



PROSTŘEDKY DIAGNOSTIKY A OCHRANY PROTI VYBRANÝM DRUHŮM ŠKODLIVÝCH MIKROORGANISMŮ ZELÍ

**DAVID NOVOTNÝ, MIROSLAV BARÁNEK,
ALEŠ EICHMEIER, JAROSLAV SALAVA,
ELIŠKA PEŇÁZOVÁ, JAKUB PEČENKA, MARTIN KOUDELA**



**UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA
METODIKA PRO PRAXI**

**VÝZKUMNÝ ÚSTAV ROSTLINNÉ VÝROBY, v.v.i.,
MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ, ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu Národní agentury zemědělského výzkumu MZe č. 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“.

Metodika je určena pro praxi. O uplatnění metodiky byla 4. 12. 2018 podle ustanovení § 269 zákona 513/1991 Sb., obchodního zákoníku uzavřena smlouva s firmou MORAVOSEED CZ a.s.

Oponenti:

Odborný oponent: doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D., Univerzita Palackého v Olomouci,
Přírodovědecká fakulta, Katedra botaniky

Oponent ze státní správy: Ing. Kristýna Hromadová, Ústřední kontrolní a zkušební ústav
zemědělský, Brno

Autoři:

RNDr. David Novotný, Ph.D. (Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.)

doc. Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D. (Mendelova univerzita v Brně)

Ing. Aleš Eichmeier, Ph.D. (Mendelova univerzita v Brně)

doc. Dr. Ing. Jaroslav Salava (Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.)

Ing. Bc. Eliška Peňázová (Mendelova univerzita v Brně)

Ing. Jakub Pečenka (Mendelova univerzita v Brně)

doc. Ing. Martin Koudela, Ph.D. (Česká zemědělská univerzita v Praze)

Metodika byla schválena Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským, osvědčení číslo UKZUZ 007491/2019.

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha 6- Ruzyně

ISBN: 978-80-7427-291-2

Obsah

1. Cíl metodiky	4
2. Vlastní popis metodiky	4
2.1. Úvod	4
2.2. Houbové a bakteriální choroby osiva zelí	4
2.2.1. Choroby způsobené houbami a houbám podobných organismy	4
2.2.2. Bakteriózy zelí	5
2.3. Charakteristika zájmových škodlivých mikroorganismů	7
2.3.1. Charakteristika taxonu <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	7
2.3.2. Charakteristika taxonu <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i>	9
2.3.3. Charakteristika druhu <i>Botrytis cinerea</i>	11
2.4. Identifikace a detekce zájmových škodlivých mikroorganismů	13
2.4.1. Identifikace a detekce <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	13
2.4.2. Identifikace a detekce <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i>	16
2.4.3. Identifikace a detekce <i>Botrytis cinerea</i>	18
2.5. Ochrana zelí před škodlivými mikroorganismy	18
2.5.1. Využití nanočástic stříbra k eliminaci bakterie <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> na semenech rostlin čeledi brukvovitých	21
2.5.2. Využití esenciálních olejů při ochraně zelí před <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i> a <i>Botrytis cinerea</i>	19
2.5.3. Odolnost odrůd zelí vůči <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	24
2.5.4. Ochrana porostů a skladovaného zelí před poškozením <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i> a <i>Botrytis cinerea</i>	25
2.6. Závěr	27
3. Srovnání novosti postupů	27
4. Popis uplatnění metodiky	28
5. Ekonomické aspekty	28
6. Seznam použité literatury	29
7. Seznam publikací, které předcházely metodice	33

1. Cíl metodiky

Cílem této metodiky je popsat pracovní postupy, vč. postupů včasné detekce založené na použití polymerázové řetězové reakce (PCR), pro ochranu zelí před vybranými druhy bakterií a hub, přesněji před druhy *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* a *Botrytis cinerea*. Metodika doporučuje opatření, která pomohou předcházet a bránit poškození uvedenými fytopatogenními mikroorganismy.

