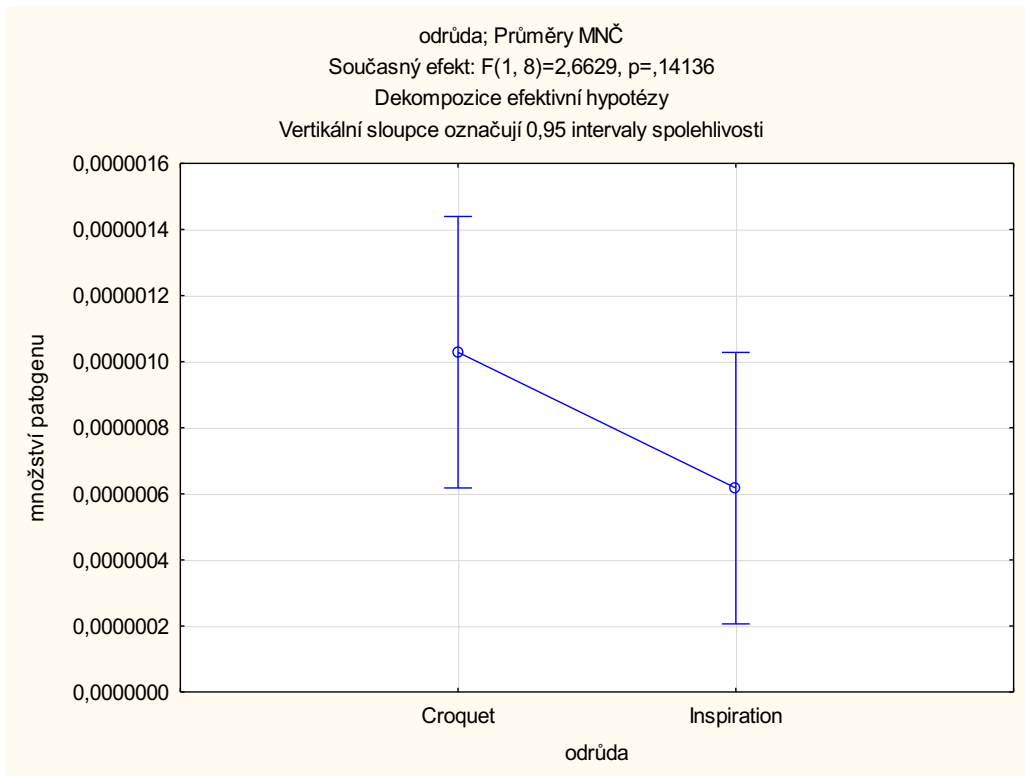
U odrůdy Croquet byl zjištěn statisticky významný rozdíl, byla provedena post-hoc analýza a byl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi variantou ošetřenou přípravkem Clonoplus a všemi ostatními variantami.

Varianty ošetření biologickými přípravky

Bylo provedeno i statistické hodnocení, ve kterém byly hodnoceny rozdíly v obsahu patogenu mezi odrůdami v rámci variant ošetřených stejným přípravkem. Přípravky Xilon a Contans nebyly hodnoceny vzhledem k nepřítomnosti patogenu *V. longisporum* v analyzovaných vzorcích.

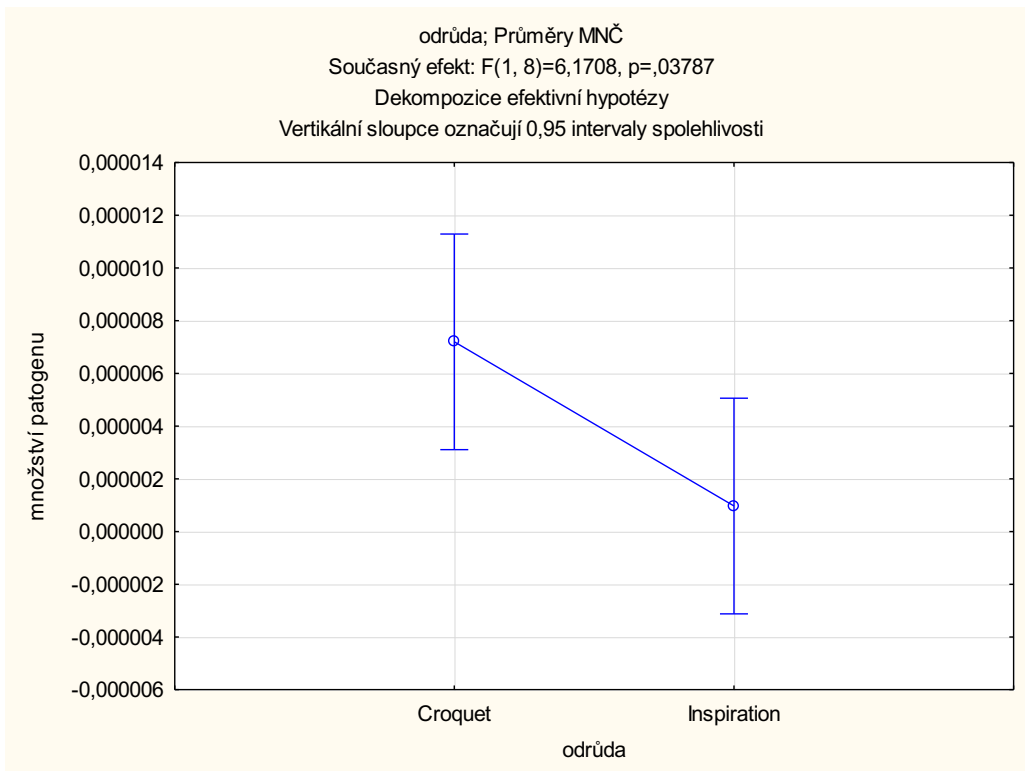


Graf 6: Jednofaktorová ANOVA rozdílů mezi odrůdami ve variantě neošetřené kontroly

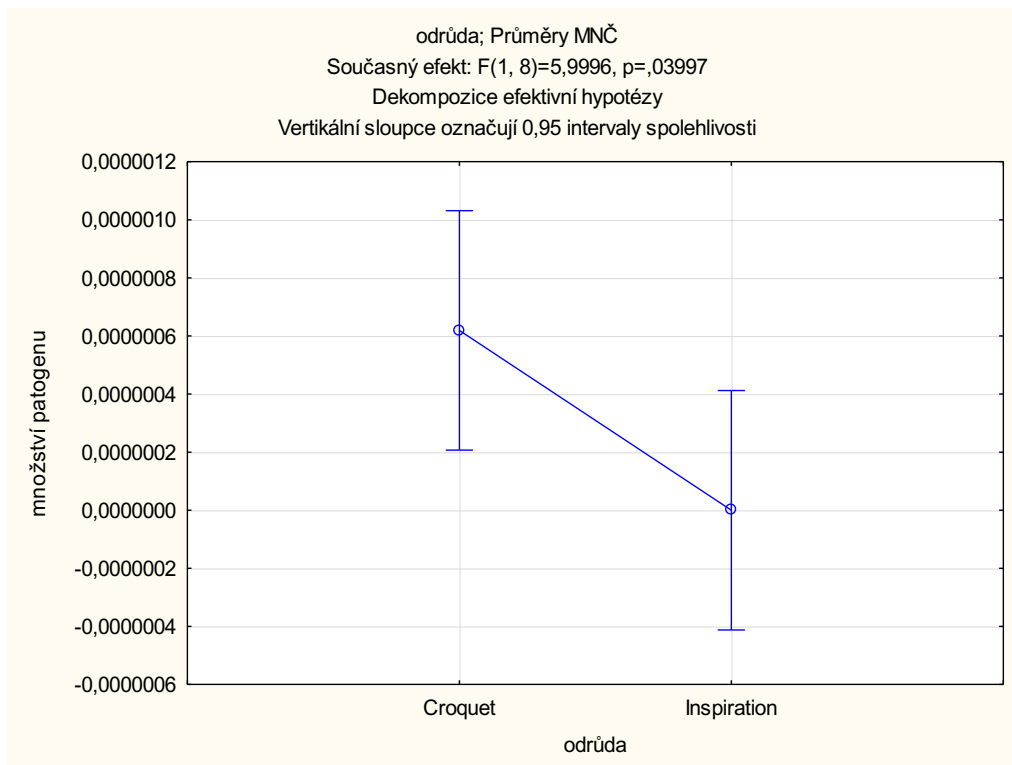


Graf 7: Jednofaktorová ANOVA rozdílů mezi odrůdami ve variantě Integral Pro

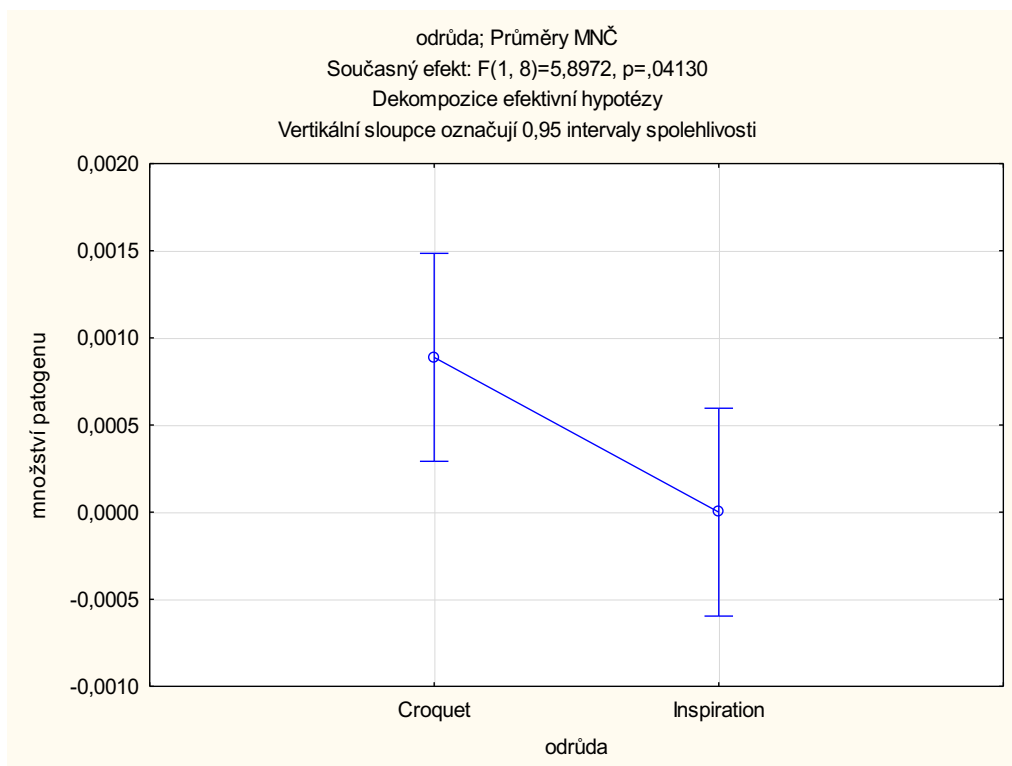
U kontrolních variant a u variant ošetřených přípravkem Integral Pro nebyl mezi odrůdami zjištěn statisticky významný rozdíl.



