



ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Certifikovaná metodika

Vyhodnocení odolnosti šlechtitelských materiálů a dalších genových zdrojů vůči

Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans



Martin Koudela a kol.

Certifikovaná metodika byla zpracována v rámci řešení projektu NAZV QJ1510088

**Vyhodnocení odolnosti šlechtitelských materiálů a dalších genových zdrojů vůči
Fusarium oxysporum f. sp. *conglutinans***

Certifikovaná metodika

Autoři:

Tomáš Jelínek*, Věra Kofránková*, Martin Koudela*, Čeněk Novotný**, David Novotný***
(abecední pořadí)

*Česká zemědělská univerzita v Praze**

*Mikrobiologický ústav Akademie věd ČR, v.v.i. ***

*Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. ****

Dedikace:

Výsledek řešení projektu MZe NAZV QJ1510088

*„Využití moderních biotechnologických postupů pro zvýšení produkce a kvality zelenin rodu
Brassica L. v celé vertikále od šlechtění, přes pěstování až po skladování produktu“*

Oponentní posudky vypracovali:

Publikaci bylo Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským uděleno Osvědčení
č.j. ... o uznání uplatněné certifikované metodiky v souladu s podmínkami „Metodiky
hodnocení výsledků výzkumných organizací a hodnocení ukončených programů“

Vydala:

Česká zemědělská univerzita v Praze, 2018

Katedra zahradnictví FAPPZ, FAPPZ ČZU v Praze

ISBN: 978-80-213-2897-6

Anotace:

Předkládaná metodika v úvodní části popisuje biologii fytopatogenní houby *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* (Foc), symptomy napadení na hostitelské rostlině, cesty, kterými patogen infikuje rostlinu, faktory ovlivňující jeho rozvoj, genetickou podmíněnost odolnosti k Foc a antagonistické organismy, které omezují růst této fytopatogenní houby. Součástí metodiky je popis kultivace a přípravy inokula Foc, příprava rostlinného materiálu pro infekční pokusy, postupy inokulace rostlin, hodnocení vizuálních symptomů napadení Foc na rostlinách a metodiku miskových pokusů pro hodnocení antagonismu vybraných hub a bakterií k Foc. V metodice jsou sumarizovány výsledky hodnocení odolnosti vybraného sortimentu odrůd, novošlechtění a šlechtitelských linií firmy MORAVOSEED CZ a.s., dále vliv pH, teploty a půdních vlastností na rozvoj fusariového vadnutí. Součástí metodiky jsou také výsledky hodnocení antagonistického vlivu vybraných hub a bakterií vůči Foc.

Annotation:

In the introductory part, this methodology describes the biology of phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* (Foc), host plant infection symptoms, pathways of the plant infection, factors affecting its development, genetically determined resistance to Foc and antagonistic organisms that inhibit the growth of this phytopathogenic fungus. Description of cultivation and preparation of Foc inoculum is included in the methodology, as well as preparation of plant material and plant inoculation procedures for the experiments, evaluation of visual symptoms of Foc plants attack and methodology of experiments to evaluate the antagonism of selected fungi and bacteria to Foc. In the methodology, there are summarized the results of the evaluation of the resistance of the selected assortment of varieties, new breeding and breeding lines of MORAVOSEED CZ a.s., the influence of pH, temperature and soil properties on the development of Fusarium wilt. One part of the methodology are also the results of the evaluation of the antagonistic influence of selected fungus and bacteria on Foc.

Obsah

I	Úvod.....	9
II	Cíl metodiky.....	11
III	Vlastní popis metodiky.....	12
	III.1 Kultivace Foc a příprava inokula.....	12
	III.2 Rostlinný materiál.....	12
	III.3 Hodnocení vizuálních symptomů fusariového vadnutí.....	12
	III.4 Metodika miskových pokusů s antagonistickými mikroorganismy.....	13
	III.5 Úprava pH.....	14
IV	Výsledky a doporučení.....	15
	IV.1 Hodnocení vlivu koncentrace inokula na rozvoj fusariového vadnutí u zelí hlávkového.....	15
	IV.2 Výběr vhodné metodiky pro hodnocení odolnosti juvenilních rostlin zelí hlávkového k <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i> (Foc).....	16
	IV.3 Výsledky infekčních pokusů s <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i> na vybraných genotypech <i>Brassica oleraceae</i>	16
	IV.4 Interakce genotypu a půdních podmínek ve vztahu k citlivosti k Foc.....	20
	IV.4.1 Hodnocení vlivu pH na růst <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>conglutinans</i>	20
	IV.4.2 Hodnocení vlivu teploty na růst <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>conglutinans</i> v in-vitro podmínkách (PDA medium).....	21
	IV.4.3 Hodnocení vlivu odlišných teplotních režimů na rozvoj <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i> (pěstební substrát).....	22
	IV.4.4 Vliv odlišných půd na infekci Foc.....	25
	IV.5 Hodnocení antagonistického vztahu vybraných mikroorganismů k Foc.....	25
V	Závěr.....	33
VI	Srovnání novosti postupů.....	34
VII	Popis uplatnění certifikované metodiky.....	34
VIII	Ekonomické aspekty.....	34
IX	Seznam použité literatury.....	35
X	Seznam publikací, které předcházely metodice.....	36

I Úvod

Zelí hlávkové patří v ČR mezi nejvýznamnější zeleninové druhy jak z hlediska spotřeby, tak z hlediska produkce. Tato plodina je napadána celou řadou patogenních organismů, které působí vážné ekonomické škody. Narůstající teploty a častější výskyt suchých period mohou na našem území podporovat rozšiřování organismů, které jsou typičtější především pro jižnější oblasti. Mezi tyto organismy patří i fytopatogenní houba *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* (dále Foc), která je původcem jedné z nejzávažnějších chorob brukvovité zeleniny tzv. fusariové vadnutí (*Fusarium wilt*) (Verna a Sharma, 1999; Koike a kol, 2007). Největší škody v současné době působí v Kalifornii, Austrálii, jižní Ukrajině, Itálii a Kanadě, kde u řepky způsobuje až 30% ztráty, dále působí ztráty na hořčici a zelí. (Garibaldi a kol., 2006; Kochman, 2007; Lange a kol., 2007).

Počáteční symptomy napadení jsou žloutnutí listů od okraje, často jen na jedné straně. Listy postupně hnědnou a opadávají. Následně žloutne, vadne a hyne celá rostlina. Foc působí vážné problémy především v letních měsících při vyšší teplotě půdy (Koike a kol., 2007).



Obrázek 1 Vizuální symptomy projevu napadení patogenem *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*

Fusarium oxysporum je kosmopolitní (vyskytuje se ve většině půd světa) a velmi variabilní druh, u kterého se rozlišuje více než 120 formae speciales (Gordon a Martyn, 1997). Tento druh vytváří tři druhy spor – makrokonidie (dlouhé 35 - 70 μm), mikrokonidie (obvykle jednobuněčné, 5 - 15 μm velké) a chlamydospory (silnostěnné spory, které umožňují houbě přežít nepříznivé období). Klíčení spor stimuluje exudáty semen a kořenů. K infekci rostliny

dochází prostřednictvím poranění kořenů nebo kořenových špiček. Patogen následně vrůstá do cévního systému (xylému) a produkuje mikrospory, které se pohybují v rostlině. Blokace cévních svazků patogenem vede k typickému hnědému zbarvení cévních svazků (Kochman, 2007).

Teplota nad 17 °C podporuje rozvoj patogena, přičemž jeho maximální aktivita je při teplotách okolo 25 °C. Vzhledem k teplomilnosti patogena je pěstování plodin v jarních nebo podzimních měsících určitým preventivním opatřením, neboť patogen vykazuje v těchto obdobích obvykle nižší aktivitu.

Důležitá jsou preventivní opatření, která brání šíření patogena. Mezi ně patří zabránění rozšíření infikované půdy na nezamořené stanoviště prostřednictvím pracovníků, strojů, náradí, infikovaných rostlinných zbytků apod., používání zdravého osiva a sadby, důležitý je také dostatečný odstup mezi brukvovitými v osevním postupu, je třeba také omezit zhutnění půdy, které je příčinou většího poškození kořínků a tím také infekce (Kochmann, 2007).

Důležitým nástrojem k ochraně proti patogenu je pěstování odolných odrůd (Verna a Sharma, 1999). U zelí je známá odolnost dvojího typu, A a B. Odrůdy s typem odolnosti A vykazují rovnoměrnou odolnost bez ohledu na teplotu půdy. Odrůdy s typem odolnosti B vykazují vysokou odolnost, ale pouze při teplotě půdy do 21 °C. Při teplotě nad 25 °C je odolnost překonána a dochází k infekci rostlin. Modernější odrůdy nesou převážně odolnost typu A. Odolnost typu A (kvalitativní) je řízena jedním genem (monogenní), zatímco typ B (kvantitativní) je polygenní (Koike a kol., 2007).

Chemická ochrana v polních podmínkách bývá zpravidla neefektivní nebo neekonomická. Výskyt napadení se projevuje většinou až v průběhu vegetace a na použití fungicidů ve fázi prvních symptomů je už pozdě. Fungicidy lze preventivně použít především na osivo. Důležitým opatřením pro snížení koncentrace patogena v půdě je dodržování dostatečných odstupů v osevních postupech mezi brukvovitými plodinami, nepoužívat brukvovité rostliny jako zelené hnojení (hořčice) a důsledně likvidovat plevy z této čeledi (kokoška pastuší tobolka, penízek rolní, výdrol řepky a hořčice). Jednou z možných metod ochrany proti fusariovému vadnutí je biologická ochrana, v rámci které jsou cíleně podporovány antagonistické půdní houby a bakterie. Za potenciální mikroorganismy biologické ochrany na zeleninách lze uvést bakterie z rodu *Bacillus* a *Pseudomonas*, z mykoparazitických hub pak *Trichoderma* sp. a *Pythium oligandrum* (El-Katatny a kol., 2006; Ajillogba a kol., 2013).

II Cíl metodiky

Předkládaná metodika si klade za cíl seznámit pěstitele zeleniny a další zájemce z řad odborné veřejnosti s problematikou fytopatogenní houby *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* (Foc), biologií této houby, symptomy, kterými se projevuje na hostitelských rostlinách, faktory, které ovlivňují její rozvoj, stejně tak jako s účinky antagonistických hub a bakterií na tohoto patogena. Důležitým dílčím cílem je seznámit odbornou veřejnost s výsledky experimentů, ve kterých byla upřesněna metodika kultivace Foc, příprava inokula a hostitelských rostlin a hodnocení symptomů napadení Foc v rámci standardizované experimentální metodiky. Metodika prezentuje rovněž celou řadu konkrétních příkladů z experimentů, které dokládají uvedená doporučení v metodice.