2. Vlastní popis metodiky

2.1. Úvod

Brukvovitá zelenina patří mezi nejvýznamnější skupiny zeleniny produkované a konzumované v České republice a v rámci této skupiny je jednoznačně nejdůležitější zelí. Zelí se v posledních letech, tj. 2012-2016, pěstuje na 1230 – 1340 hektarech a celkově ho byvá ročně sklizeno v rozmezí zhruba 45 – 60 tisíc tun při průměrném výnosu v rozmezí 35,8 – 47,3 tun na hektar (Buchtová 2017). Česká republika je také zemí, kde se zelí šlechtí s cílem získat nové ekonomicky výnosnější odrůdy, tedy i odrůdy odolnější vůči abiotickým činitelům, chorobám a škůdcům. Efektivitu produkce zelí ovlivňuje nejen vhodná výživa a správné provedení agrotechnických opatření, klimatické podmínky v daném roce, ekonomická situace na trhu s touto komoditou, ale i míra poškození zelí škodlivými druhy organismů, vč. hub a bakterií, a to jak ve fázi před sklizní, tak po sklizni.

2.2. Houbové a bakteriální choroby zelí

Rostliny zelí a jejich následně skladované hlávky jsou poškozovány různými abiotickými faktory, ale i viry, viroidy, bakteriemi, houbami a houbám podobnými organismy (v širokém slova smyslu) a živočichy. Následující text je věnován v ČR nejvýznamnějším mykózám sensu lato a bakteriózám.

2.2.1. Choroby způsobené houbami a houbám podobných organismy

Nejzávažnější chorobou zelí, tradičně řazenou mezi mykózy, je nádorovitost kořenů brukvovitých (= boulovitost kořenů brukvovitých = plasmodioforová nádorovitost brukvovitých) vyvolávaná druhem *Plasmodiophora brassicae* (dnes řazena do skupiny Rhizaria). Na kořenech se vytváří boulovité nádory, které se rozpadají působením bakterií. Díky poškození kořenů dochází k omezenému přísunu vody, rostliny jsou následně slabší, vadnou, listy žloutnou nebo mění barvu do červena nebo fialova. V případě silnějšího napadení odumírají i celé rostliny (Koike et al. 2007, Rod et al. 2005).

Další významnou chorobou zelí je plíseň brukvovitých způsobovaná druhem *Hyaloperonospora parasitica* (= *Peronospora parasitica*). Tento škodlivý organismus napadá listy mladých i starších rostlin, přičemž listy žloutnou, odumírají a opadávají. Může pronikat i do hlávek a způsobovat jejich mokrou skládkovou hnilobu (Koike et al. 2007, Rod et al. 2005).

Alternariovou skvrnitost brukvovitých, tj. poškození listů ve formě šedohnědých, hnědých až černých skvrn, někdy splývajících, případně žloutnutí, zasychání a opadání listů, způsobují *Alternaria brassicae* a *A. brassicicola*. Podobné poškození listů (skvrny s fialovým lemem) může způsobovat druh *Mycosphaerella brassicicola* (Koike et al. 2007, Rod et al. 2005).

Poškození kořenů, žloutnutí a uvadání listů, stonků a kořenových krčků (symptom známý jako černá noha), zaostávání rostliny v růstu, případně hnilobu skladovaných hlávek způsobuje houba *Leptosphaeria maculans* (= *Phoma lingam*). Kořeny napadá i druh *Rhizoctonia solani*, který způsobuje zaškrcování kořenových krčků, černání kořenů, vadnutí listů a někdy i hnilobu košťálů a hlávek (Koike et al. 2007, Rod et al. 2005).