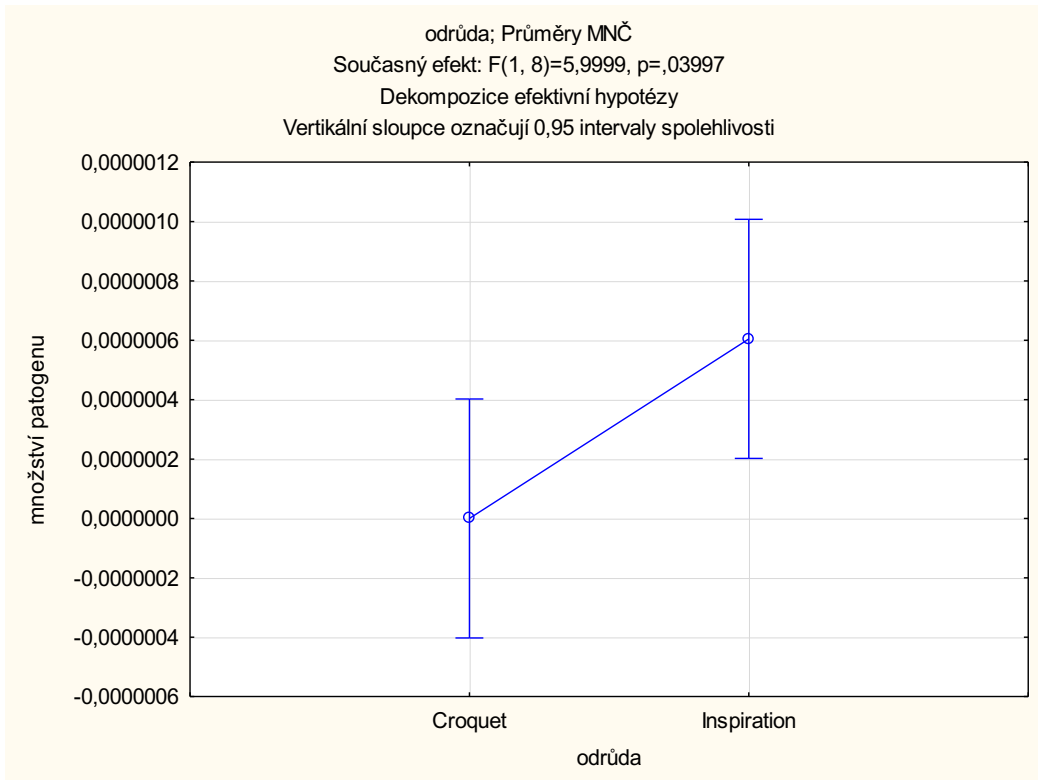
Graf 8: Jednofaktorová ANOVA rozdílů mezi odrůdami ve variantě Hirundo



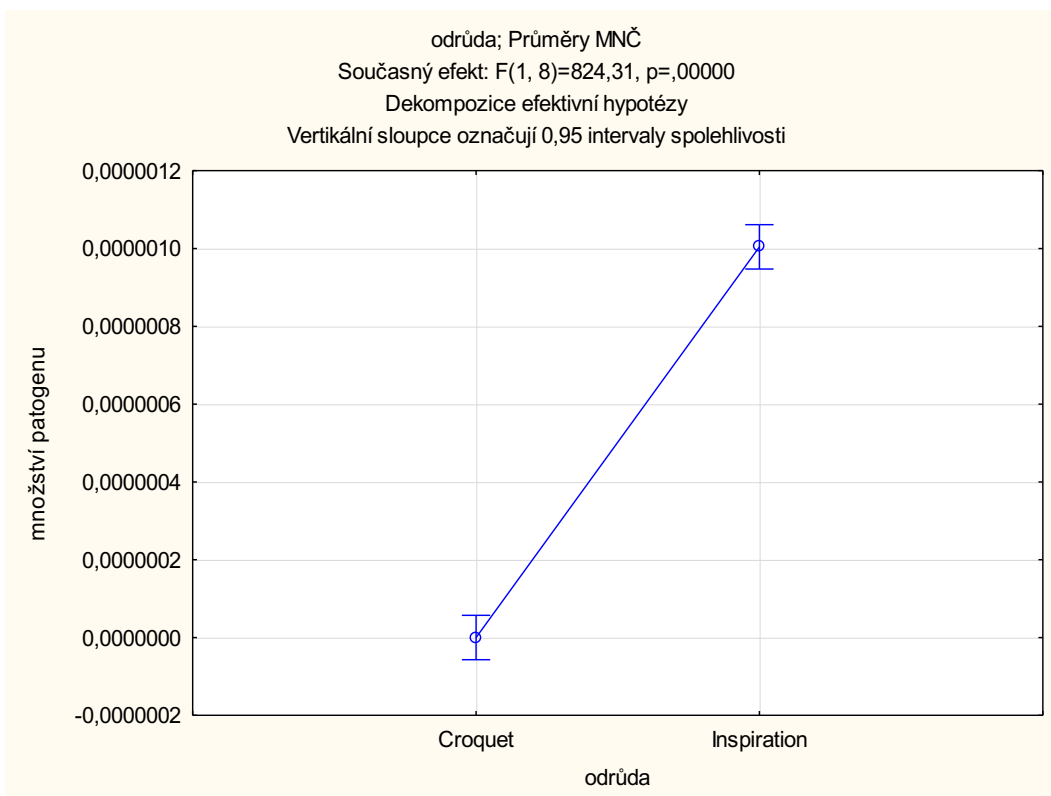
Graf 9: Jednofaktorová ANOVA rozdílů mezi odrůdami ve variantě Prometheus



Graf 10: Jednofaktorová ANOVA rozdílů mezi odrůdami ve variantě Clonoplus



Graf 11: Jednofaktorová ANOVA rozdílů mezi odrůdami ve variantě Polyversum



Graf 12: Jednofaktorová ANOVA rozdílů mezi odrůdami ve variantě Gliorex

Mezi odrůdami byl zjištěn statisticky významný rozdíl v případě variant ošetřených přípravky Hirundo, Prometheus, Clonoplus, Polyversum a Gliorex. Odrůda Inspiration obsahovala menší obsah patogenu při ošetření přípravky Hirundo, Prometheus a Clonoplus.

Odrůda Croquet v těchto případech obsahovala vyšší obsah patogenu, ale u variant ošetřených přípravky Polyversum a Gliorex tato odrůda vykazovala nižší obsahy patogenu.

6 Diskuze

Pythium oligandrum roste v rhizosféře mnoha kulturně pěstovaných rostlin, proto bylo předpokládáno, že lze tento organismus použít v ochraně proti houbovým patogenům napadajícím kořeny těchto rostlin. Původně byl izolován ze zabarvených kořenů *Pisum sativum* (Drechsler 1930). Jeho použitelnost byla ověřena při ochraně proti padání klíčnicích rostlin, zejména u řepy (Lutchmeah & Cooke 1985; McQuilken et al. 1990; Walther & Gindrat 1987), a houbovým chorobám (Benhamou et al. 1997; Vesely & Koubova 1993). *Pythium oligandrum* působí mykoparaziticky tím, že prorůstá dovnitř buněk hostitelských hyf, které rozkládá, a také může v určitých podmínkách produkovat antibiotika (Bradshaw-Smith et al. 1991; Laing & Deacon 1991).

Al-Rawahi a Hancock (1998) v pokusech prokázali, že *P. oligandrum* je schopné parazitovat *Verticillium dahliae* a má negativní vliv na jeho růst a schopnost tvořit mikrosklerocia. Výsledky jejich studie naznačují, že *P. oligandrum* na *V. dahliae* působilo mykoparaziticky, a ne pomocí inhibičních látek či kompeticí o živiny. Také bylo zjištěno, že interakce mezi houbami jsou silně ovlivněny přírodními podmínkami, ve kterých se odehrávají, jako je například teplota. Al-Rawahi a Hancock (1998) použili *P. oligandrum* k regulaci *V. dahliae* na paprikách a pozorovali značné snížení výnosových ztrát způsobených tímto patogenem, ale konstatují, že tento výsledek nebyl ovlivněn pouze přímou redukcí napadení patogenem, ale také stimulací růstu rostlin. Tato stimulace růstu byla popsána i u dalších plodin (Al-Rawahi 1995; Kratka et al. 1994).

Houba *Pythium oligandrum* je v předložené práci obsažena v biologickém přípravku s názvem Polyversum. Podle Kazdy et al. (2008) výsledky z pokusů ukazují, že je vhodné přípravek aplikovat již na podzim od rané fáze vegetace (BBCH 14-16). Dále autoři poukazují na to, že účinnost přípravku je pravděpodobně závislá na vysoké vlhkosti porostu. Na jaře může být porost ovlivněn velkým suchem, a proto doporučují včasnou aplikaci už na podzim, aby se organismus zvládl během vhodných podmínek v půdě etablovat a správně fungovat.