III Vlastní popis metodiky

III.1 Kultivace Foc a příprava inokula

Patogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* rasa 1, byl kultivován na PDA mediu (Potatoe dextroze agar). Medium bylo následně autoklávováno při teplotě 121°C po dobu 20 minut. Na Petriho miskách o průměru 9 cm byl patogen kultivován za teploty 24°C.

Narostlé mycelium bylo staženo z misek kličkou do sterilní destilované vody (autokláv 121°C/20min). Získaná suspenze byla zhomogenizována (WiseTis HG-15D).

Pro potřeby inokulace byla použita koncentrace spor 1×10^5 (Li a kol., 2005; Kang a kol., 2009).

III.2 Rostlinný materiál

Pro testování odolnosti odrůd k patogenu Foc byly zvoleny odrůdy a šlechtitelské linie pocházející z šlechtitelské firmy, která udržuje 49% odrůd zelí hlávkového registrovaných ve státní odrůdové knize ČR.

Jednotlivé odrůdy zelí hlávkového jsou v metodice označeny písmeny **X** a šlechtitelské linie jsou značeny **L-x**. Novošlechtění je značeno **SUx/x**.

III.3 Hodnocení vizuálních symptomů fusariového vadnutí

Vizuální symptomy byly hodnoceny bodovou stupnicí 0-3 (viz obrázek 1). Hodnoty byly dále vyjádřeny indexem napadení DI (disease index = %).

$DI [\%] = [\sum (n \times v) / 3N]$, kdy n – počet rostlin s určitým stupněm napadení, v – stupeň napadení, N – celkový počet rostlin celku. Při napadení 0-10% = HR (high resistance); 10-30% = R (resistance); 30-50% = IR (intermediate resistance); 50-70% = S (sensitive); >70% = HS (high sensitive) (Liu a kol., 2017).



Obrázek 2 Stupnice hodnocení vizuálních projevů infekce 0-3 (0 – rostlina bez příznaků, 1 – rostlina vykazuje omezený růst a dochází k zavadání, 2 – projevuje se vadnutí a žloutnutí listů, 3 – závažné vadnutí rostliny a chloróza listů, dochází k vadnutí rostliny až k úhynu rostliny)

III.4 Metodika miskových pokusů s antagonistickými mikroorganismy

Jednotlivé potenciální antagonistické mikroorganismy byly testovány proti Foc (rasa 1) v *in-vitro* podmínkách v duálních testech. Bylo vytvořeno několik variant (*Trichoderma harzianum* CCF 2714, *T. hamatum* CCF 2390, *T. asperellum* ATCC 204424, nepatogenní kmen *Fusarium oxysporum* CCF 3428, *Fusarium lateritium* CCF 3689, *Pythium oligandrum* CBS 530.74, *Aureobasidium pullulans* CCF 4532, *Cladosporium herbarum* CCF 3741, z bakterií; *Pseudomonas fluorescens* CCM 2115, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1960, *Bacillus amyloliquefaciens* DSM 23117 a *Bacillus subtilis* Xa, *Erwinia herbicola* DSM 8570 a kontrola, každá varianta ve 3 opakováních. Testy byly prováděny v Petriho miskách (průměr 9 cm) na PDA. Kultivace probíhala bez přístupu světla, u hub při teplotě 24 °C, u bakterií při 28 °C. Houbové kultury byly očkovány na PDA v Petriho miskách přenesením terčíku agaru (průměr 7 mm) porostlého myceliem z předem napěstované kultury (PDA, 24 °C, tma).

Bakterie byly očkovány kapkou (10 µl) buněčné suspenze o optické densitě $OD_{600nm} = 1,0$. Kultury byly naočkovány ve stejném termínu, ve vzdálenosti 2,5 cm od sebe.

Během 14denní kultivace kultur byl každé 2 dny měřen průměr (v cm) kolonií. V případě pravidelné kolonie byl průměr měřen jedenkrát, v případě nepravidelné kolonie byl průměr měřen dvakrát (kolmo na sebe, šířka a výška), naměřené hodnoty byly zprůměrovány a porovnávány s kontrolou.

Tabulka 1 Vysvětlivky

DSM	Deutsche sammlung von mikroorganismen und zellkulturen
CCM	Czech Collection of Microorganisms
CCF	Culture Collection of Fungi
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
ATCC	American Type Culture Collection

III.5 Úprava pH

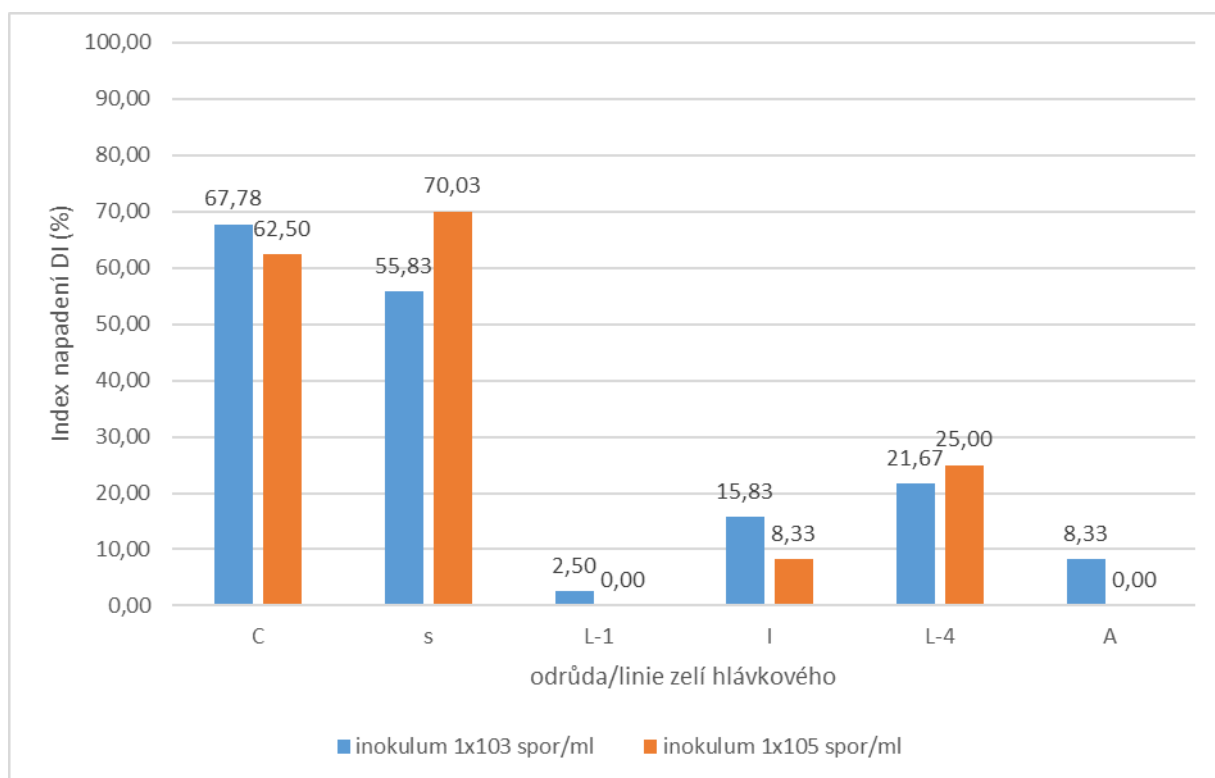
Hodnota pH PDA media byla upravena na hodnoty 4; 5; 6; 7; 8 a 9, za pomoci 37 % kyseliny chlorovodíkové (HCl) a jedno molárního hydroxidu sodného (1M NaOH). Po úpravě pH PDA media bylo medium autoklávováno při teplotě 121 °C, rozlito na Petriho misky o průměru 9 cm.

IV Výsledky a doporučení

IV.1 Hodnocení vlivu koncentrace inokula na rozvoj fusariového vadnutí u zelí hlávkového

Srovnání odlišných koncentrací inokula. Pro testování vlivu koncentrace inokula na index napadení vybraného sortimentu zelí hlávkového byly zvoleny dvě koncentrace 1×10^3 spor/ml inokula a 1×10^5 spor/ml inokula. Při hodnocení si odrůdy/linie zachovaly stejný index napadení – míru rezistence. Nicméně pro dosažení rychlejších výsledků při testování na odolnost zelí hlávkového vůči fusariovému vadnutí je vhodná koncentrace vyšší = 1×10^5 spor/ml inokula.

Graf 1 Hodnocení vlivu koncentrace inokula na rozvoj fusariového vadnutí zelí



IV.2 Výběr vhodné metodiky pro hodnocení odolnosti juvenilních rostlin zelí hlávkového k *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* (Foc)

Ověřovány byly následující metody:

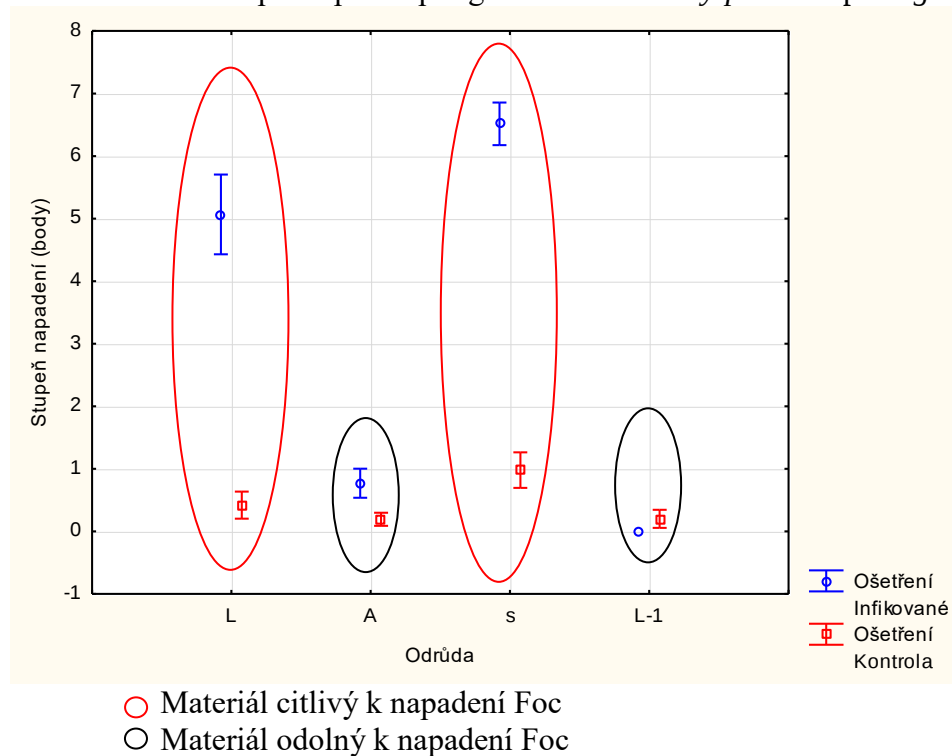
- a) Máčení kořenového systému juvenilních rostlin zelí hlávkového v inokulu Foc při pikýrování.*
- b) Zálivka juvenilních rostlin zelí hlávkového (ve stejné vývojové fázi a stejným inokulem jako předchozí) v nádobách - bez pikýrování.*
- c) Zálivka substrátu inokulem (jako v předchozích) bezprostředně po výsevu osiva zelí hlávkového.*