Kromě výše zmíněných dvou druhů hub se na padání klíčnic rostlin podílejí další půdní mikroorganismy, oomycety *Pythium* spp. a *Phytophthora* spp. či houby *Olpidium brassicae*, *Botrytis cinerea*, *Thielaviopsis basicola*, *Fusarium* spp., *Verticillium* spp.. Typickým příznakem je vodnatění, černání a zužování kořenového krčku mladých rostlin. Následně dochází ke sklánění a hynutí rostlin. V některých případech dochází k hnědnutí nebo černání kořenů a následně k jejich odumírání nebo k odumírání celých klíčků (Koike et al. 2007, Rod et al. 2005).

Daleko častěji než bílá hniloba poškozuje zelí šedá hniloba, způsobovaná houbou *Botrytis cinerea*. Tato hniloba se projevuje především na skladovaných hlávkách, kde dochází k hnědnutí pletiva. Přitom se vytváří typický šedohnědý poměrně vysoký povlak, tvořený hnědým myceliem a konidiofory, z nichž vznikají jednobuněčné konidie, které se dále snadno šíří a napadají rostlinná pletiva. Přednostně jsou napadány poraněné listy nebo košťály, u kterých je snadnější vstup této houby do pletiv rostliny. Houba přežívá na rostlinných zbytcích a její rozvoj podporuje nižší teplota, vyšší vzdušná vlhkost a kapky vody na rostlinách. Příčinou poranění, které umožní rozvoj této hniloby, může být poškození živočišnými škůdci, abiotické poškození (např. kroupy) a mechanické poškození člověkem při pěstování, sklizni a manipulaci při skladování (Koike et al. 2007, Rod et al. 2005).

Skladované hlávky zelí jsou nejčastěji poškozovány bílou nebo šedou hnilobou. V případě bílé hniloby dochází k vodnatění, hnědnutí a měknutí pletiv, následně k vadnutí a odumírání celé rostliny. Na spodní části stonku a hlávky se tvoří bílé mycelium a černá tvrdá sklerocia. Původce této hniloby je houba *Sclerotinia sclerotiorum* (Koike et al. 2007, Rod et al. 2005).

Rostliny zelí mohou být kolonizovány také různými druhy rodu *Fusarium*, z nichž taxon *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* způsobuje fusariové vadnutí zelí, které se projevuje žloutnutím, později zhnědnutím a opadem listů, tmavým až hnědým zbarvením xylému ve stonku rostlin. Postupně dochází k celkovému zežloutnutí, usychání a odumírání celé rostliny. Mycelium do rostlin vstupuje přes poraněné kořeny, prorůstá cévním systémem a nepříznivě ovlivňuje průtok vody a živin v průběhu růstu. První příznaky jsou spojeny se žloutnutím spodních listů následované hnědou nepravidelnou nekrotizací okrajů listů. Léze se zvětšují, až tvoří velké nekrotické oblasti, které vedou k opadu listů. Xylém je zbarven do různých odstínů hnědé. Napadené rostliny žloutnou, sesychají a časem umírají. K rozvoji této choroby dochází častěji a rychleji v teplejších podmínkách (24 – 29 °C), než při nižší teplotě (zejména pod 16 °C) (Koike et al. 2007).

2.2.2. Bakteriózy zelí

Původcem bakteriální černé žilkovitosti brukvovitých je *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Toto onemocnění je momentálně ekonomicky nejvýznamnější bakteriální chorobou zelí. Bakterie do rostliny vstupuje přirozenými otvory nebo poškozením způsobeným hmyzem, jinými patogeny nebo mechanickým poškozením. Za optimálních podmínek (vysoké vlhko a