Rekanovic et al. (2007) ve svých pokusech potvrdili, že je opravdu důležité aplikovat spory *P. oligandrum* ve vhodnou dobu a do vhodných podmínek, aby došlo k požadované ochraně rostlin. Prokázalo se, že přípravek byl účinnější při aplikaci před inokulací patogenem než při aplikaci až po inokulaci substrátu patogenem. V jejich skleníkových pokusech při ochraně rostlin paprik sice došlo k lepším výsledkům při použití chemické ochrany, ale autoři konstatují, že i biologická ochrana byla úspěšná, zejména pokud se vezme v potaz její ekologické toxikologické výhody.

Dále byl přípravek Polyversum testován na chmelu, kde byl v pokusech podle Šedého (2016) prokázán dobrý účinek na patogen *Pseudoperonospora humuli*.

Testování přípravku Polyversum proběhlo i u řepky, kde ošetřené rostliny měly v průměru o 2 cm delší kořen než kořeny rostlin neošetřených. To podporuje hypotézu, že houba *P. oligandrum* nejen že ochraňuje rostlinu před napadením patogenem, ale také stimuluje její růst. V těchto pokusech byl hodnocen i zdravotní stav rostlin a byl porovnáván stav rostlin ošetřených chemickými a biologickými přípravky. Mezi variantami nebyly zjištěny žádné rozdíly, což naznačuje, že účinnost přípravku Polyversum je velmi dobrá, v tomto případě srovnatelná s účinností přípravků chemických (Procházková-Rulfová 2009).

V pokusech na ozimé pšenici a jarním ječmenu byl při použití přípravku Polyversum jako mořidla pozorován nárůst výnosů u těchto obilnin (Hýsek 2008).

V předložené diplomové práci byl přípravek Polyversum účinný při ochraně proti patogenu *Verticillium longisporum*. Zejména ve variantách s odrůdou Inspiration bylo dosaženo úspěchu, kdy nebyl patogen v pokusných rostlinách vůbec detekován. U odrůdy Croquet bylo dosaženo výsledků horších. Patogen detekován byl, ale pouze v množstvích srovnatelných s variantami ošetřenými jinými biologickými přípravky, kde byl také detekován. Nebyl prokázán žádný statisticky významný rozdíl mezi variantou ošetřenou přípravkem Polyversum a variantami ošetřenými jinými biologickými přípravky.

Houba *Coniothyrium minitans* byla poprvé izolována Campbellem (1947) ze sklerocií houby *Sclerotinia sclerotiorum*, který okamžitě předpokládal její využití v biologické ochraně. *Coniothyrium minitans* má schopnost napadat sklerocia mnoha askomycot, včetně hub z rodu *Sclerotinia*, ale není schopné napadat sklerocia basidiomycot (Whipps & Gerlagh 1992). Mechanismy biologické ochrany, kterými působí na sklerocia a hyfy patogenů, byly v pokusech popsány jako kompetice a mykoparazitismus (Whipps et al. 2008).

C. minitans bylo v pokusech úspěšně aplikováno do půdy pro regulaci sklerocií *S. sclerotiorum* u plodin jako jsou salát, celer (Budge & Whipps 1991), slunečnice (Huang & Hoes 1980), fazole (Gerlagh et al. 1999) a řepka (Luth 2001).

V této diplomové práci byla houba *Coniothyrium minitans* obsažena v přípravku Contans. Přípravek je běžně používán pro ochranu řepky proti patogenu *Sclerotinia sclerotiorum*, ale proběhly i pokusy s jeho účinností na patogeny *Phoma* spp. a *Verticillium* spp. Při hodnocení těchto pokusů bylo zjištěno, že poměr zelených stonků v porostech ošetřených přípravkem stoupl z 19,3 % na 68,6 % při porovnání s porosty neošetřenými, tedy téměř o 50 %. Podíl předčasně dozrávajících rostlin, symptom typický pro *Verticillium longisporum*, byl u neošetřené varianty 80,7 % a u ošetřené varianty 31,4 %. Velmi podobných výsledků bylo dosaženo i při hodnocení zdravotních stavů kořenů a kořenových krčků. Ve všech případech byl omezen výskyt sklerocií na stoncích, bázích stonků a kořenových krčcích a také bylo sníženo riziko napadení jinými chorobami, jako je fomové černání krčku řepky. Aplikace přípravku přispěla k redukci napadení kořenů rostliny patogeny *Verticillium* spp. (Riha 2018).

Při pokusech prováděných v rámci této diplomové práce vyšel použitý přípravek Contans mezi dvěma nejlepšími přípravky. Ani v jednom opakování u obou odrůd řepky nebyla při laboratorních analýzách detekována přítomnost patogenu *Verticillium longisporum*, je tedy možné předpokládat, že *C. minitans* bylo velmi úspěšné při ochraně rostlin řepky proti tomuto patogenu.

Houby rodu *Clonostachys* a zejména *Clonostachys rosea*, se v pokusech jeví jako výborní mykoparazité. Mechanismy biologické ochrany, kterými na patogeny působí je produkce enzymů rozkládajících buněčné stěny, produkce metabolitů působících antifungálně a vyvolání obranného mechanismu rostliny (Sun et al. 2020). Byla prokázána účinnost *C. rosea* proti mnoha různým patogenům, včetně *Alternaria* spp. (Jensen et al. 2004), *Fusarium* spp. (Schöneberg et al. 2015), *Botrytis cinerea* (Mouekouba et al. 2014), *Trichoderma* spp. (Krauss et al. 2013).

V českých podmínkách byla houba *C. minitans* zkoušena na luskoviny, kde byla v polních pokusech zaznamenána nižší infekce kořenů půdními patogeny, i když byly rostliny vystaveny silnému tlaku půdních fytopatogenních hub (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Pythium* spp. a jiné). U všech luskovin došlo ke zvýšení výnosu a HTS a také ošetření přípravkem podporovalo tvorbu kořenových hlízek. Dále byla *C. rosea* zkoušena v obilninách, kde měla pozitivní vliv na růst kořenů. Byly provedeny i pokusy s bramborami, česnekem a mrkví, kde bylo zaznamenáno omezení napadení rostlin brambor *R. solani*, u česneku došlo ke zvýšení výnosu a velikosti sklizených cibulí a u mrkve byl u variant ošetřených přípravkem zjištěn nižší počet nekrotizovaných kořenů než u neošetřené kontroly (Ondráčková et al. 2014).

Ondřej a Ondráčková (2014) ve svých pokusech na řepce zjistili, že *Clonostachys rosea* měla 100% inhibiční účinnost vůči houbě *Sclerotinia sclerotiorum*. V dalších pokusech byl zjištěn pozitivní vliv houby při regulaci houbového patogenu řepky *Phoma lingam*, ale účinek nebyl příliš výrazný (Havel & Ondráčková 2014). Při aplikaci houby *C. rosea* na semena řepky před setím byly pozorovány dobré výsledky při regulaci patogenu *Plasmodiophora brassicae* v řízených podmínkách (Andersen et al. 2018).

Houba *Clonostachys rosea* byla v této práci užita ve dvou biologických přípravcích, samostatně v přípravku Clonoplus a v kombinaci s houbami rodu *Trichoderma* v přípravku Gliorex. Clonoplus vyšel ve variantách s odrůdou řepky Croquet nejhůř ze všech použitých přípravků. Byly detekovány vysoké obsahy patogenu *Verticillium longisporum*, nejvyšší z celé práce. Špatná účinnost přípravku Clonoplus byla statisticky prokázána. Zároveň při použití na odrůdě řepky Inspiration nebyl při laboratorních analýzách detekován žádný obsah patogenu *V. longisporum*, což by naznačovalo dobrý účinek přípravku v kombinaci s touto odrůdou. Přípravek Gliorex vycházel při statistickém hodnocení průměrně, nebyl zaznamenán žádný statisticky průkazný rozdíl mezi tímto přípravkem a ostatními přípravky. Jak již však bylo řečeno, v tomto přípravku byly obsaženy také houby *Trichoderma* spp.

Další z hub používaných v biologické ochraně jsou i houby *Trichoderma* spp., které jsou už delší dobu úspěšně používány jako bioagens při ochraně plodin proti různým patogenním houbám jako jsou *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp., *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp. (Benitez et al. 2004). Mezi mechanismy, kterými *Trichoderma* působí na patogenní organismy, patří mykoparazitismus, kompetice a produkce antibiotik a enzymů (Howell 2003).

Fotoohiyan et al. (2017) aplikovali houby *Trichoderma harzianum* ve skleníkových pokusech za účelem regulace *Verticillium dahliae* na klíčících rostlinách pistácie. V těchto pokusech se prokázala jako účinná, u rostlin ošetřených bioagens byly příznaky napadení patogenem *Verticillium* méně časté než u rostlin neošetřených. Jiný druh, *Trichoderma asperellum*, byla Carrero-Carrón et al. (2016) aplikována na olivovníky, kde se prokázala její dobrá schopnost osidlovat rhizosféru a chránit rostlinu před infekcí *V. dahliae*. Dále byly houby *Trichoderma* spp. testovány proti *V. dahliae* na rostlinách rajčat, kde potvrdily svou schopnost omezovat růst mycélia patogenu. Ale také se ukázalo, že jsou tyto houby schopné působit na mikrosklerocia *V. dahliae*, rozkládat jejich buněčné stěny a tím přispívat k rozpadu mikrosklerocií (Jabnoun-Khiareddine et al. 2009).

V České republice byly biologické přípravky obsahující houby rodu *Trichoderma*, konkrétně *Trichoderma asperellum*, která je obsažena v přípravku Xilon, zkoušeny například při pěstování kukuřice. Po aplikaci těchto přípravků bylo zaznamenáno zlepšení kvality –

snížení obsahu mykotoxinů, zvýšení výnosu zrna i výnosu siláže. Také měly rostliny ošetřené houbami *Trichoderma* více větvené a hustší kořenové soustavy (Kuthan 2020).

V této práci byly použity dva biologické přípravky obsahující houby *Trichoderma* spp. a to Gliorex a Xilon (*Trichoderma asperellum*). Přípravek Xilon vyšel jako jeden z nejlepších, při laboratorních analýzách nebylo v žádném vzorku řepky ošetřeném přípravkem Xilon nalezeno DNA *V. longisporum*. Můžeme proto předpokládat, že houba *Trichoderma asperellum* v přípravku obsažená byla velmi účinná při regulaci houbového patogenního organismu *V. longisporum*. Druhý přípravek, Gliorex, ve kterém jsou kromě hub *Trichoderma* spp. obsaženy i houby *Clonostachys* spp., vycházel při hodnocení průměrně. Ve variantách odrůdy řepky Inspiration byla detekována přítomnost patogenu, ve variantách odrůdy Croquet přítomnost detekována nebyla.