Na základě rychlosti rozvoje fusariového vadnutí na pokusných rostlinách zelí hlávkového byla jako nejvhodnější metoda pro inokulaci pokusných rostlin vybrána varianta a), ve které inokulace probíhala máčením kořenového systému při pikýrování. Tato metoda bude dále používána pro další testování širšího sortimentu brukvovité zeleniny na odolnost k Foc. V této variantě (a) se, pravděpodobně vlivem částečného poškození kořenového systému při pikýrování, vytvořila vstupní brána pro infekci Foc, což způsobilo rychlejší průběh onemocnění (první symptomy již za 2 – 3 týdny). Ve variantách b) a c) nebyl kořenový systém mechanicky narušen, proto zde průběh fusariového vadnutí byl výrazněji pomalejší (první projevy po 4 – 5 týdnech v porovnání s variantou a).

IV.3 Výsledky infekčních pokusů s *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* na vybraných genotypch *Brassica oleraceae*

U vybraného sortimentu zelí hlávkového (odrůdy **S**, **A** a **L** a linie **L-1**) byl proveden infekční pokus, ve kterém byl hodnocen průběh fusariového vadnutí juvenilních rostlin zelí hlávkového po inokulaci patogenem Foc. Stupeň napadení Foc byl hodnocen pomocí bodové škály 0 – 9.

Graf 2 Porovnání stupně napadení patogenem *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*



Tabulka 2 Průměrné hodnoty napadení patogenem *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*

Ošetření	Odrůda/linie	Průměrná hodnota napadení Foc [body]
Infikované	L-1	0,00 _a *
Kontrola	A	0,19 _{ab}
Kontrola	L-1	0,20 _{ab}
Kontrola	L	0,42 _{ab}
Infikované	A	0,77 _{ab}
Kontrola	s	0,98 _b
Infikované	L	5,07 _c
Infikované	s	6,52 _d

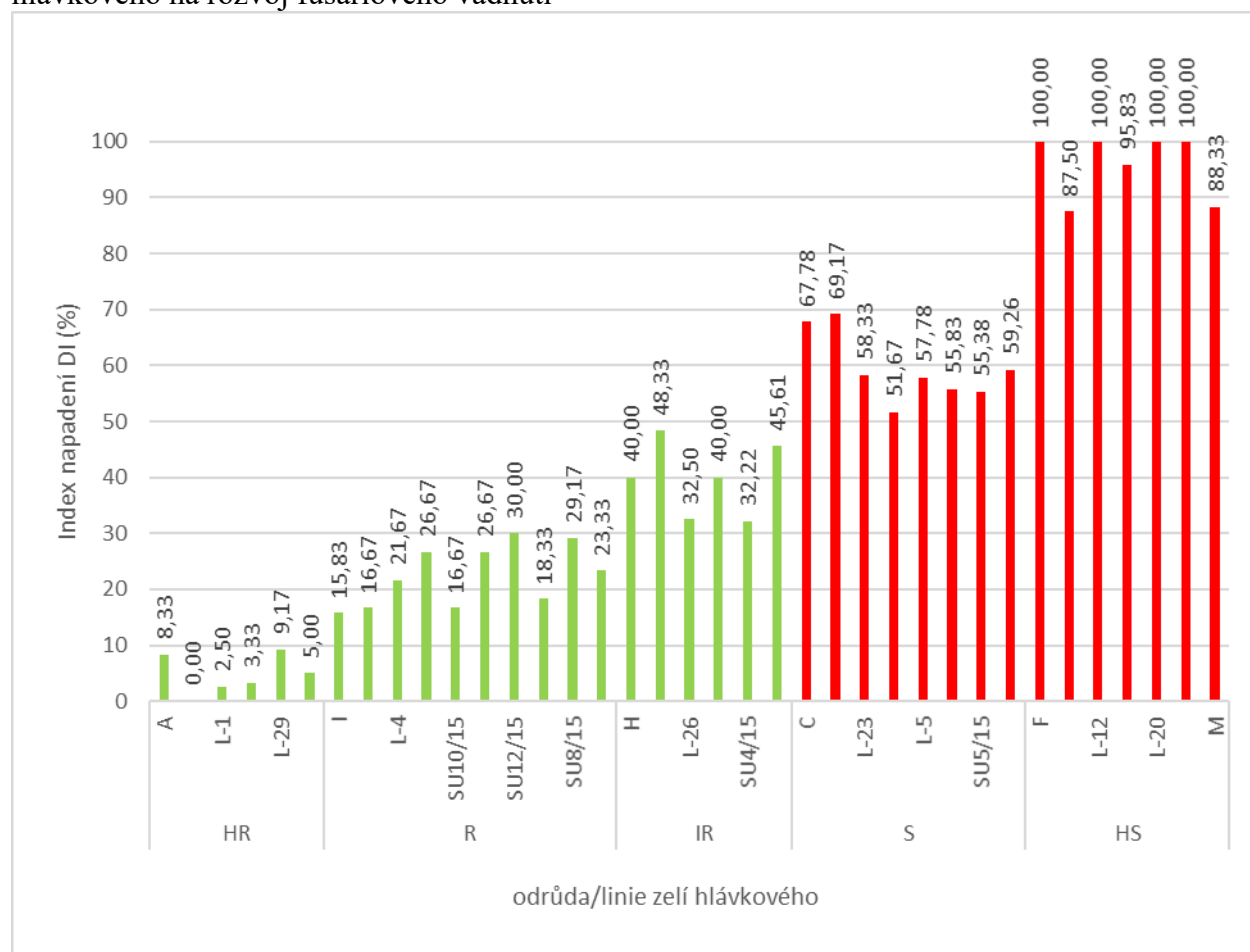
*odlišná písmena u průměrných hodnot ve sloupci značí významný rozdíl

Z dosavadního hodnocení citlivosti odrůd a linií zelí hlávkového byl zjištěn statisticky významný rozdíl v intenzitě napadení patogenem *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* mezi odrůdami a linií zelí hlávkového. Průkazně nejcitlivější byla odrůda **s** (stupeň napadení po inokulaci 6,52 bodů), dále odrůda **L** (5,07 bodů). V porovnání s předchozími dvěma odrůdami vykazovaly průkazně vyšší odolnost k Foc odrůda **A** (0,77 bodů) a **L-1** (0 bodů).

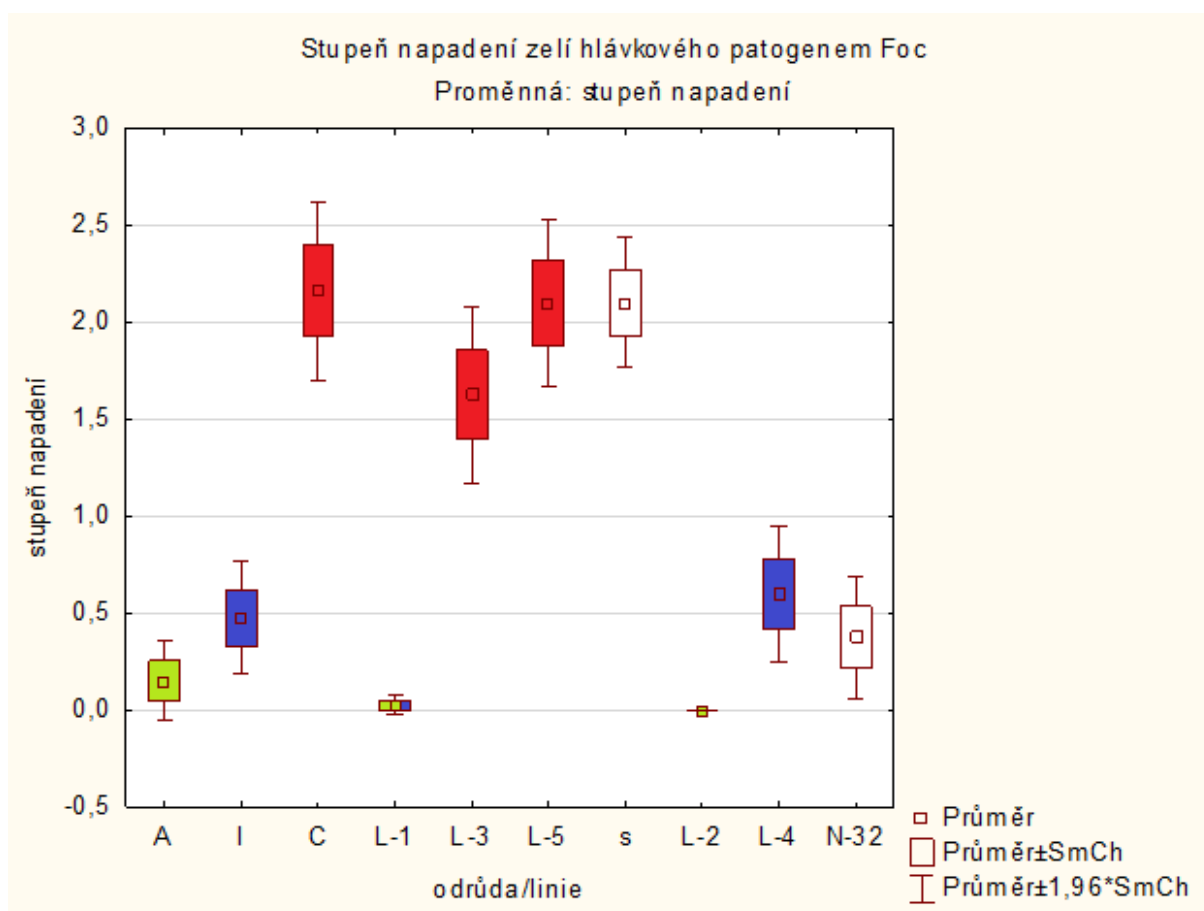
Vizuální projevy onemocnění byly potvrzeny, obsahem patogena v rostlinných pletivech, PCR metodou se specifickými markery. Přítomnost patogena byla potvrzena v kořenech rostliny, nikoli ve stonku a listech.