teploty kolem 25 °C) se šíří xylémem rostlin za tvorby klišovitého polysacharidu xantanu, který spolu s rychle se množícími buňkami vlastní bakterie postupně ucpává cévní svazky. Následně, nejdříve však v období 10 – 14 dní po primární infekci, dochází ke tvorbě nekrotických skvrn ve tvaru V (listové žilky na řezu černě zbarvené) na okrajích listů. Při silné infekci ve stadiu hlávky, jsou na řezu košťálem dobře viditelná černá pletiva napadených cévních svazků. Primární infekci může pocházet již z osiva. V mezinárodní terminologii *X. c. pv. campestris* označujeme jako tzv. „seed born pathogen“ (přenosný semeny). Vzhledem k rychlému šíření infekce za ideálních podmínek se za kritické považuje výskyt již jednoho infikovaného semene z 10 000 testovaných, čemuž odpovídá také metodika pro testování *X. c. pv. campestris* doporučená organizací ISTA (International Seed Testing Association; <https://www.seedtest.org/upload/cms/user/2015-SH-7-019a.pdf>). Vzhledem k tomu, že tato bakterie může přežívat po mnoho let na alternativních hostitelích, jako jsou brukvovité plevely (např. kokoška pastuší tobołka (*Capsella bursa-pastoris*) anebo v posklizňových zbytcích, je možná primární infekce pravděpodobně i z těchto zdrojů. Následně mohou být bakterie kauzálního patogena rozptylovány v rámci kapek vody pocházejících z deště anebo horního zavlažování nebo prostřednictvím hmyzích vektorů parazitujících na porostech. V případě optimálních podmínek pro *X. c. pv. campestris* (tzn. v teplých a vlhkých obdobích) se pak infekce může rychle rozšířit po celém produkčním porostu.



Obrázek č. 1: Příznaky bakteriální černé žilkovitosti brukvovitých na listech



Obrázek č. 2: Příznaky bakteriální černé žilkovitosti brukvovitých na řezu košťálem napadených rostlin

Další bakteriální onemocnění nejen u zelí, ale i u dalších druhů zeleniny, je bakteriální měkká hniloba. Typickým příznakem bakteriální měkké hniloby je enzymatický rozklad pektinu, který je příčinou rozpadu rostlinných pletiv na kašovitou hmotu s nepříjemným zápachem. Na povrchu hlávky nebo košťálu se objevují tmavé, postupně postupně černající, vodou nasáklá rozkládající se pletiva, která postupně měknou, propadají se a zapáchají. Původcem bakteriální měkké hniloby může být více druhů z rodů *Pectobacterium* a *Pseudomonas*, přičemž nejčastěji ji způsobují *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (dříve *Erwinia carotovorum* subsp. *carotovorum*), *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*, *P. viridiflava* a *P. syringe* pv. *maculicola*. Tyto bakterie se šíří hmyzími vektory (např. v ústním ústrojí květilék nebo pochmurnatky mrkvové), vodou, nářadím apod. a do rostlin pronikají především v místech poškození, ale i přirozenými vstupními otvory. Průběh onemocnění je silně závislý na počasí, ideální podmínky pro šíření choroby jsou vlhko, mlha, deštivo při chladnějším počasí. V případě příznivých klimatických podmínek může způsobovat velké hospodářské ztráty. Při skladování je důležité zabránit přenosu bakterie na řezacích nástrojích nebo na rostlinných zbytcích v používaných zásobnících a zajištění skladovacích podmínek nevhodných pro šíření bakterie. Ochrana spočívá především ve výběru odolnějších odrůd (Rimmer 2007).

2.3. Charakteristika zájmových škodlivých mikroorganismů

2.3.1. Charakteristika taxonu *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Bakterie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (McCulloch) Dye infikuje širokou škálu rostlin z čeledi brukvovitých (Brassicaceae), mezi které patří například zelí, květák, brokolice, ředkve nebo huseníček. Tato bakterie je tedy hospodářsky významným patogenem (Williams, 1980). Její klasifikace prochází neustálým vývojem. Dříve byly jednotlivé druhy

v rámci rodu *Xanthomonas* klasifikovány na základě DNA-DNA hybridizace, což vedlo k vyčlenění výhradně vaskulárního patogena *X. c. pv. campestris* jakožto taxonu způsobujícího bakteriální černou žilkovitou brukvovitých a dalších taxonů, které způsobují vaskulární nebo listové symptomy jako je *X. c. pv. aberrans*, *X. c. pv. armoraciae*, *X. c. pv. barbareae*, *X. c. pv. incanae* a *X. c. pv. raphani*. Toto taxonomické rozčlenění však nadále podléhá dalším návrhům na změny, což přehledně prezentováno v práci např. Vicente et Holub (2013). Aktuálně nejvíce přijímané dělení (na 14 patovarů) je na stránkách EPPO (European Plant Protection Organisation), konkrétně na adrese <https://gd.eppo.int/taxon/1XANTG>.