V biologických přípravcích se používají nejen houby, ale také bakterie. Jedněmi z těchto bakterií jsou i bakterie rodu *Pseudomonas*. V pokusech se ukázalo, že bakterie tohoto rodu mají výbornou schopnost kolonizovat kořeny rostlin (Berg et al. 2006), produkují široké spektrum antibiotik a dalších metabolitů potlačujících mikroorganismy (O'Sullivan & O'Gara 1992) a také spouští obranný mechanismus rostlin (Haas & Défago 2005).

Účinnost *Pseudomonas* spp. byla úspěšně otestována v regulaci *Verticillium dahliae* u několika plodin – olivovníku (Gómez-Lama Cabanás et al. 2018), lilku (Malandraki et al. 2008), bavlníku (Erdogan & Benlioglu 2010, Tao et al. 2020) a brambor (Uppal et al. 2008) a to jak ve skleníkových, tak polních pokusech.

Při aplikaci bakterií *Pseudomonas* spp. na mák byl zaznamenán jejich účinek na redukcii skvrn na listech máku, dále také skvrn na stoncích, černě a skvrn na tobolkách a také plísňe na listech (Plachká 2018).

Ve studii, kterou provedli Abuamsha et al. (2011), se prokázalo, že aplikace antagonistické bakterie *Pseudomonas chlororaphis* na osivo řepky může snížit infekci rostlin patogenem *Verticillium longisporum* o 46 až 75 %.

Další studie, provedená Debode et al. (2007), ukázala, že bakterie *Pseudomonas* spp. působit i na mikrosklerocia *Verticillium* spp., snižovat jejich životaschopnost a tím narušovat životní cyklus patogenu a snižovat jeho výskyt v dalších letech.

V pokusech provedených na řepce, ve kterých byl aplikován přípravek Prometheus, který byl použit i v této práci a obsahuje bakterie rodu *Pseudomonas*, se ukázal jeho pozitivní vliv na délku a hmotnost kořene řepky. Délka kořenu byla v průměru o 32 % větší než průměr celého pokusu. Lepší výsledky byly dosaženy při aplikaci přípravku do porostu na podzim, než při aplikaci až na jaře. Nebyl však zaznamenán zvýšený výnos oproti jiným variantám v pokusu (Kuchtová et al. 2018).

Bakterie *Pseudomonas* spp. byly v této práci otestovány v přípravku Prometheus. Ten dobře fungoval u odrůdy řepky Inspiration, kdy nebyla přítomnost patogenu *V. longisporum* vůbec detekována. Hůře dopadla odrůda Croquet, u které patogen detekován byl, dokonce se statisticky průkazným rozdílem při porovnání s odrůdou Inspiration.

Kromě bakterií *Pseudomonas* spp. byly se při biologické ochraně používají také bakterie *Bacillus* spp.

Mansoori et al. (2013) testovali účinnost různých bakterií *Bacillus* spp. na verticiliové vadnutí bavlníku způsobované patogenem *Verticillium dahliae*. Jejich výsledky vyhodnotily bakterie *Bacillus* spp. jako účinné při snížení výskytu této choroby, přičemž nejlepší výsledky dosahoval kmen *Bacillus subtilis*. Ovšem ne všechny kmeny *Bacillus* spp. dosahovaly stejných výsledků, výsledky byly nevyrovnané.

Dobrych výsledků při použití *Bacillus velezensis* proti *V. dahliae* na bavlníku dosáhli v pokusech provedených Sherzad & Canming (2020).

V pokusech vedených Hollensteiner et al. (2017) v in vitro podmínkách se bakterie *B. thuringiensis* izolovaný z kořenů rostlin rajčete jevila jako dobrý kandidát na použití v biologických přípravcích, protože produkovala látky s antifungálními vlastnostmi.

Nevyrovnanost schopnosti jednotlivých kmenů *Bacillus* spp. působit proti patogenu *Verticillium* spp. potvrzuje i další studie, tentokrát provedená na řepce. *Bacillus amyloliquefaciens* se v pokusech na řepce jevil jako potenciálně vhodný bioagens in vitro se ukázal jako neúčinný při testování na rostlinách. Jiné kmeny *Bacillus* spp. se naopak ve stejné studii jevily téměř neúčinné v in vitro pokusech, ale při aplikaci na rostlinu dosáhly poměrně uspokojujících výsledků při regulaci patogenu *V. dahliae* na řepce (Uppal et al. 2008).

V českých podmínkách byly bakterie *Bacillus* spp. v přípravku Hirundo testovány například u kukuřice, u které nebyl pozorován žádný nárůst u výnosu biomasy (Tomášek & Cihlár 2016).

Dále byly bakterie *Bacillus* spp. testovány také u máku, kde také neprojevil příliš pozitivní vliv na výnos semen, na HTS a ani na obsah oleje v semenech. Co se vlivu na zdravotní stav rostlin týče, tak nebylo pozorováno žádné zlepšení při hodnocení výskytu plísně máku a mírné zlepšení při hodnocení přítomnosti pleosporové skvrnitosti máku v porostu (Plachká & Rychlá 2020).

V diplomové práci se bakterie *Bacillus* spp. vyskytovaly ve dvou použitých přípravcích, Hirundo (*Bacillus* spp.) a Integral Pro (*Bacillus amyloliquefaciens*). U obou přípravků byl detekován patogen *V. longisporum* ve variantách u odrůdy Croquet i u odrůdy Inspiration, ale nebyly prokázány žádné statisticky významné rozdíly při porovnání s ostatními přípravky. Lze konstatovat, že výsledky při použití bakterie *Bacillus amyloliquefaciens* dosažené v této práci lze srovnat s výsledky, kterých ve své studii se stejnou bakterií dosáhli Uppal et al. (2020).

7 Závěr

Hlavní cíl byl naplněn, pro účely diplomové práce byla otestována účinnost biologických přípravků (pomocných látek) proti patogenu *V. longisporum* v řízených podmínkách skleníků České zemědělské univerzity.

I stanovené dílčí cíle byly naplněny:

- 1) Metodika aplikace inokula *V. longisporum* do substrátu v řízených podmínkách byla otestována jako úspěšná.
- 2) Půdní aplikace biologických přípravků (pomocných látek) je prokázala jako vhodná.
- 3) Nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl mezi potenciálně odolnou variantou řepky (Croquet) a prokazatelně náchylnou odrůdou řepky (Inspiration).

Hypotéza, že existují biologické přípravky účinné proti patogenu *Verticillium longisporum* v řízených podmínkách, byla experimentálně potvrzena.

V pokusech nejlépe vyšly varianty ošetřené přípravky Xilon a Contans, u kterých nebylo ani u jedné odrůdy naměřeno žádné množství DNA patogenu *V. longisporum*. Naopak u přípravků Hirundo a Integral Pro byla zjištěna přítomnost patogenu u obou odrůd.

Vůbec nejvyšší obsah patogenu byl naměřen u odrůdy Croquet ve variantě ošetřené přípravkem Clonoplus. Neošetřená kontrola odrůdy Croquet byla vyhodnocena jako bez přítomnosti patogenu, ale po přidání přípravku Clonoplus byly naměřeny vysoké hodnoty patogenu.

Celkově lze konstatovat, že o účinnosti biologických přípravků může rozhodovat také odrůda řepky, na kterou jsou aplikované, protože v pokusech často pro jednotlivé odrůdy nevyházely srovnatelné hodnoty obsahu patogenu, přestože byly použity stejným způsobem a ve stejném množství. Závěrem lze říci, že použití některých přípravků se jeví jako podporující infekci ve vztahu k odrůdě. Tyto vztahy by měly být předmětem dalšího výzkumu.

8 Literatura

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

Al-Rawahi AK. 1995. Research and development of *Pythium oligandrum* Drechsler as a biocontrol agent and a plant growth promoting rhizofungus. Dissertation. University of California, Berkley.

Al-Rawahi AK, Hancock JG. 1998. Parasitism and Biological Control of *Verticillium dahliae* by *Pythium oligandrum*. *Plant Disease* **82**:1100-1106.

Andersen CB, Jørgensen HJL, Manzotti A, Jensen B. 2018. Seed coating with the fungal biocontrol agent *Clonostachys rosea* controls clubroot in oilseed rape. *IOBC/WPRS Bulletin* **136**:157-163.

Bagar M. 2011. Biologická ochrana rostlin: Metodické listy č. 12. Available at <http://www.eposcr.eu/wp-content/uploads/2011/04/ML12-Biologicka-ochrana.pdf> (accessed August 09, 2018).

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

Baranyk P. 2016. Stanovisko k odrůdové skladbě řepky pro rok 2016/2017. in Seznam doporučených odrůd. Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejin.

Baranyk P. 2019. Existují odrůdy řepky odolné proti verticiliu? *Úroda* **6**:53 - 56.

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

Bečka D, Vašák J, Zukalová H, Mikšík V. 2007. Řepka ozimá: pěstitelský rádce. Pro katedru rostlinné výroby, FAPPZ, ČZU v Praze vydalo vydavatelství Kurent, Praha.

Bečka D, Vašák J, Cihlář P, Bokor P. 2018. Výkonnostní porovnání odrůd řepky ozimé. Available at <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/osivo-a-sadba-1/vykonnostni-porovnan-odr-od-řepky-ozime> (accessed April 08, 2019).

Benhamou N, Rey P, Cherif M, Hockenhull J, Tirilly Y. 1997. 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.

Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Codón AC. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* **7**.