Pro rychlejší nástup projevů infekce byla navýšena koncentrace inokula na 1×10^5 spor/ml inokula. Symptomy fusariového vadnutí jsou hodnoceny stupnicí 0-3 viz Obrázek 1. Pro vyjádření míry odolnosti zelí hlávkového vůči Foc je dle příslušné metodiky vybrán vzorec pro výpočet indexu napadení DI (viz Graf 2), kde genotypy dosahující hodnot 0-50% (zelená barva) jsou vysoce odolné vůči Foc, genotyp mající hodnoty >50% je citlivý na napadení patogenem Foc (červená barva). Jednotlivé genotypy jsou v Grafu 2 zařazeny dle míry napadení do skupin pro rezistentní HR, R, IR a pro náchylné genotypy S, HS (Liu a kol., 2017).

Graf 3 Hodnocení odolnosti vybraného sortimentu odrůd, novošlechtění a linií zelí hlávkového na rozvoj fusariového vadnutí



Graf 4 Stupeň napadení zelí hlávkového *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*



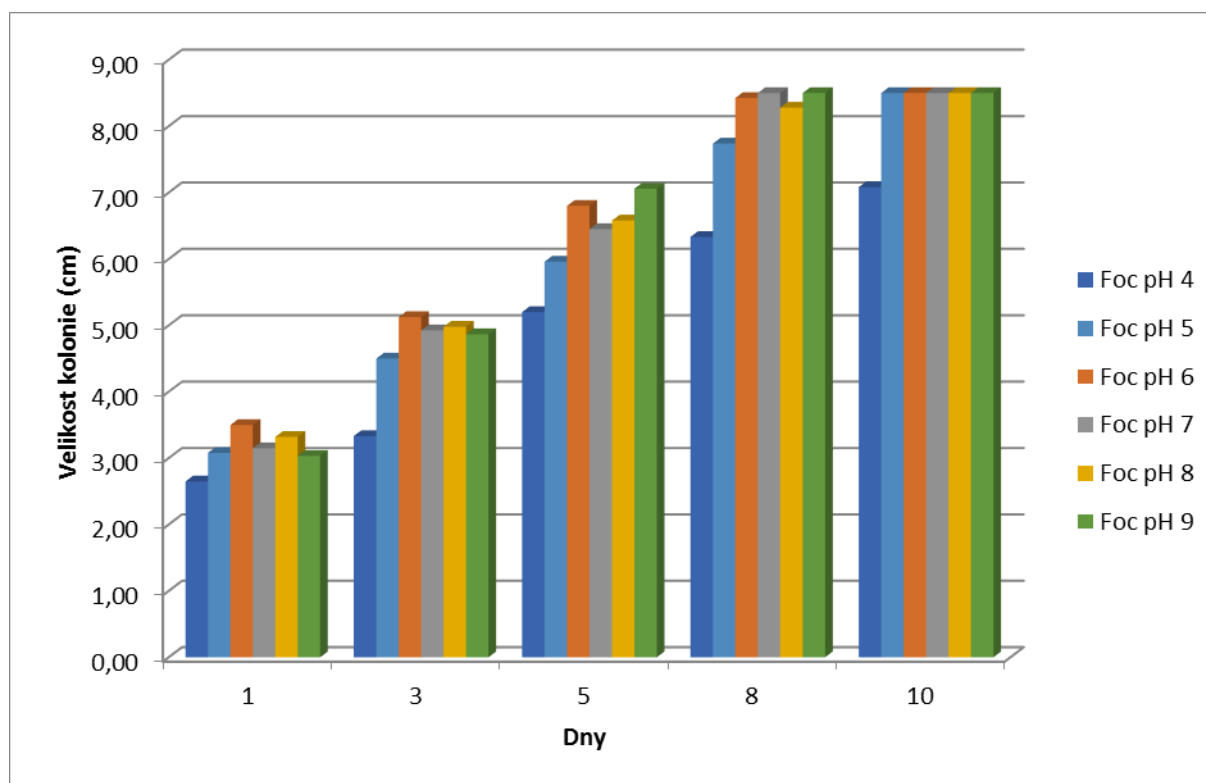
Hodnoty stupně napadení jsou vyhodnoceny neparametrickým testem Kruskal-Wallis, jelikož se nejedná o normální rozdělení dat. Krabicový graf znázorňuje výsledky analýzy. Odolnost vůči patogenu Foc vykazovaly rostliny zelí hlávkového šlechtitelské linie L-1, L-2. Tyto linie jsou rodičovskými liniemi odrůdy A, která rovněž vykazuje odolnost vůči patogenu Foc. Novošlechtění pod kódovým označením N-32 vykazuje odolnost vůči Foc.

Naopak odrůdy s (použita jako pozitivní kontrola) a C jsou náchylné, vykazovaly nejvyšší míru napadení. Ze šlechtitelských linií byly nejvíce napadené L-5 a L-3.

IV.4 Interakce genotypu a půdních podmínek ve vztahu k citlivosti k Foc

IV.4.1 Hodnocení vlivu pH na růst *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans*

Graf 5 Vliv pH na růst mycelia *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*



Z grafu 4 je patrný rozdíl při růstu v prostředí s odlišnými hodnotami pH, přírůstky mycelia se lišily ve variantách s nižšími (oproti vyšším hodnotám) hodnotami pH a to 4 a 5, při variantě pH 4 patogen rostl znatelně pomaleji a během 10 dnů nezarostl celou miskou (9 cm). Nejrychleji zarostlo mycelium patogena misku při hodnotách pH 6, 7 a 9. Za stejné časové období nezarostlo mycelium celou misku ve variantách s hodnotami pH 4, 5 a 8. Z výsledků růstu Foc na mediu s různými hodnotami pH a literatury převážně vyplývají ideální hodnoty pH pro růst patogena v rozmezí 6 – 8. Je také patrné, že mírně kyselé (4 a 5) až mírně alkalické (8 a 9) podmínky stále dostačují druhu *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* k růstu. Se zvýšením pH se patogen vyrovnává mnohem lépe než s nižšími hodnotami pH.

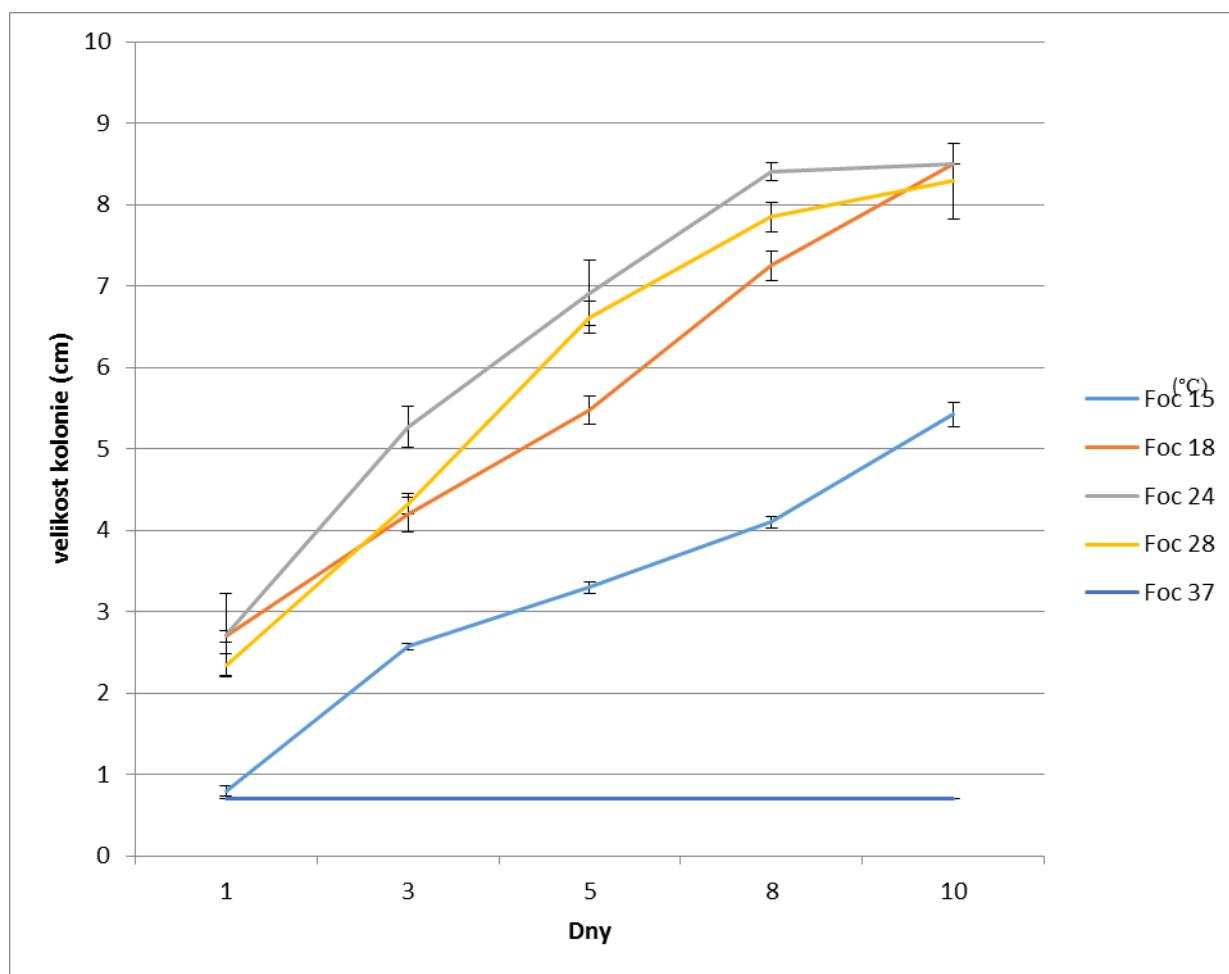
Z uváděné literatury a výsledků jasně vyplývá informace týkající se růstu *F. oxysporum* za rozdílných hodnot pH. Následná specifikace pro druh se jeví jako nedostačující

a samotné formae speciales se velmi lišily v reakci na rozdílné hodnoty pH. Velmi důležité je specifikovat druh *F. oxysporum* na formae speciales.