Z hlediska morfologie se *Xanthomonas c. pv. campestris* řadí mezi gram-negativní, striktně aerobní bakterie tyčinkovitého tvaru s rozměry 0,4 – 0,6 µm x 1,0 – 1,8 µm. Tento druh nevytváří spory a je pohyblivý prostřednictvím jednoho bičíku. Preferuje zásaditější prostředí, optimální pH se udává v rozmezí 6 - 8, je ale schopna přežít v pH od 5,2 do 10,5 (Gorner et Valík; 2004).

Kamoun et al. (1992) rozdělili *X. c. pv. campestris* do pěti ras dle reakce kultivarů *Brassica rapa* a *B. juncea* na umělou infekci studovanými izoláty. Vicente et al. (1998) navrhli změny v uspořádání rasové struktury na základě modelu gen proti genu, kdy byly do testování reakcí zařazeny další kultivary druhů *B. oleracea* a *B. carinata*. Tento model vedl k rozlišení šesti ras. Později bylo rozpoznáno dalších pět ras (Fargier et Manceau 2007; Jensen et al. 2010; Cruz et al. 2017). V současnosti je uznávána existence 11 ras a z nich jsou rasy 1 a 4 celosvětově nejrozšířenější (Taylor et al., 2002; Vicente et Holub, 2013). Přehled diferenciačních genotypů *Brassica* spp. a jejich reakcí na napadení jednotlivými rasami je uveden v Tab. č. 1.

Tab. č. 1: Rozlišení ras *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na základě jejich reakcí na vybraných genotypech rodu *Brassica* (model dle Vicente et al., 2001; Fargier et Manceau, 2007; Jensen et al., 2010; Cruz et al., 2017)

Hostitel	Číslo rasy <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Wirosa F1' (<i>B. oleracea</i>)	+	(+)/+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
'Just Right Hybrid Turnip' (<i>B. rapa</i>)	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
'Seven Top Turnip' (<i>B. rapa</i>)	+	-	+*	-*	+*	+	+	-	-	-	-
PI 199947 (<i>B. carinata</i>)	-	+	-	-/+	+	+	+	-	-	+	+
'Florida Broad Leaf Mustard' (<i>B. juncea</i>)	-	+	-	-	(+)	+	-	-	-	-	+
'Miracle F1' (<i>B. oleracea</i>)	+	-/(+)	-/(+)	+	-	+	+	-	-	+	+

Vysvětlivky: + náchylnost, (+) nižší náchylnost, - rezistence, * při použití různých izolátů se může lišit

2.3.2. Charakteristika *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*

Houby známé pod označením *Fusarium* (čeleď Nectriaceae, řád Hypocreales, třída Sordariomycetes, podkmen Pezizomycotina, kmen Ascomycota) patří dnes do cca deseti příbuzných rodů. Nejvýznamnějším z těchto rodů jsou rody *Fusarium* a *Neocosmospora*. Druhy z tohoto rodu patří z hlediska zemědělství k nejvýznamnějším, protože mohou způsobovat choroby různých hospodářsky významných rostlin, přičemž v současnosti jsou na prvním místě z tohoto hlediska obiloviny. Mohou také produkovat mykotoxiny, které snižují kvalitu nebo dokonce znehodnocují některé zemědělské produkty. Dnes je v této skupině známo okolo 200 druhů a stále jsou rozpoznávány další, přičemž o mnohých dříve popsáných taxonech se hovoří jako o komplexech druhů (*Fusarium fujikuroi* species complex, *Fusarium graminearum* species complex, *Fusarium oxysporum* species complex, *Fusarium solani* species complex). Typickým znakem této skupiny hub jsou vícebuněčné hyalinní makrokonidie tvaru banánu, ale kromě toho některé druhy také vytvářejí hyalinní mikrokonidie a chlamydostry (Kirk et al. 2008, Leslie et Summerell 2006).