- Berg G, Opelt K, Zachow C, Lottmann J, Götz M, Costa R, Smalla K. 2006. The rhizosphere effect on bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus *Verticillium* differs depending on plant species and site. *FEMS Microbiology Ecology* **56**:250-261.
- Berlanger I, Powelson ML. 2000. *Verticillium* wilt. The Plant Health Instructor.
- Bogino P, Oliva M, Sorroche F, Giordano W. 2013. The Role of Bacterial Biofilms and Surface Components in Plant-Bacterial Associations. *International Journal of Molecular Sciences* **14**:15838-15859.
- Bokor P, Bečka D, Hudec K. 2013. Zdravotný stav porastov repky ozimnej na Slovensku vo vegetačnom roku 2012/2013. 69-72 in Sborník z konferencie „Prosperující olejniny“, 2013. Česká zemědělská univerzita v Praze. Katedra rostlinné výroby, Praha.
- Brader G, Compant S, Mitter B, Trognitz F, Sessitsch A. 2014. Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* **27**:30-37.
- Bradshaw-Smith RP, Whalley WM, Craig GD. 1991. Interactions between *Pythium oligandrum* and the fungal footrot pathogens of peas. *Mycological Research* **95**:861-865.
- Budge SP, Whipps JM. 1991. Glasshouse trials of *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma species* for the biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* in celery and lettuce. *Plant Pathology* **40**:59-66.
- Campbell WA. 1947. A New Species of *Coniothyrium* Parasitic on Sclerotia. *Mycologia* **39**:190-195.
- Carder JH, Barbara DJ. 1994. Molecular variation within some Japanese isolates of *Verticillium dahliae*. *Plant Pathology* **43**:947-950.
- Card SD, Walter M, Jaspers MV, Szejnberg A, Stewart A. 2009. Targeted selection of antagonistic microorganisms for control of *Botrytis cinerea* of strawberry in New Zealand. *Australasian Plant Pathology* **38**.
- Carrero-Carrón I, Trapero-Casas JL, Olivares-García C, Monte E, Hermosa R, Jiménez-Díaz RM. 2016. *Trichoderma asperellum* is effective for biocontrol of *Verticillium* wilt in olive caused by the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. *Crop Protection* **88**:45-52.
- Cock MJW, van Lenteren JC, Brodeur J, Barratt BIP, Bigler F, Bolckmans K, Cònsoli FL, Haas F, Mason PG, Parra JRP. 2010. Do new Access and Benefit Sharing procedures under the Convention on Biological Diversity threaten the future of biological control? *BioControl* **55**:199-218.

- DeBach P. 1964. Biological control of insect pests and weeds. Chapman and Hall, London.
- Debode J, Clewes E, De Backer G, Höfte M. 2005. Lignin is involved in the reduction of *Verticillium dahliae* var. *longisporum* inoculum in soil by crop residue incorporation. Soil Biology and Biochemistry **37**:301-309.
- Debode J, De Maeyer K, Perneel M, Pannecouque J, De Backer G, Höfte M. 2007. Biosurfactants are involved in the biological control of *Verticillium* microsclerotia by *Pseudomonas* spp. Journal of Applied Microbiology **103**:1184-1196.
- Depotter JRL, Deketelaere S, Inderbitzin P, Tiedemann AV, Höfte M, Subbarao KV, Wood TA, Thomma BPHJ. 2016. *Verticillium longisporum*, the invisible threat to oilseed rape and other brassicaceous plant hosts. Molecular Plant Pathology **17**:1004-1016.
- Depotter JRL, Thomma BPHJ, Wood TA. 2019. Measuring the impact of *Verticillium longisporum* on oilseed rape (*Brassica napus*) yield in field trials in the United Kingdom. European Journal of Plant Pathology **153**:321-326.
- Druzhinina IS, Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, Horwitz BA, Kenerley CM, Monte E, Mukherjee PK, Zeilinger S, Grigoriev IV, Kubicek CP. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. Nature Reviews Microbiology **9**:749-759.
- Dunker S, Keunecke H, Steinbach P, von Tiedemann A. 2008. Impact of *Verticillium longisporum* on Yield and Morphology of Winter Oilseed Rape (*Brassica napus*) in Relation to Systemic Spread in the Plant. Journal of Phytopathology **156**:698-707.
- Eastburn DM, Paul VH. 2007. *Verticillium* Wilt. 47-50 in Compendium of brassica diseases. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Eilenberg J, Hajek A, Lomer C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. BioControl **46**:387-400.
- Ellis RJ, Timms-Wilson TM, Beringer JE, Rhodes D, Renwick A, Stevenson L, Bailey MJ. 1999. Ecological basis for biocontrol of damping-off disease by *Pseudomonas fluorescens* 54/96. Journal of Applied Microbiology **87**:454-463.
- Erdogan O, Benlioglu K. 2010. Biological control of *Verticillium* wilt on cotton by the use of fluorescent *Pseudomonas* spp. under field conditions. Biological Control **53**:39-45.
- Eynck C. 2008. Identification of resistance sources and characterization of resistance factors in *Brassica* species to *Verticillium longisporum*. Dissertation. Göttingen, Germany.
- Eynck C, Koopmann B, Grunewaldt-Stoecker G, Karlovsky P, von Tiedemann A. 2007. Differential interactions of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* with *Brassica napus*

detected with molecular and histological techniques. *European Journal of Plant Pathology* **118**:259-274.

Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology* **14**:563-575.

Fotoohiyan Z, Rezaee S, Bonjar GHS, Mohammadi AH, Moradi M. 2017. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* in controlling wilt disease of pistachio caused by *Verticillium dahliae*. *Journal of Plant Protection Research* **57**:185-193.

França SC, Spiessens K, Pollet S, Debode J, De Rooster L, Callens D, Höfte M. 2013. Population dynamics of *Verticillium* species in cauliflower fields: Influence of crop rotation, debris removal and ryegrass incorporation. *Crop Protection* **54**:134-141.

Frey-Klett P, Burlinson P, Deveau A, Barret M, Tarkka M, Sarniguet A. 2011. Bacterial-Fungal Interactions: Hyphens between Agricultural, Clinical, Environmental, and Food Microbiologists. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **75**:583-609.

Garber RH, Houston BR. 1966. Penetration and development of *Verticillium albo-atrum* in the cotton plant. *Phytopathology* **56**:1121-1126.

Gerlagh M, Goossen-van de Geijn HM, Fokkema NJ, Vereijken PFG. 1999. Long-Term Biosanitation by Application of *Coniothyrium minitans* on *Sclerotinia sclerotiorum*-Infected Crops. *Phytopathology* **89**:141-147.

Gladders P. 2009. Relevance of verticillium wilt (*Verticillium longisporum*) in winter oilseed rape in the UK. HGCA Research Review no. 72.

Gladders P, Smith JA, Kirkpatrick L, Clewes E, Grant C, Barbara D, Barnes AV, Lane CR. 2011. First record of verticillium wilt (*Verticillium longisporum*) in winter oilseed rape in the UK. *New Disease Reports* **23**.

Gómez-Lama Cabanás C, Legarda G, Ruano-Rosa D, Pizarro-Tobías P, Valverde-Corredor A, Niqui JL, Triviño JC, Roca A, Mercado-Blanco J. 2018. Indigenous *Pseudomonas* spp. Strains from the Olive (*Olea europaea* L.) Rhizosphere as Effective Biocontrol Agents against *Verticillium dahliae*: From the Host Roots to the Bacterial Genomes. *Frontiers in Microbiology* **9**.

Gödecke R. 2007. Einfluss von Wurzelexudaten bei der wirtsspezifischen Induktion der Mikrosklerotienkeimung von *Verticillium longisporum*. Master thesis. Göttingen, Germany.

Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. 2004. *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* **2**:43-56.

Haas D, Défago G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* **3**:307-319.

Havel J, Ondráčková E. 2014. Ochrana řepky proti chorobám pomocí biologických přípravků. 86-87 in Sborník z konference "Prosperující olejniny" 11.-12.12. 2014.

Heale JB, Karapapa VK. 1999. The verticillium threat to Canada's major oilseed crop: canola. *Canadian Journal of Plant Pathology* **21**:1-7.

Heydari A, Pessarakli M. 2010. A Review on Biological Control of Fungal Plant Pathogens Using Microbial Antagonists. *Journal of Biological Sciences* **10**:273-290.

Hollensteiner J et al. 2017. *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus weihenstephanensis* Inhibit the Growth of Phytopathogenic *Verticillium* Species. *Frontiers in Microbiology* **7**.

Howell CR. 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease* **87**:4-10.

Huang HC, Hoes JA. 1980. Importance of Plant Spacing and Sclerotial Position to Development of Sclerotinia Wilt of Sunflower. *Plant Disease* **64**.

Hůla J, Procházková B. 2008. Minimalizace zpracování půdy. Profi Press, Praha.

Hýsek J, Vach M, Javůrek M. 2008. Biologická ochrana obilnin proti houbovým fytopatogenům: Metodika pro praxi. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha.

Chandrashekara KN, Manivannan S, Chandrashekara C, Chakravarthi M. 2012. Biological Control of Plant Diseases. 147 – 166 in *Ecofriendly Innovative Approaches in Plant Disease Management*.

Inderbitzin P, Davis RM, Bostock RM, Subbarao KV, Litvintseva A. 2011. The Ascomycete *Verticillium longisporum* Is a Hybrid and a Plant Pathogen with an Expanded Host Range. *PLoS ONE* **6**.

Isaac I. 1957. Verticillium wilt of Brussels sprout. *Annals of Applied Biology* **45**:276-283.

Jabnoun-Khiareddine H, Daami-Remadi M, Ayed F, El-Mahjoub M. 2009. Biological control of tomato Verticillium wilt by using indigenous *Trichoderma* spp. *The African Journal of Plant Science and Biotechnology* **3**:26-36.

Jackson CW, Heale JB. 1985. Relationship between DNA Content and Spore Volume in Sixteen Isolates of *Verticillium lecanii* and Two New Diploids of *V. dahliae* (= *V. dahliae* var. *longisporum* Stark). *Microbiology* **131**:3229-3236.

Jan AT, Azam M, Ali A, Haq QMR. 2011. Novel approaches of beneficial *Pseudomonas* in mitigation of plant diseases – an appraisal. *Journal of Plant Interactions* **6**:195-205.

Jensen B, Knudsen IMB, Madsen M, Jensen DF. 2004. Biopriming of Infected Carrot Seed with an Antagonist, *Clonostachys rosea*, Selected for Control of Seedborne *Alternaria* spp. *Phytopathology* **94**:551-560.