IV.4.2 Hodnocení vlivu teploty na růst *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* v in-vitro podmínkách (PDA medium)

Pro experiment bylo vybráno 5 rozdílných teplot; 15, 18, 24, 28 a 37 °C. Kultivace probíhala na standardním PDA mediu. Kultury byly očkované terčíkem mycelia o průměru 7 mm. Terčík byl umístěn na střed Petriho misky. Během kultivace byl pravidelně měřen průměr Foc kolonií. Nejrychleji rostlo Foc při teplotách 24 a 28 °C. Naopak nejmenší přírůstky mělo při teplotě 15 °C, při teplotě 37 °C nedošlo během kultivace k žádným přírůstkům.

Graf 6 Vliv teploty na růst *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*



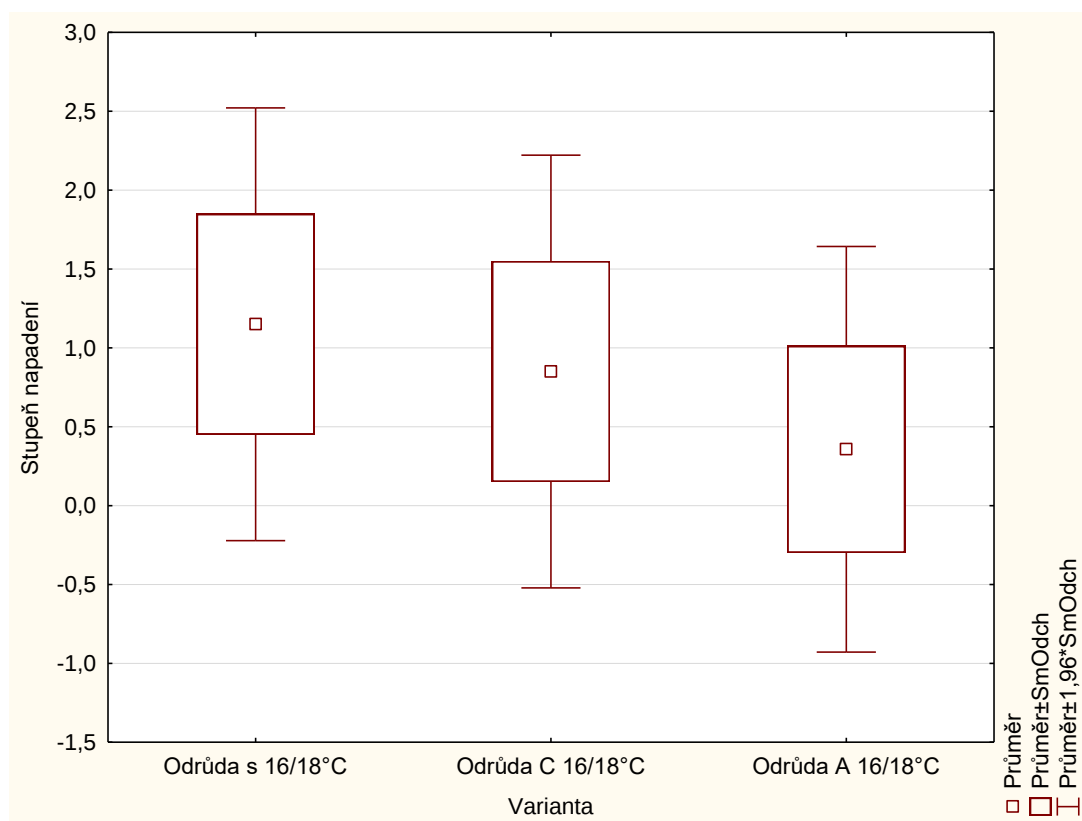
Z grafu 5 je patrné teplotní rozhraní, při kterém je patogen nejvíce aktivní. Při teplotě 37 °C patogen nejevil známky růstu, po ukončení experimentu byla tato varianta umístěna do

teploty 24 °C, ani poté nejevil patogen známky růstu, nejspíše byl dlouhodobým působením vyšší teploty inaktivován.

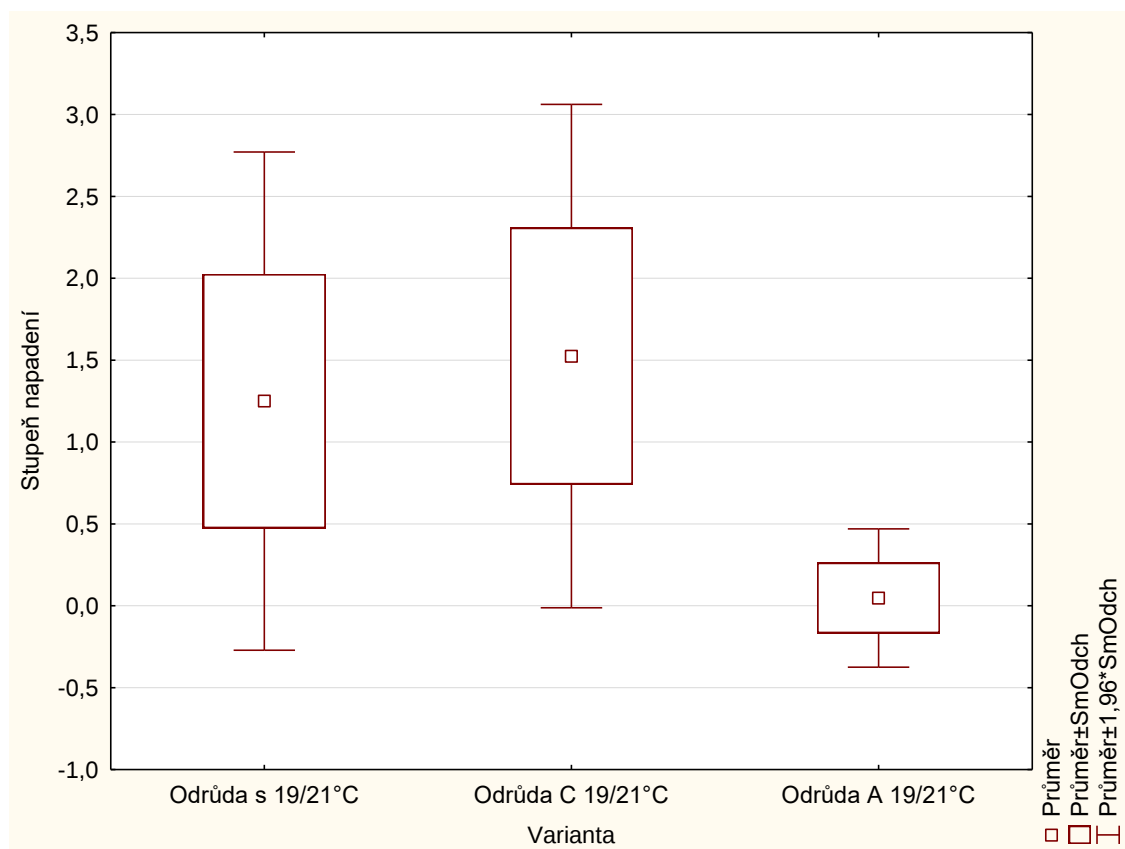
IV.4.3 Hodnocení vlivu odlišných teplotních režimů na rozvoj *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* (pěstební substrát)

Nejvhodnější parametry pro infekční pokusy v pěstebním substrátu vykazovalo inokulum s koncentrací spor 1×10^5 . Nižší koncentrace (10^3 a 10^4) vykazovaly nedostatečný infekční potenciál. Standardní pěstební substrát Profimix (Agro CS Česká Skalice) byl nainfikován Foc a poté do něj byly pikýrovány rostliny zelí, celkem byly použity 3 odrůdy hlávkového zelí, dvě citlivé a jedna odolná. Byl hodnocen vliv teplot 16/18, 19/21 22/24 a 26/28 °C (den 12 hod/noc 12 hod). První symptomy napadení se u varianty (citlivé odrůdy) 22/24 °C objevily po 2-3 týdnech, u variant s nižšími teplotami po 3-4 týdnech od inokulace. U varianty 22/24 °C docházelo k postupnému projevu symptomů a úhynu rostlin. Varianty 16/18 a 19/21 °C 5-6 týdnů po inokulaci vykazovala stále pouze počáteční symptomy s minimem uhynulých rostlin. Při variantě 26/28 °C byl u citlivých odrůdy nástup symptomů velmi rychlý, do 1-2 týdnů byla většina rostlin již uhynulá. Rostliny tolerantní odrůdy vykazovaly pouze počáteční symptomy, včetně varianty s nevyššími teplotami 26/28 °C.