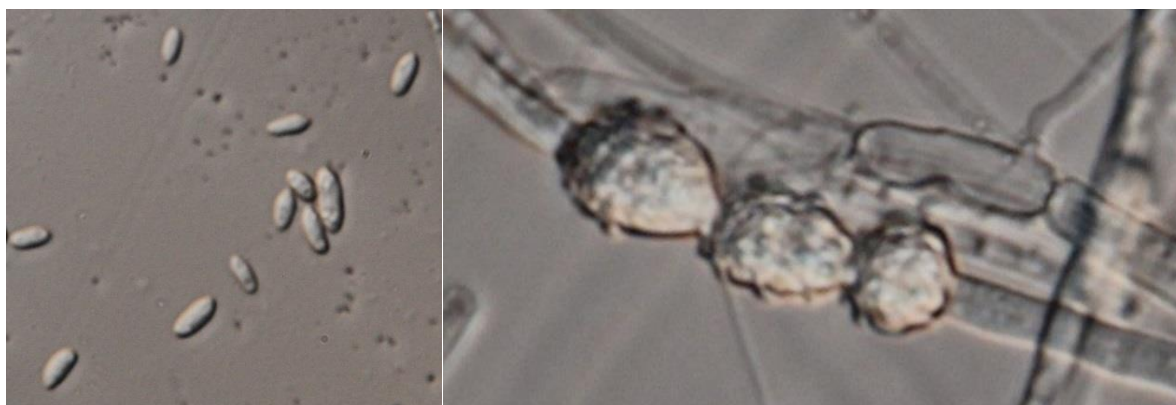
Druh *Fusarium oxysporum* Schltdl. patří mezi nejznámější druhy z tohoto rodu a v minulosti bylo v rámci tohoto druhu popsáno velké množství nižších taxonomických jednotek, především formae speciales a variet. Tento druh patří mezi tzv. široké taxony a vyskytuje se velmi často v půdě a rostlinách, u nichž způsobuje vadnutí a hniloby kořenů různých druhů ekonomicky významných rostlin. Dnes se ukazuje, že některé z těchto formae speciales mohou být skutečnými druhy. Na druhou stranu se také ukazuje, že mnohé z formae speciales nemají monofyletický původ, což znamená, že to, co vypadá jako jedna forma specialis, ve skutečnosti vzniklo vícekrát nezávisle na sobě a kmeny řazené do tohoto taxonu si nejsou tak příbuzné, jak by se mohlo zdát na první pohled. Větší rozdíly než ve vztahu k hostitelské rostlině a morfologii mohou být v jiných vlastnostech (Fourier et al. 2011, Kirk et al. 2008, Aoki et al. 2014).