Johansson A, Goud JKC, Dixelius C. 2006. Plant host range of *Verticillium longisporum* and microsclerotia density in Swedish soils. *European Journal of Plant Pathology* **114**:139-149.

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

Kazda J, Mikulka J, Prokinová E. 2010. *Encyklopedie ochrany rostlin: polní plodiny*. Profi Press, Praha.

Kazda J, Škeřík J, Baranyk P, Herda G, Nerad D, Volf M. 2008. *Metodika integrované ochrany řepky*. SPZO.

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

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

Kocourek F, Havel J, Hovorka T, Jursík M, Kazda J, Kolařík P, Plachká E, Skuhrovec J, Seidenglanz M, Šafář J. 2018. *Metodika integrované ochrany řepky vůči škodlivým organismům vyjma podzemních škůdců*. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha.

Kratka J, Bergmanova E, Kudelova A. 1994. Effect of *Pythium oligandrum* and *Pythium ultimum* on biochemical changes in cucumber (*Cucumis sativus*): Wirkung Von *Pythium Oligandrum* Und *Pythium Ultimum* Auf Biochemische Veränderungen in Gurkenpflanzen (*Cucumis Sativus*). *Zeitschrift Für Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz / Journal of Plant Diseases and Protection* **101**:406–413.

Krauss U, ten Hoopen M, Rees R, Stirrup T, Argyle T, George A, Arroyo C, Corrales E, Casanoves F. 2013. Mycoparasitism by *Clonostachys byssicola* and *Clonostachys rosea* on *Trichoderma* spp. from cocoa (*Theobroma cacao*) and implication for the design of mixed biocontrol agents. *Biological Control* **67**:317-327.

Kroeker G. 1970. Vissnesjuka på rabs och rybs i Skåne orsakad av *Verticillium*. [*Verticillium* on oilseed rape and turnip rape in Scania caused by *Verticillium*.]. Svensk Frötidning **19**:10-13.

Kuchtová P, Bečka D, Satranský M, Cihlár P, Bečková L, Vašák J, Hlídková Ž. 2018. Vliv ošetření na vady kořenů a výnos řepky ozimé u odrůdy Factor KWS. 83-89in Sborník z konference "Prosperující olejniny" 4.-6.12. 2018.

Kuthan A. 2020. Zkušenosti s produkty obsahující *Trichoderma asperellum* při pěstování kukuřice. Agromanuál. Available at <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/technologie/zkusenosti-s-produkty-obsahujici-trichoderma-asperellum-pri-pestovani-kukurice>.

Laing SAK, Deacon JW. 1991. Video microscopical comparison of mycoparasitism by *Pythium oligandrum*, *P. nunn* and an unnamed *Pythium* species. Mycological Research **95**:469-479.

Lebeda A, Mieslerová B, Huszár J, Sedláková B. 2017. Padlí kulturních a planě rostoucích rostlin: taxonomie, biologie, ekologie a epidemiologie, mechanismy rezistence, šlechtění na odolnost, metody experimentální práce, diagnostika a ochrana rostlin. Agriprint, Olomouc.

Luth P. 2001. The control of *Sclerotinia* sp. and *Sclerotium cepivorum* with the biological fungicide Contans® WG – Experiences from field trials and commercial use. 37-38 in Proceedings of the XI International Sclerotinia workshop. York: Central Science Laboratory.

Lutchmeah RS, Cooke RC. 1985. Pelleting of seed with the antagonist *Pythium oligandrum* for biological control of damping-off. Plant Pathology **34**:528-531.

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

Mansoori M, Heydari A, Hassanzadeh N, Rezaee S, Naraghi L. 2013. Evaluation of *Pseudomonas* and *Bacillus* Bacterial Antagonists for Biological Control of Cotton *Verticillium* Wilt Disease. Journal of Plant Protection Research **53**:154-157.

Mazáková J, Urban J, Zouhar M, Ryšánek P. 2017. Analysis of *Leptosphaeria* complex causing phoma leaf spot and stem canker of winter rape (*Brassica napus*) in the Czech Republic. Crop & Pasture **68**:254-264.

McQuilken MP, Whipps JM, Cooke RC. 1990. Control of damping-off in cress and sugar-beet by commercial seed-coating with *Pythium oligandrum*. Plant Pathology **39**:452-462.

Mendes R et al. 2011. Deciphering the Rhizosphere Microbiome for Disease-Suppressive Bacteria. Science **332**:1097-1100.

- Morris CE, Monier J-M. 2003. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **41**:429-453.
- Mouekouba LDO et al. 2014. Analysis of *Clonostachys rosea*-Induced Resistance to Tomato Gray Mold Disease in Tomato Leaves. *PLoS ONE* **9**.
- Njoroge SMC, Vallad GE, Park S-Y, Kang S, Koike ST, Bolda M, Burman P, Polonik W, Subbarao KV. 2011. Phenological and Phytochemical Changes Correlate with Differential Interactions of *Verticillium dahliae* with Broccoli and Cauliflower. *Phytopathology* **101**:523-534.
- Novakazi F, Inderbitzin P, Sandoya G, Hayes RJ, von Tiedemann A, Subbarao KV. 2015. The Three Lineages of the Diploid Hybrid *Verticillium longisporum* Differ in Virulence and Pathogenicity. *Phytopathology* **105**:662-673.
- O'Brien PA. 2017. Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology* **46**:293-304.
- Ondráčková E, Ondřej M, Both Z, Nesrsta M, Prokinová E. 2014. Metodika biologické ochrany rostlin s využitím hub rodu *Clonostachys*: certifikovaná metodika. Agritec, Šumperk.
- Ondřej M, Ondráčková E. 2014. Užitečné půdní mikroskopické houby v biologické ochraně rostlin. *Rostlinolékař* **25**:24-28.
- O'Sullivan DJ, O'Gara F. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiology Reviews* **56**:662-676.
- Parnell JJ, Berka R, Young HA, Sturino JM, Kang Y, Barnhart DM, DiLeo MV. 2016. From the Lab to the Farm: An Industrial Perspective of Plant Beneficial Microorganisms. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Plachká E. 2018. Výsledky fungicidních pokusů v máku v roce 2017. *Agromanuál*. Available at <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/choroby/vysledky-fungicidnich-pokusu-v-maku-v-roce-2017>.
- Plachká E, Rychlá A. 2020. Zdravotní stav máku v roce 2019 na Opavsku. 75-78in *Makový občasník, sborník z odborných seminářů, 10.-13.2.2020*. ČZU, Praha.
- Powelson RL, Carter GE. 1973. Efficacy of soil fumigants for control of *Verticillium* wilt of potatoes. *American Potato Journal* **50**:162-167.
- Pröbsting M et al. 2020. Loss of function of CRT1a (calreticulin) reduces plant susceptibility to *Verticillium longisporum* in both *Arabidopsis thaliana* and oilseed rape (*Brassica napus*). *Plant Biotechnology Journal* **18**:2328-2344.

Procházková-Rulfová J. 2009. Polyversum – biologický fungicid na ochranu rostlin. 110 - 112 in Sborník z konference "Prosperující olejniny" 10. - 11. 12. 2009. Česká zemědělská univerzita, Praha.

Pullman GS, DeVay JE, Garber RH. 1981. Soil Solarization and Thermal Death: A Logarithmic Relationship Between Time and Temperature for Four Soilborne Plant Pathogens. *Phytopathology* **71**.

Riha K. 2018. *Coniothyrium minitans* for protection of cultivated plants from attacks by fungal pathogens belonging to the genus *Phoma* spp. or *Verticillium* spp.

Quecine MC, Araujo WL, Marcon J, Gai CS, Azevedo JL, Pizzirani-Kleiner AA. 2008. Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. *Letters in Applied Microbiology* **47**:486-491.

Raaijmakers JM, De Bruijn I, Nybroe O, Ongena M. 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews* **34**:1037-1062.

Rekanovic E, Milijasevic S, Todorovic B, Potocnik I. 2007. Possibilities of biological and chemical control of *Verticillium* wilt in pepper. *Phytoparasitica* **35**:436-441.

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

Ryšánek P, Mazáková J, Konradyová V, Grimová L. 2018. Nejvýznamnější choroby řepky olejky v České republice. Česká zemědělská univerzita, Praha.

Santoyo G, Orozco-Mosqueda M del C, Govindappa M. 2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science and Technology* **22**:855-872.

Sherzad Z, Canming T. 2020. A new strain of *Bacillus velezensis* as a bioagent against *Verticillium dahliae* in cotton: isolation and molecular identification. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* **30**.

Shoresh M, Harman GE, Mastouri F. 2010. Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. *Annual Review of Phytopathology* **48**:21-43.

Schnathorst WC. 1981. Life Cycle and Epidemiology of *Verticillium*. 81 – 111 in *Fungal Wilt Diseases of Plants*. Academic Press.