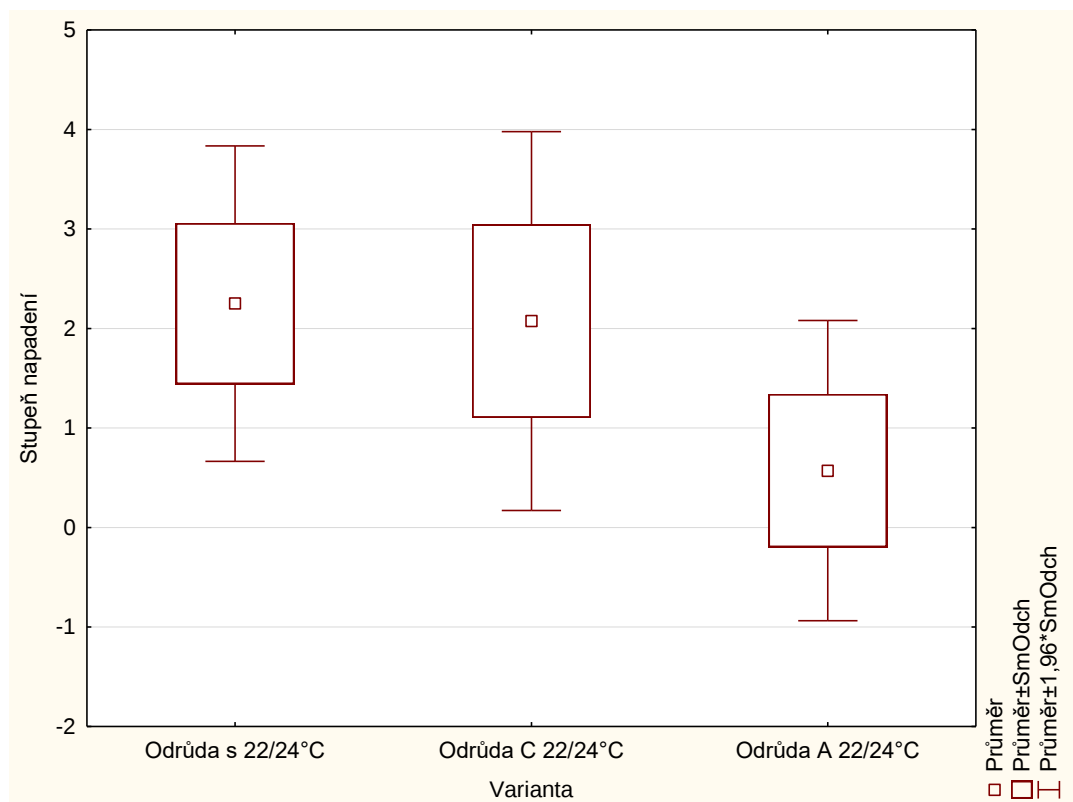
Graf 7 Vliv odlišných teplotních režimů na rozvoj *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*



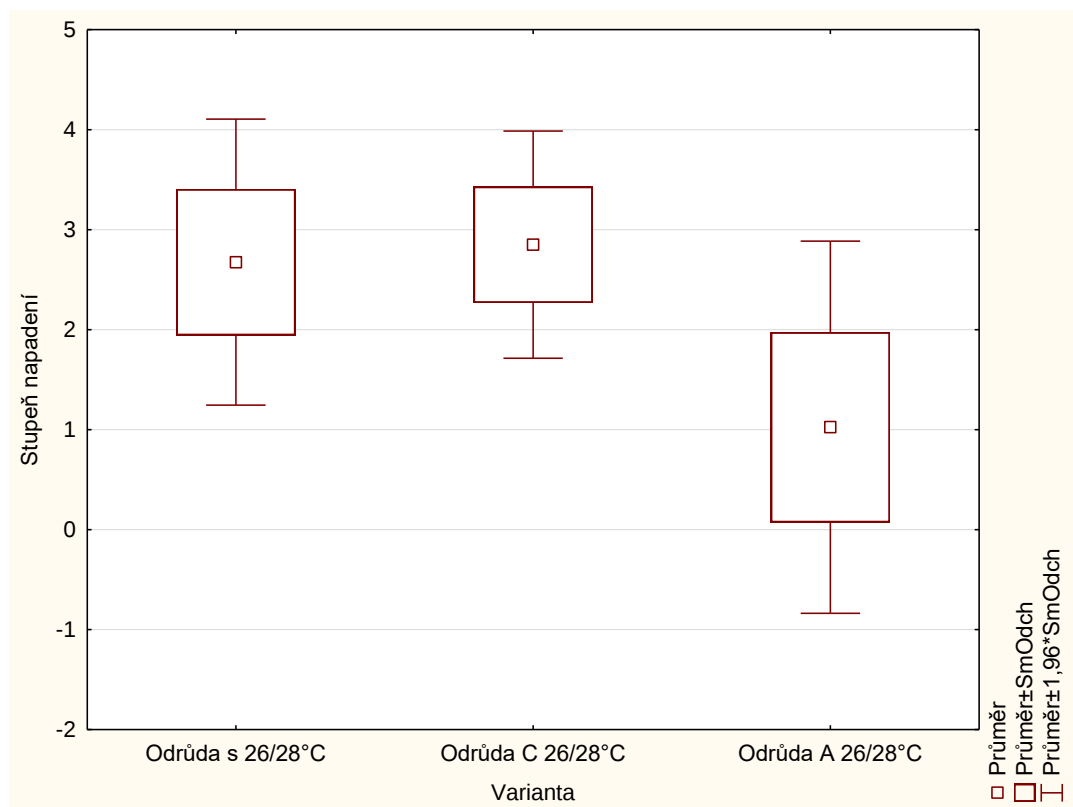
Graf 8 Vliv odlišných teplotních režimů na rozvoj *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*



Graf 9 Vliv odlišných teplotních režimů na rozvoj *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*



Graf 10 Vliv odlišných teplotních režimů na rozvoj *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*



IV.4.4 Vliv odlišných půd na infekci Foc

Byly založeny experimenty s půdou získanou ve Svijanském Újezdě a Otčích-Důlance. Rostliny hlávkového zelí, odrůdy L byly inokulovány způsobem máčení po dobu 15 minut v inokulu o koncentraci spor 1×10^5 , následně byly pikýrovány do sadbovače (obsah buňky 54 ml) naplněné půdou. Teplotní režim experimentu byl nastaven na 22/24 °C (12 den/12 noc). Mezi půdami nebyl rozdíl v intenzitě infekce.

IV.5 Hodnocení antagonistického vztahu vybraných mikroorganismů k Foc

Z výsledků získaných z laboratorních experimentů lze považovat za účinnou bakterii pouze *Bacillus amyloliquefacient*, která omezila růst mycelia Foc, který se při průměru kolonie 5,93 cm zcela zastavil, zatímco u kontrolní varianty byl po 14 dnech průměr kolonie 8,5 cm.

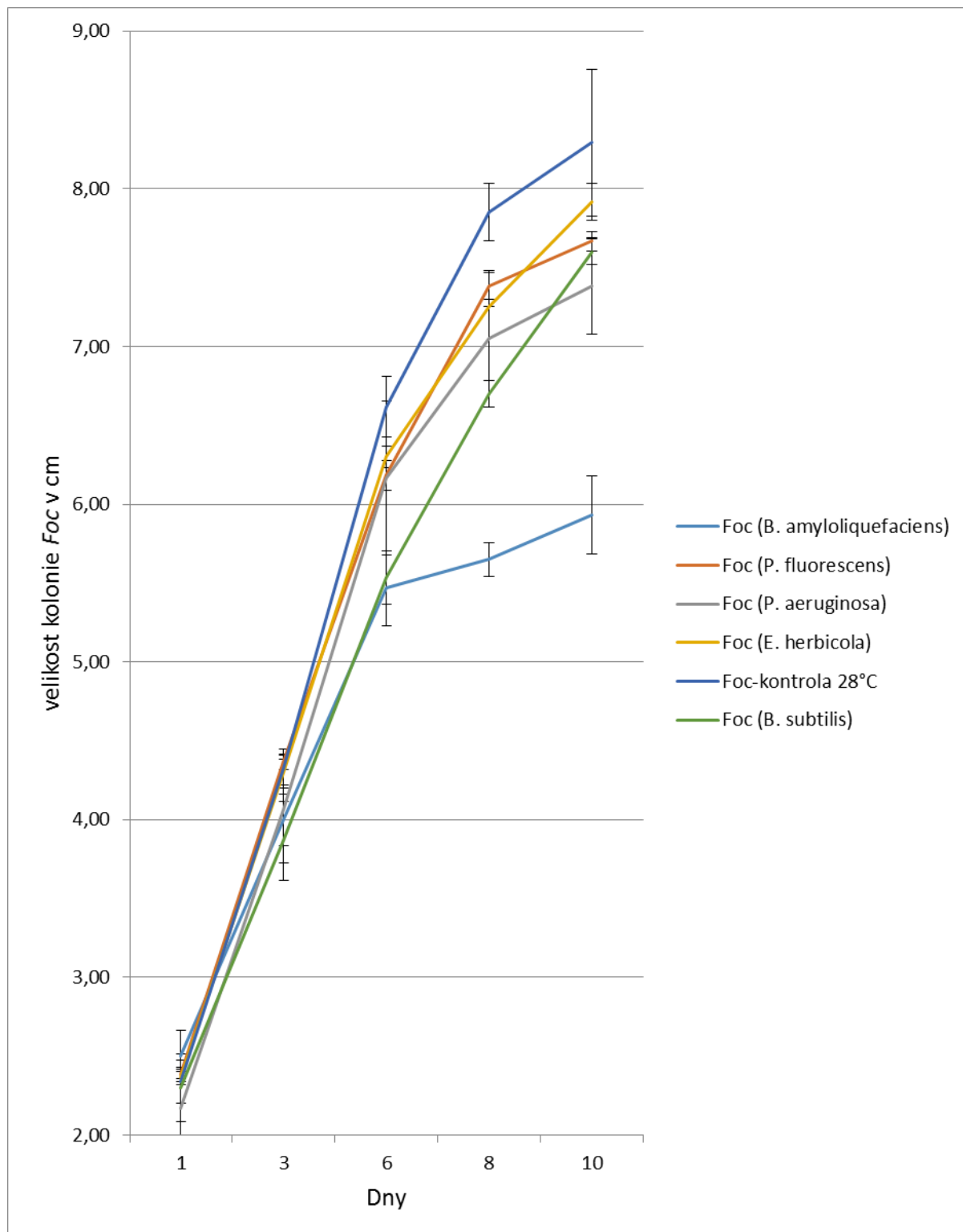
Bakterie *Pseudomonas fluorescens* a *Bacillus subtilis* pouze zpomalily, ale nezastavily růst patogena Foc, který postupně bakterie přerůstal.

Z hub nejvíce snížila velikost průměru kolonie patogena *Trichoderma harzianum* (2,62 cm), houba během 2–3 dní zcela přerostla a pohltila kolonii Foc. Snížení velikosti průměru kolonie patogena došlo i u varianty s *Trichoderma hamatum* a *Trichoderma asperillum*, které potlačily a velmi brzy zcela zastavily růst kolonie Foc.