V rámci rodu *Fusarium* způsobuje poškození brukvovitých rostlin taxon *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* (Wollenw.) W.C. Snyder & H.N. Hansen, který je dnes dále členěn do 4 – 5 ras, které se vzájemně liší schopností napadat různé druhy hostitelských rostlin. Rasa 1 napadá různé druhy brukvovitých včetně ředkvičky. Rasa 2 je schopná napadnout ředkvičku a některé jiné brukvovité, ale není schopna způsobit onemocnění plodin druhu *Brassica oleracea* a někdy se tato rasa povyšuje na úroveň samostatné formy specialis, a to *F. o. f. sp. raphani* J.B. Kendr. & W.C. Snyder. Rasy 3 a 4 napadají rostliny z rodu *Matthiola*. Rasa 5 byla popsána v osmdesátých letech v USA jako nový patotyp *F. o. f. sp. conglutinans* schopný napadat zelí. *F. o. f. sp. conglutinans* způsobuje fusariové vadnutí a žloutnutí rostlin (angl. Fusarium wilt, Fusarium yellows). Napadení se projevuje žloutnutím, později zhnědnutím a opadem listů, a tmavým až hnědým zbarvením xylému ve stonku rostlin. Postupně dochází k celkovému zežloutnutí, uschnutí a odumírání celé rostliny. Do rostlin vstupuje přes poranění kořenů a v průběhu růstu nepříznivě ovlivňuje cévní systém snížením průtoku živin a vody. První příznaky jsou spojeny se žloutnutím spodních listů následované nepravidelnou, hnědou nektrózou okrajů listů. Léze se zvětšují, až tvoří velké nekrotické oblasti, které vedou k opadu listů. Xylém je zbarven do různých odstínů hnědé. Napadené rostliny žloutnou, sesychají a časem umírají. K rozvoji této choroby dochází častěji a rychleji v teplejších podmínkách (24 – 29 °C) než při nižší teplotě (zejména pod 16 °C) (Koike et al. 2007).

Kolonie na bramborovo – dextrózovém agaru (PDA) při teplotě 25 °C řídké až plstnaté, 30 - 56 mm velké (po 4 dnech), bílé, někdy s nádechem barvy broskve. Revers žlutavý nebo načervenalý. Konidiofory nevětvené nebo větvené, konidiogenní buňky monofialidické, hyalinní, cylindrické, na konidioforech. Makrokonidie řídce u některých kmenů, 3 - 5-buněčné, hyalinní, vřetenovité nebo slabě zakřivené, 26 – 53 μm \times 3,0 – 4,5 μm velké vznikající na vzdušném myceliu. Mikrokonidie hyalinní, jednobuněčné (vzácně dvoubuněčné), elipsoidní až cylindrické, 5 – 12 μm \times 2,5 – 3,5 μm velké. Chlamydospory na hyfách nebo konidiích hyalinní, hladké nebo drsné, soliterní nebo v řetízku po dvou nebo třech, kulovité nebo skorokulovité, 4,5 – 15 μm velké (Leslie et Summerell 2006, Domsch et al. 2007, Samson et al. 2004).