- Schöneberg A, Musa T, Voegele RT, Vogelgsang S. 2015. The potential of antagonistic fungi for control of *Fusarium graminearum* and *Fusarium crookwellense* varies depending on the experimental approach. *Journal of Applied Microbiology* **118**:1165-1179.
- Siebold M, von Tiedemann A. 2013. Effects of experimental warming on fungal disease progress in oilseed rape. *Global Change Biology* **19**:1736-1747.
- Sneh B. 1998. Use of non-pathogenic or hypovirulent fungal strains to protect plants against closely related fungal pathogens. *Biotechnology Advances* **16**:1-32.
- Stapleton JJ. 2000. Soil solarization in various agricultural production systems. *Crop Protection* **19**:837-841.
- Stárek P. 2012. Nové špičkové odrůdy Sherpa, Inspiration a Rumba ovládly mezi hybridy řepky první místa nejen ve výnosu. in Sborník z konference "Prosperující olejniný" 6.-7.12. 2012. Česká zemědělská univerzita – Katedra rostlinné výroby, Praha.
- Stark C. 1961. Das Auftreten der *Verticillium*-Tracheomykosen. 493-528 in *Hamburger Gartenbaukulturen: Ein Beitrag zur Kenntnis ihrer Erreger*. Gartenbauwissenschaft.
- Steventon LA, Fahleson J, Hu Q, Dixelius C. 2002. Identification of the causal agent of *Verticillium* wilt of winter oilseed rape in Sweden, *V. longisporum*. *Mycological Research* **106**:570-578.
- Subbarao KV, Hubbard JC, Koike ST. 1999. Evaluation of Broccoli Residue Incorporation into Field Soil for *Verticillium* Wilt Control in Cauliflower. *Plant Disease* **83**:124-129.
- Subbarao KV. 2002. Methyl bromide alternatives – meeting the deadlines: Introduction. *Phytopathology* **92**:1334-1336.
- Subbarao KV, Chassot A, Gordon TR, Hubbard JC, Bonello P, Mullin R, Okamoto D, Davis RM, Koike ST. 1995. Genetic relationships and cross pathogenicity of *Verticillium dahliae* isolates from cauliflower and other crops. *Phytopathology* **85**:1105-1112.
- Sun ZB, Li SD, Ren Q, Xu JL, Lu X, Sun MH. 2020. Biology and applications of *Clonostachys rosea*. *Journal of Applied Microbiology* **129**:486-495.
- Svensson C, Lerennius C. 1987. An investigation on the effect of *Verticillium* wilt (*Verticillium dahliae* Kleb.) on oilseed rape. *International Organisation for Biological Control Bulletin* **10**:30-34.
- Šedý R. 2016. Omezení při ochraně chmele by nemusel být problém. Jde to i ekologicky a levněji. Available at <http://www.agris.cz/clanek/194624> (accessed April 15, 2019).

Šnobl J et al. 2005. Základy rostlinné produkce. 2. vydání. Česká zemědělská univerzita, Praha.

Taghavi S, Garafola C, Monchy S, Newman L, Hoffman A, Weyens N, Barac T, Vangronsveld J, van der Lelie D. 2009. Genome Survey and Characterization of Endophytic Bacteria Exhibiting a Beneficial Effect on Growth and Development of Poplar Trees. *Applied and Environmental Microbiology* **75**:748-757.

Tao X, Zhang H, Gao M, Li M, Zhao T, Guan X. 2020. *Pseudomonas* species isolated via high-throughput screening significantly protect cotton plants against verticillium wilt. *AMB Express* **10**.

Tomášek J, Cihlár P. 2016. Cesta intenzivní výroby kukuřičné siláže či využití přírodních způsobů. in Sborník z konference "Prosperující olejniny" 6.-8.12. 2016.

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

van Lenteren JC. 1993. Integrated pest management: the inescapable future. 217-225 in *Modern crop protection: developments and perspectives*. Wageningen Pers.

Vesely D, Koubova D. 1993. The effect of *Pythium oligandrum* on the health condition of winter wheat roots. *Ochrana rostlin* **29**:193-202.

von Tiedemann A. 2020. Verticillium Stripe in Canola – A European Perspective. in Manitoba Agronomists Conference. Available at https://www.youtube.com/watch?v=fiify-Ii08&ab_channel=UM-FacultyofAgriculturalandFoodSciences.

Waage JK, Greathead DJ. 1988. Biological control: challenges and opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **318**:111-128.

Walther D, Gindrat D. 1987. Biological Control of *Phoma* and *Pythium* Damping-Off of Sugar-Beet with *Pythium oligandrum*. *Journal of Phytopathology* **119**:167-174.

Watanabe T, Ozawa M, Sakai R. 1973. A New Disease of Chinese Cabbage Caused by *Verticillium albo-atrum* and Some Factors Related to the Incidence of the Disease. *Japanese Journal of Phytopathology* **39**:344-350.

Weller DM, Raaijmakers JM, Gardener BBMS, Thomashow LS. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens soil. *Annual Review of Phytopathology* **40**:309-348.

Whipps JM, Gerlagh M. 1992. Biology of *Coniothyrium minitans* and its potential for use in disease biocontrol. *Mycological Research* **96**:897-907.

Whipps JM, Sreenivasaprasad S, Muthumeenakshi S, Rogers CW, Challen MP. 2008. Use of *Coniothyrium minitans* as a biocontrol agent and some molecular aspects of sclerotial mycoparasitism. 323-330 in Sustainable disease management in a European context. Springer Netherlands, Dordrecht.

Zeise K, von Tiedemann A. 2002. Application of RAPD-PCR for Virulence Type Analysis within *Verticillium dahliae* and *V. longisporum*. Journal of Phytopathology **150**:557-563.

Zhang Q, Zhang J, Yang L, Zhang L, Jiang D, Chen W, Li G. 2014. Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in *Brassica napus*. Biological Control **72**:98-108.

Zheng X, Lopisso DT, Eseola AB, Koopmann B, von Tiedemann A. 2019. Potential for Seed Transmission of *Verticillium longisporum* in Oilseed Rape (*Brassica napus*). Plant Disease **103**:1843-1849.

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

Integral Pro – Agrofert. 2019. Available at https://www.agrofert.cz/sites/default/files/downloads/integral_pro_0.pdf (accessed March 06, 2021).

Hirundo – Monastechnology. 2021. Available at <http://www.monastechnology.cz/index.php/hirundo> (accessed March 06, 2021).

Contans – Bayer – etiketa. 2021. Available at <https://www.cropscience.bayer.cz/static/documents/prospekt-katalog/ContansWG.pdf> (accessed March 06, 2021).

Contans – Agromanuál – etiketa. 2021. Available at https://www.agromanual.cz/download/pdf_etiketa/e_contans_wg.pdf (accessed March 06, 2021).

Gliorex – etiketa. 2019. Available at <https://fytovita.cz/useruploads/files/Gliorex-etiketa.pdf> (accessed April 07, 2019).

Polyversum. 2019. Available at http://www.biopreparaty.eu/index.php?option=com_content&view=article&id=24&Itemid=21 (accessed April 08, 2019).

Polyversum – etiketa. 2019. Available at <http://www.biopreparaty.eu/images/stories/Etikety/etiketa%20-%20tisk.pdf> (accessed April 08, 2019).

Polyversum – řepka olejka. 2019. Available at http://www.biopreparaty.eu/images/stories/repka_POLYVERSUM.jpg (accessed April 08, 2019).

Xilon – VP AGRO. 2021. Available at <https://www.vpagro.cz/cti-xilon-gr?id=4122020122007120> (accessed March 06, 2021).

Clonoplus – Fytovita – etiketa. 2021. Available at https://www.fytovita.cz/useruploads/files/Clonoplus_etiketa_mak.pdf (accessed January 05, 2021).

Clonoplus – Fytovita. 2021. Available at <https://www.fytovita.cz/clonoplus.html> (accessed January 05, 2021).

Registr přípravků na ochranu rostlin. 2021. eAGRI. Available at <http://eagri.cz/public/app/eagriapp/POR/Vyhledavani.aspx> (accessed March 23, 2021).

Verticillium stripe. 2015. CFIA – Canadian Food Inspection Agency, Canada. Available at <https://inspection.canada.ca/plant-health/plant-pests-invasive-species/plant-diseases/verticillium-stripe/eng/1420746212959/1420746213803> (accessed March 02, 2021).

Rapool – Inspiration. 2019. Rapool. Available at <https://www.rapool.cz/index.cfm/action/varieties/c/23/var/67.html> (accessed March 25, 2019).

Rapool – Croquet. 2021. Rapool. Available at <https://www.rapool.cz/index.cfm/action/varieties/c/23/var/80.html> (accessed February 26, 2021).

FAO. 2021. Available at <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (accessed March 03, 2021).

ČSÚ. 2021. Available at <https://www.czso.cz/csu/czso/osevni-plochy-ozimych-plodin-pro-sklizen-v-roce-2021> (accessed March 03, 2021).

Gliorex. 2019. Available at <https://fytovita.cz/gliorex.html> (accessed April 07, 2019).

Xilon – VP AGRO – prezentace. 2021. Available at https://www.vpagro.cz/_dokumenty/4122020122007120/201202-xilon-brandvideo.pdf (accessed March 06, 2021).

Prometheus – Monastechnology. 2021. Available at <http://monastechnology.cz/index.php/prometheus-cz> (accessed March 06, 2021).

9 Seznam použitých zkratek

BBCH – Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und CHemische Industrie