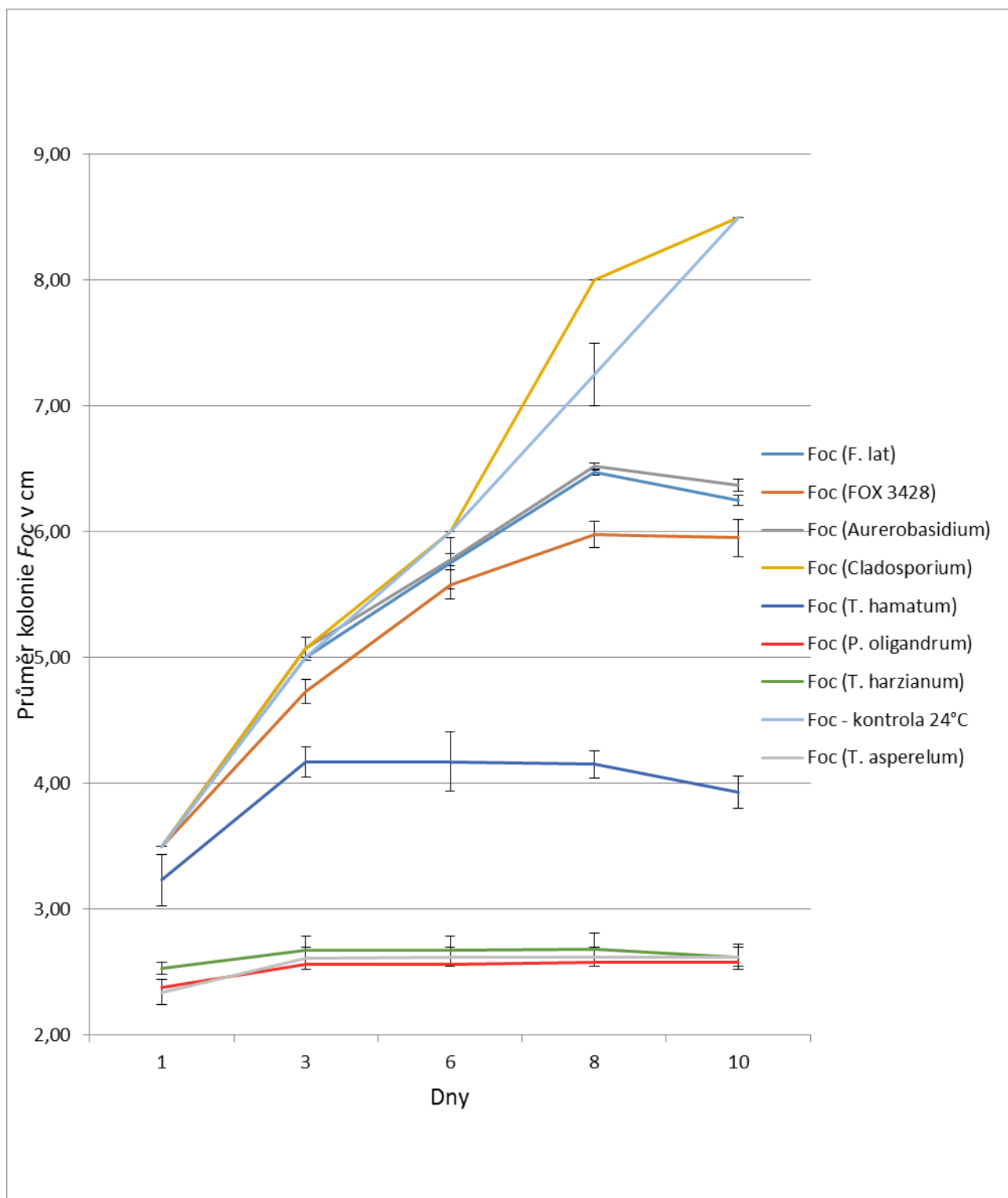
Podobné účinky výkázalo také *Pythium oligandrum*, které velmi rychle dosáhlo kolonie Foc a omezilo její rozrůstání.

U varianty s nepatogenním kmenem *Fusarium oxysporum*, došlo k vytvoření inhibiční zóny mezi oběma mikroorganismy, a k zastavení růstu patogena i zmenšení průměru kolonie Foc na 5,95 cm

Graf 11 Růst kolonií *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* v interakci s vybraným sortimentem bakterií



Graf 12 Růst kolonií *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* v interakci s vybraným sortimentem hub





Obrázek 3 Vpravo *Bacillus amyloliquifascient*, vlevo znatelně potlačené Foc.



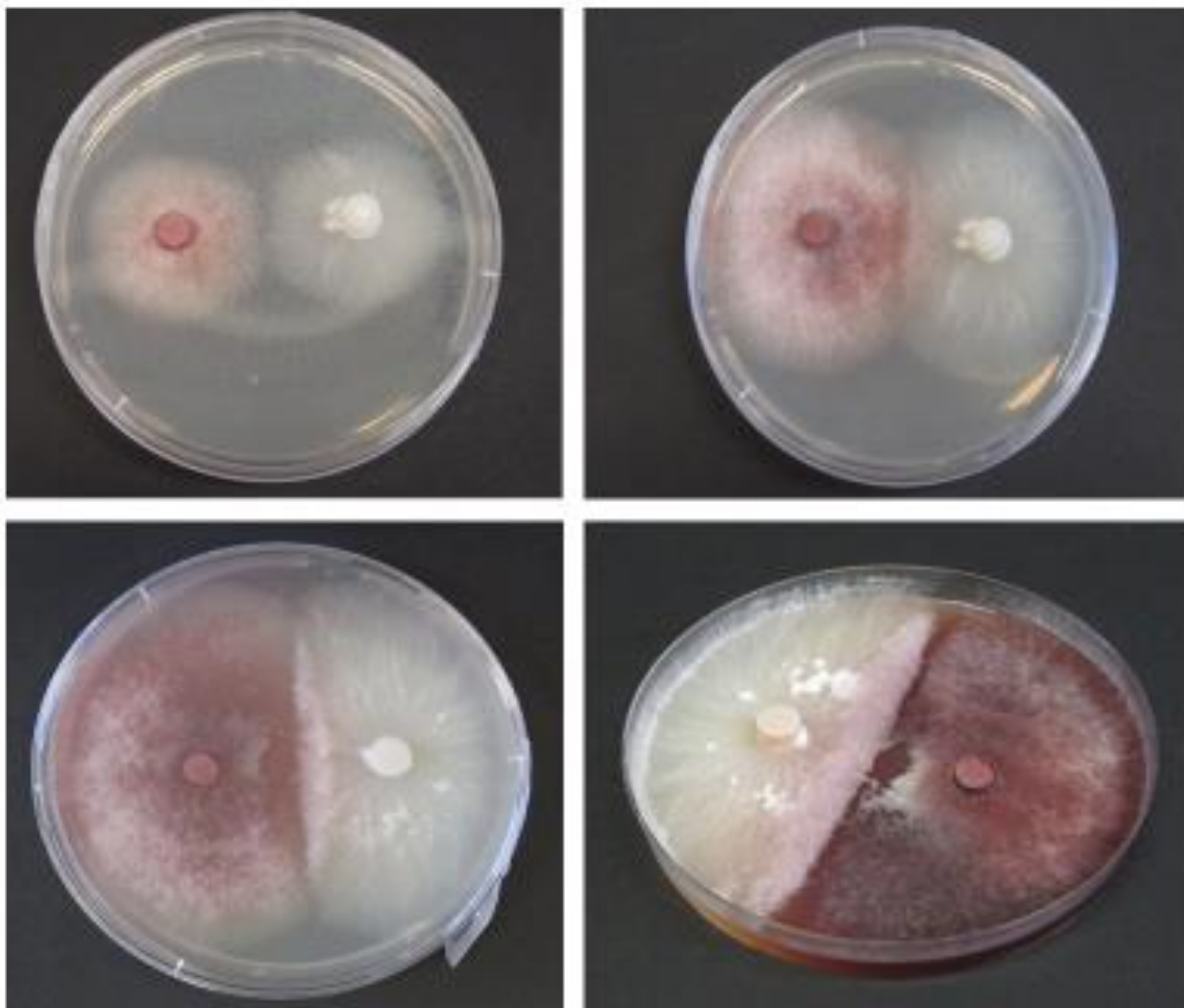
Obrázek 4 Nepatogenní kmen *F. oxysporum* (vpravo) a jasná inhibiční zóna mezi ním a patogenním Foc (vlevo).



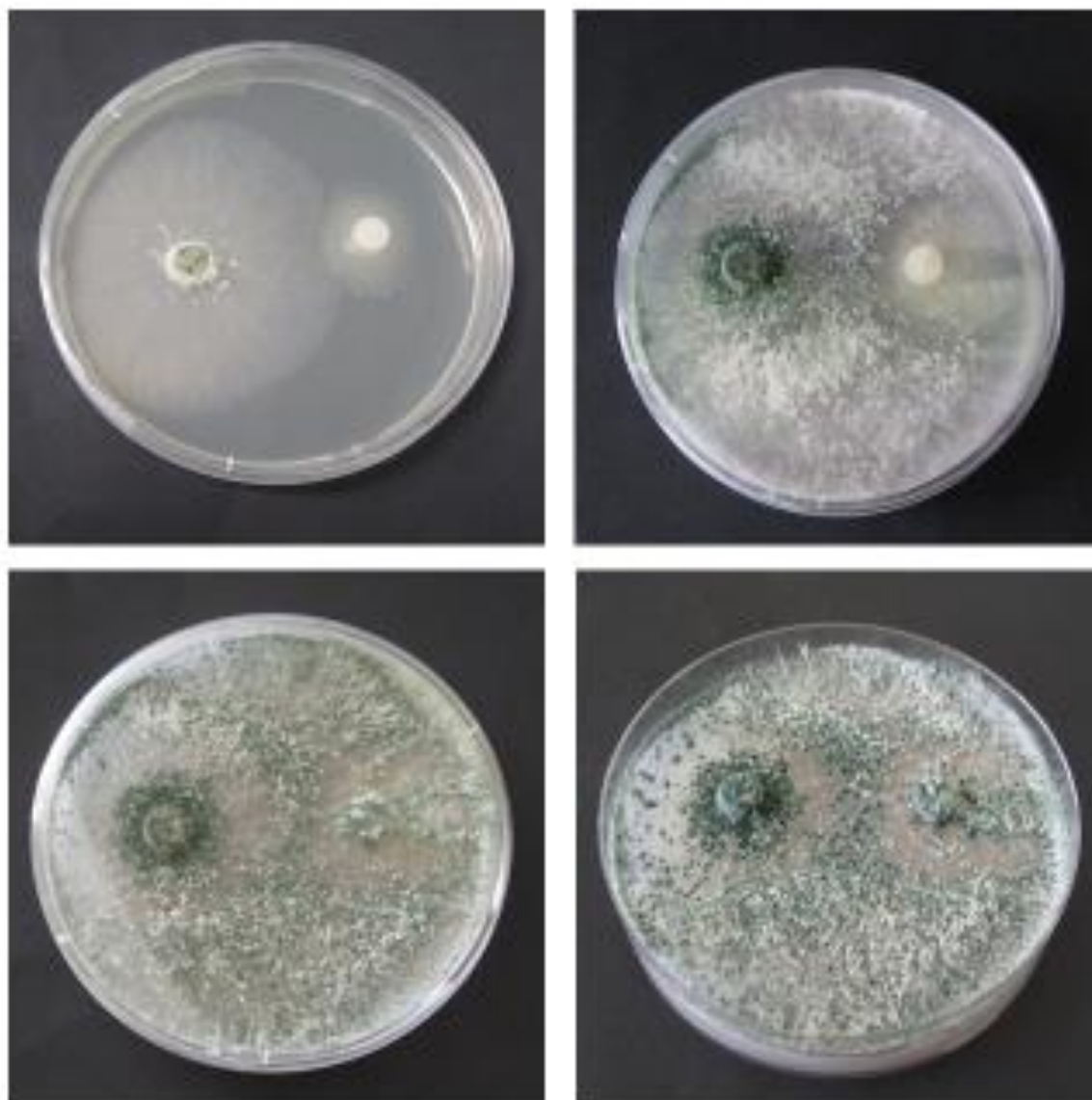
Obrázek 5 *Trichoderma hamatum* (vlevo) a jasně ohraničená kolonie Foc (vpravo).