CFU – colony forming units – jednotky tvořící kolonie

CTAB – cetyltrimethylamoniumbromid

ČSÚ – Český statistický úřad

ČZU – Česká zemědělská univerzita v Praze

DNA – kyselina deoxyribonukleová

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

FAO – Food and Agriculture Organization of the Unated Nations

HTS – hmotnost tisíce semen

KOR ČZU – Katedra ochrany rostlin Česká zemědělská univerzita

PCR – polymerase chain reaction – polymerázová řetězová reakce

RPM – rounds per minute – otáčky za minutu

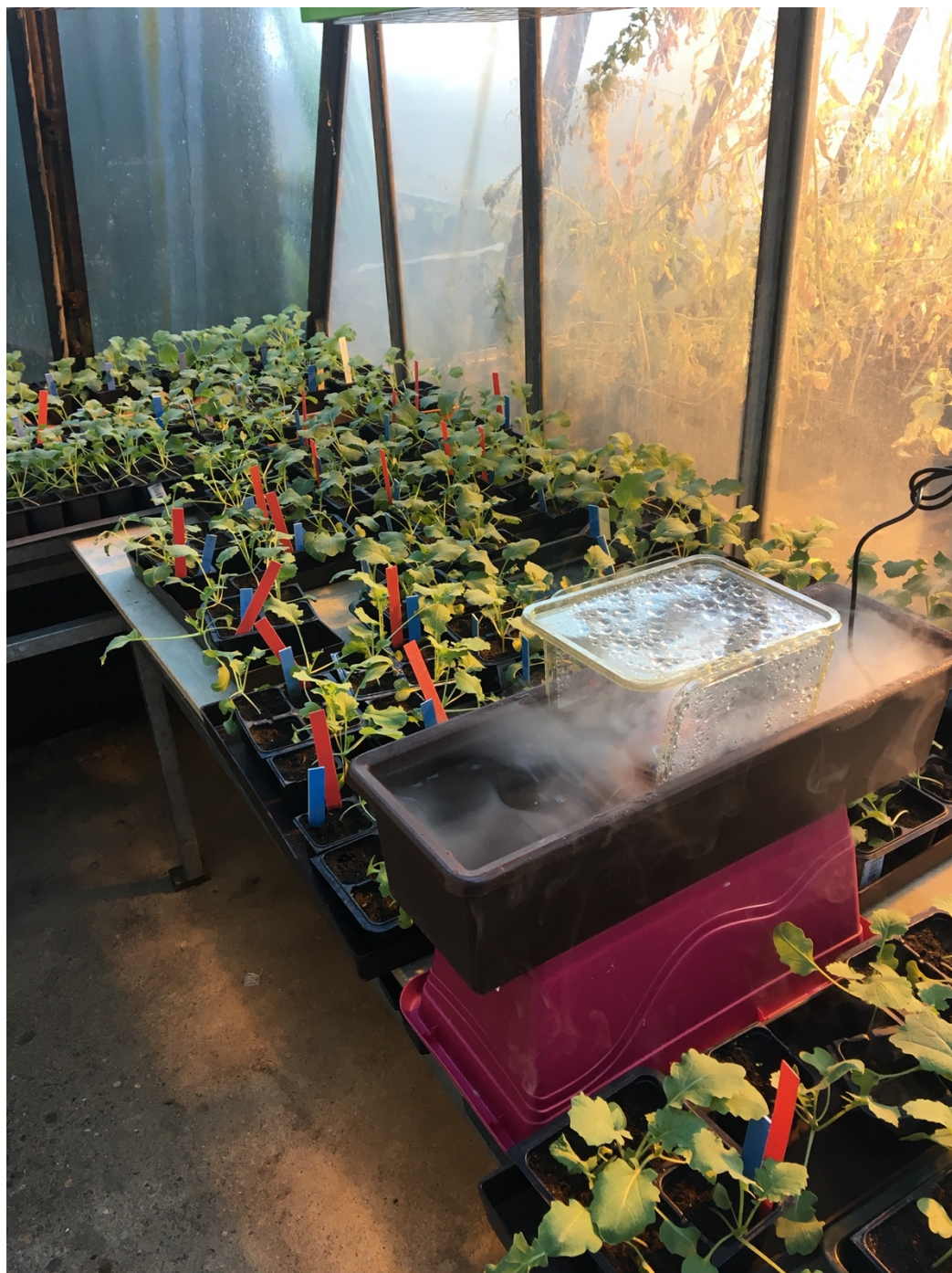
ÚKZÚZ – Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

10 Samostatné přílohy

Příloha 1: Skleníkové pokusy



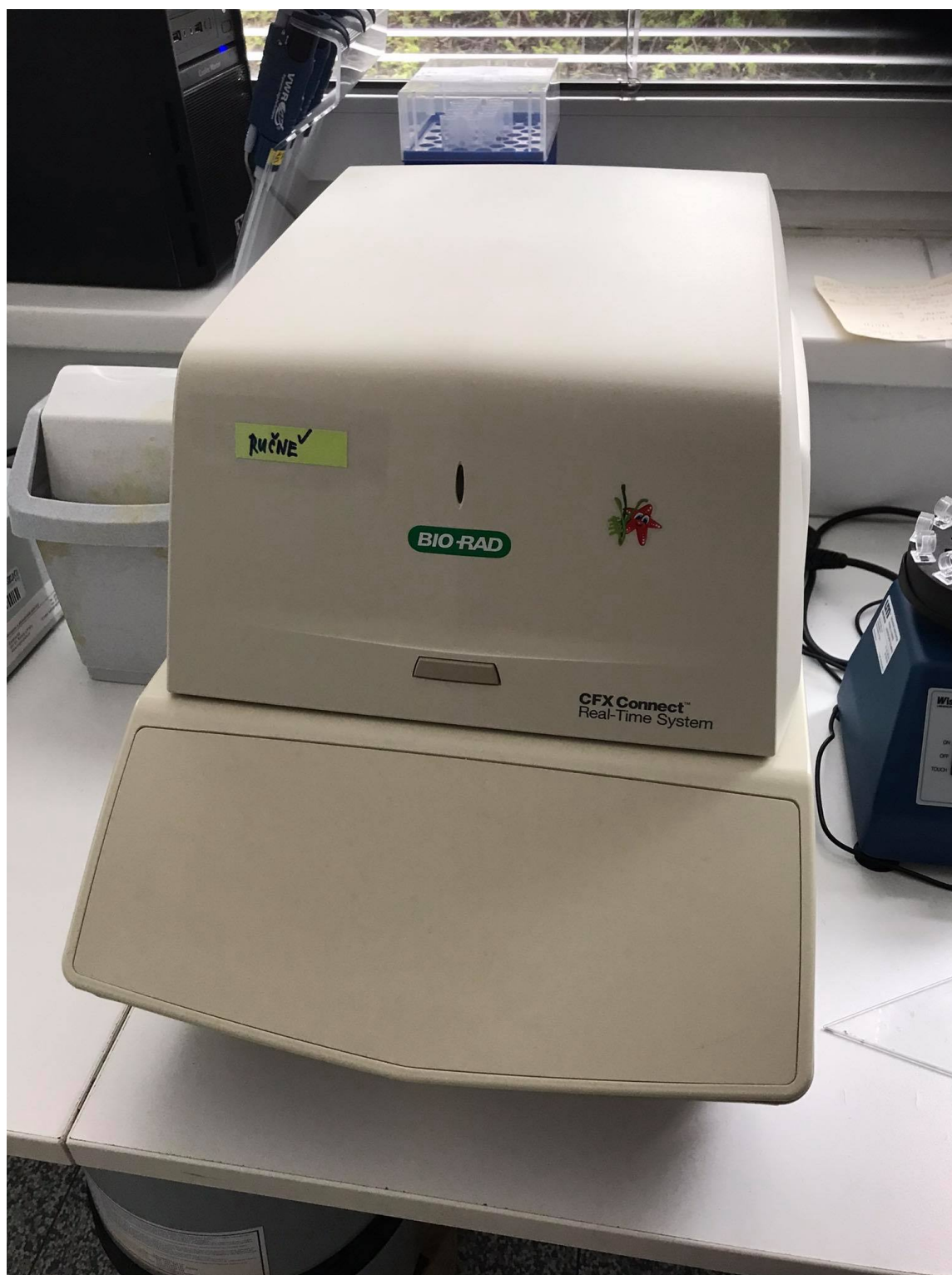
Příloha 2: Skleníkové pokusy



Příloha 3: Flowbox



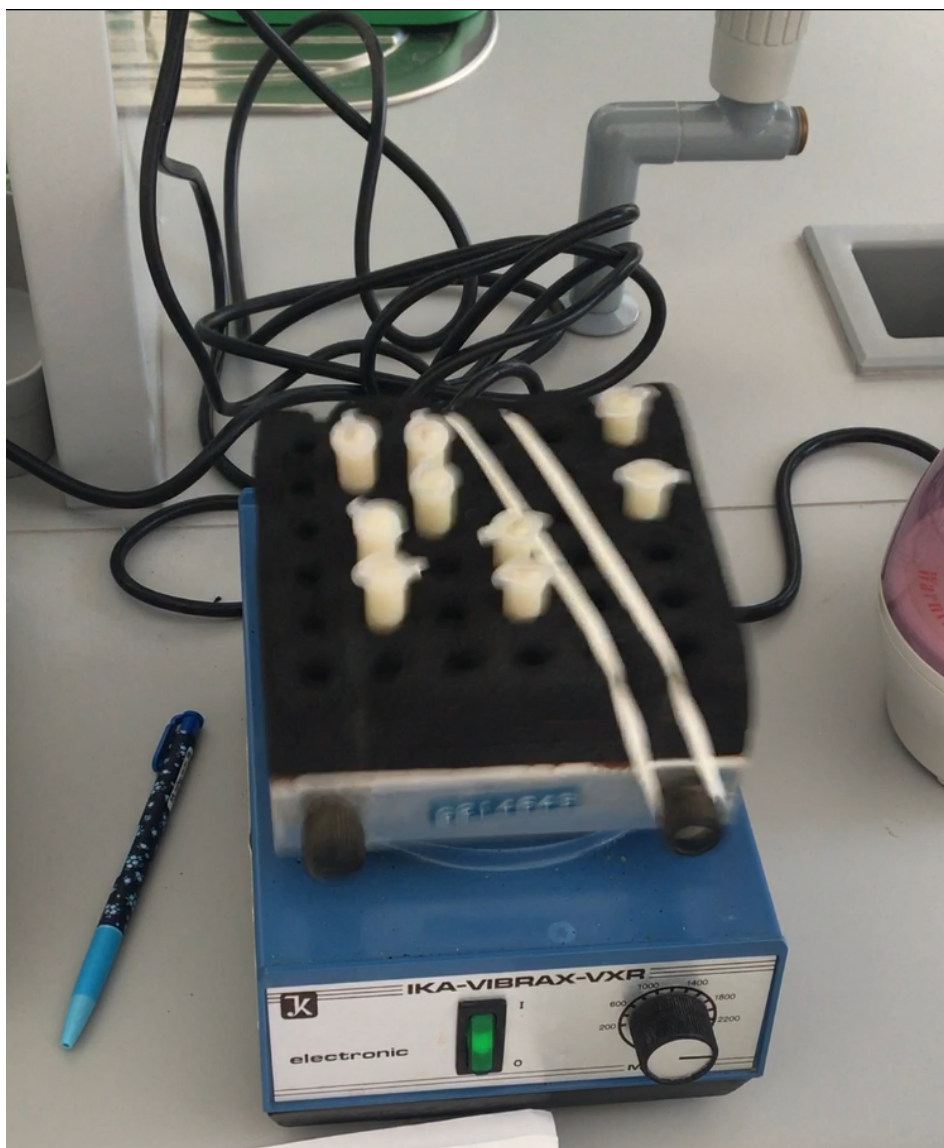
Příloha 4: Real-Time cycler BioRad CFX Connect, Real-Time System



Příloha 5: Laboratorní analýza



Příloha 6: Vortex/třepačka IKA-VIBRAX-VXR



Příloha 7: Spory *Verticillium longisporum*