Obrázek 6 Foc (vlevo), znatelně přerůstá kolonii bakterie *B. subtilis*.



Obrázek 7 Postupný růst Foc a nepatogenního Fox 3428



Obrázek 8 Postupný vývoj interakce *T. asperellum* a Foc



Obrázek 9 Znatelně omezené Foc pomocí *Pythium oligandrum*

V Závěr

Celkem bylo otestováno 39 genotypů zelí hlávkového na odolnost vůči patogenu *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*. Mezi jednotlivými genotypy pozorujeme statisticky významné rozdíly. Tedy můžeme po otestování specifikovat, zda se jedná o rezistentní genotyp či náchylný k fusariovému vadnutí.

Z celkového počtu testovaných lze stanovit 22 rezistentních genotypů, přičemž 6 genotypů nesou vlastnost vysoké rezistence (HS). Rezistentní linie mohou být dále využity ve šlechtění pro získání nových rezistentních odrůd.

Podle námi provedených experimentů v duálních testech na Petriho miskách s PDA médiem se jako účinná bakterie prokázala pouze *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, která omezila a potlačila růst *Foc*. Naopak v literatuře jako účinné uváděné organismy *Pseudomonas fluorescens* CCM 215 (Laksmidevi a kol., 2015) a *Bacillus subtilis* (Ajilogba a kol., 2013) se v našich experimentech projeví jako neúčinné. Z hub byla nejefektivnější *Trichoderma harzianum* CCF 2714, která během 2 - 3 dní zcela přerostla a pohltila kolonii *Foc*. Velmi účinná byla též *Trichoderma hamatum* CCF 2390, která potlačila a velmi brzo zastavila růst *Foc*. Obě ze sbírek Přírodovědecké fakulty UK. Účinná se ukázala také *T. asperellum* ATCC 204424. Obdobě účinné bylo také *Pythium oligandrum* CBS 530.74, které velmi rychle dosáhlo kolonie *Foc* a omezilo její šíření. Proti patogenu byl vyzkoušen i nepatogenní kmen *Fusarium oxysporum* CCF 3428, jehož mycelium po "setkání" s myceliem *Foc* zastavilo jeho růst a byla zřejmá inhibiční zóna mezi oběma mikroorganismy.

Závěrem lze říci, že se v budoucnu může jednat o potenciálně nebezpečného půdního patogena, který způsobuje vážnější škody za teplého a suššího počasí, který je typický pro jižněji položené státy než je ČR (vážné škody způsobuje např. v Kalifornii, znám je z Itálie a jižní Ukrajiny). Základem ochrany do budoucna bude především prevence a hlavně dostatečná a správná hygiena na pozemku, v halách a obecně místech, kde se uchovává nářadí, mechanizace, hnojiva apod. Jistou možností ochrany mohou dávat přípravky na bázi zmíněných mikroorganismů, například velmi známé a dostupné Polyversum (*Pythium oligandrum*), RhizoVitel 42 (*Bacillus amyloliquefaciens*) od firmy Biocont laboratory a dále dostupný přípravek ze Slovenska Trichomil (*Trichoderma harzianum*) apod. Problém u podobných přípravků může být v dostatečném množství spor mikroorganismů, který musí být pro účinnou aplikaci velmi vysoký (Kashiwa, 2016). Určitou překážkou může být i legislativa, kdy například přípravek Polyversum byl na několik let zakázán a opětovně povolen. Nejlepší způsob ochrany ovšem spočívá ve využití rezistentních odrůd.

VI Srovnání novosti postupů

Odborná literatura prezentuje obvykle pouze dílčí aspekty problematiky fusariového vadnutí působeného fytopatogenní houbou *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* (Foc). Novost této metodiky spočívá především v komplexnějším pohledu na problematiku fusariového vadnutí u brukvovité zeleniny s ohledem na klíčové faktory, které ovlivňují stupeň onemocnění. Rovněž jsou zde prezentovány výsledky hodnocení odolnosti širšího sortimentu genotypů zelí hlávkového včetně nových, moderních odrůd a novošlechtění k Foc, které dosud v literatuře takto komplexně prezentovány nebyly.

VII Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika je určena šlechtitelům, semenářským firmám a pěstitelům zeleniny (především zelí hlávkového), kteří získané poznatky prezentované v této metodice budou využívat v praxi. Vydavatelem metodiky je Česká zemědělská univerzita v Praze a metodika bude v elektronické podobě přístupná na webových stránkách České zemědělské univerzity. Smlouva o využití metodiky bude uzavřena s firmou MORAVOSEED CZ a.s.

VIII Ekonomické aspekty

Uplatněním certifikované metodiky lze očekávat několik ekonomických přínosů. Výběrem vhodného sortimentu odolnějších odrůd, optimalizací pěstebních podmínek (pH, částečně i teplota) a vyšším podílem antagonistických organismů uplatňovaných v zelinářské praxi může vést k omezení sklizňových ztrát zelí hlávkového vlivem fusariového vadnutí. Vzhledem k tomu, že tato choroba bude do budoucna nabývat více na významu, lze očekávat omezení sklizňových ztrát v rozmezí 5 - 8 %. Při roční produkci zelí hlávkového na 57 145 tun, při ceně produkce 5082,- Kč/1t se jedná o potenciální roční úsporu 8,7 – 12,2 mil Kč.

Lze rovněž očekávat zvýšený zájem pěstitelů mj. v integrovaném a ekologickém systému produkce o tyto odrůdy nejen u domácích, ale i zahraničních odběratelů, což povede ke zvýšení prodeje osiva s deklarovanou vyšší odolností k Foc v řádech mil. Kč.

IX Seznam použité literatury

Ajilogba, F. C., Babalola, O. O., Ahmad, F. 2013. Antagonistic Effects of *Bacillus* Species in Biocontrol of Tomato Fusarium Wilt. *Stud. Ethno-Medicine* 7, 205–216.

El-Katatny, H. M., Abdelzaher., A. M. H., Shoukamy, A. M. 2006. Antagonistic actions of *Pythium oligandrum* and *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi (*Fusarium oxysporum* and *Pythium ultimum* var. *ultimum*). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 39 (4). 289 - 301.

Gordon, T. R., Martyn, R. D. 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology*. 35. 111-128. DOI: <<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.35.1.111>>.

Kashiwa, T., Inami, K., Teraoka, T., Komatsu, K., Arie, T. 2016. Detection of cabbage yellows fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* in soil by PCR and real-time PCR. *J Gen Plant Pathol*. 82. 240 - 247.

Kochman, J. 2007. *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* Fusarium wilt of canola. *Plant health Australia*. September 2007. 21 pp.

Koike, T. S., Gladders, P., Paulus, O. A. 2007. *Vegetables diseases*. Manson Publishing Ltd. London. 448 pp.. ISBN: 978-0-12-373675-8

Laksmidevi P., Gopalakrishnan P., Karthikeyan G., 2015: In Vitro Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* Strains Against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* Causing Wilt Disease of Tomato. *International Journal of Tropical Agriculture*, 33: 3360–3365.

Liu, X., Ling, J., Xiao, Z., Xie, B., Fang, Z., Yang, L., Zhang, Y., Lv, H., Yang, Y. 2017. Characterization of emerging populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* causing cabbage wilt in China. *Journal of Phytopathology*. 165(11-12). p. 813-821. Dostupné: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jph.12621/full>>.

Verna, L. R., Sharma, R. C. (eds.). 1999. *Diseases of horticultural crops: vegetables, ornamentals and mushrooms*. Indus Publishing Company. Delhi. p. 736. ISBN: 8173871027.

X Seznam publikací, které předcházely metodice

- KOUDELA, M., NOVOTNÝ, Č. Influence of cultivars and seed thermal treatment on the development of fungal pathogens in carrot and onion plants. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 2016, roč. 64, s. 1181 – 1189.
- KOUDELA, M. 2016. Influence of cultivars on the development of fungal pathogens in carrot and onion plants, 2nd International Conference on Agronomy and Horticulture, Xi'an, China (ICAH 2016), Abstract Book, p. 24.
- KOUDELA, M., KOFRÁNKOVÁ, V., JELÍNEK, T., NOVOTNÝ, Č. Effect of selected factors on growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* and evaluation of cabbage cultivar resistance to Fusarium wilt. 8th World Congress on Plant Genomics and Plant Science, 10. – 11. 8. 2018, Osaka, Japonsko.
- NOVOTNÝ, Č., SCHULZOVÁ, V., KRMELA, A., HAJŠLOVÁ, J., SVOBODOVÁ, K., KOUDELA, M. Ascorbic Acid and Glucosinolate Levels in New Czech Cabbage Cultivars: Effect of Production System and Fungal Infection. *Molecules*, 2018, 23(8): 1855.

Název publikace: Vyhodnocení odolnosti šlechtitelských materiálů a dalších genových zdrojů vůči *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* (certifikovaná metodika)

Autoři: Tomáš Jelínek*, Věra Kofránková*, Martin Koudela*, Čeněk Novotný**, David Novotný*** (abecední pořadí)

Vydavatel: Česká zemědělská univerzita v Praze

Vydání: první

Rok vydání: 2018

978-80-213-2897-6