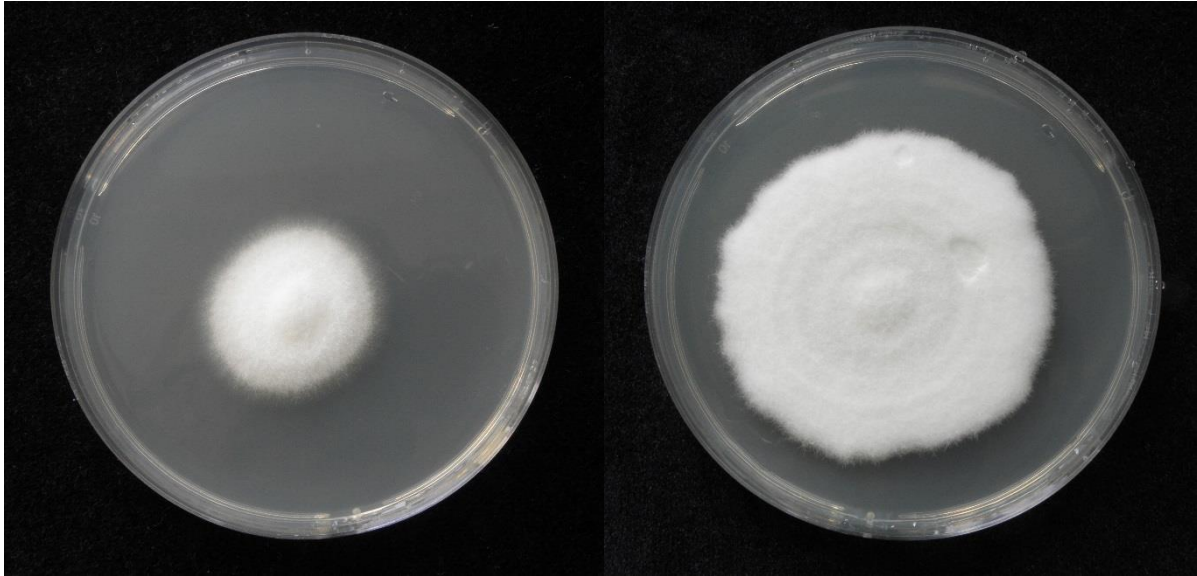


Obrázek č. 3: *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* - makrokonidie



Obrázek č. 4: *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* - mikrokonidie

Obrázek č. 5: *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* - chlamydospora



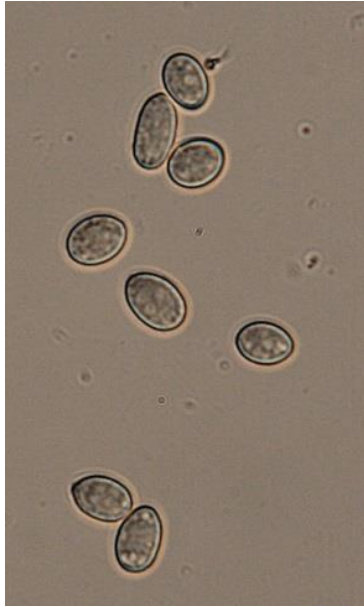
Obrázek č. 6: *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* – kolonie na bramborovo – dextrozovém agaru po 4 dnech

Obrázek č. 7: *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* – kolonie na bramborovo – dextrozovém agaru po 10 dnech

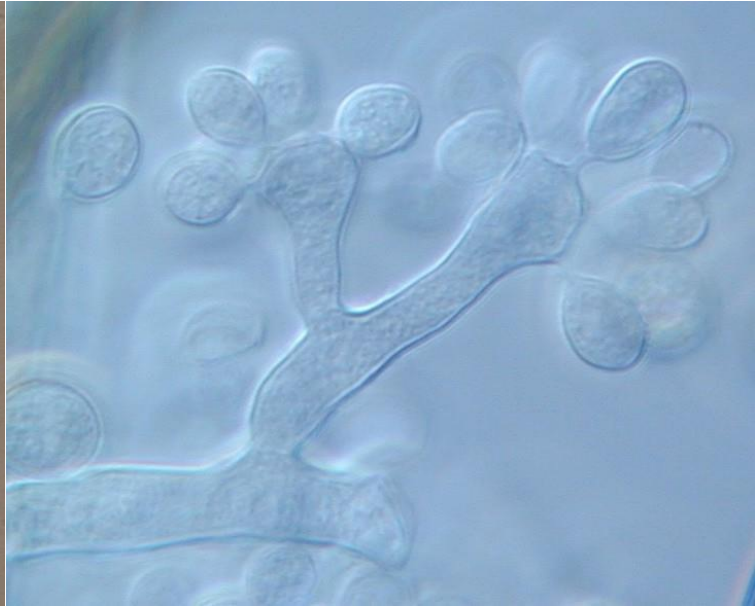
2.3.3. Charakteristika druhu *Botrytis cinerea*

Houby rodu *Botrytis* (dříve také známé pod rodovým jménem *Botryotinia*, čeleď Sclerotiniaceae, řád Helotiales, třída, Leotiomyces, podkmen Pezizomycotina, kmen Ascomycota) patří k taxonům významně poškozujícím hospodářsky důležité rostliny, a to především ty, které vytvářejí plody s vyšším obsahem vody nebo mají dužnaté listy. Houby tohoto rodu jsou známy a zaznamenávány v nepohlavní formě, která se vyznačuje hnědým vzpřímeným mononematosním větveným konidioforem, který na konci vytváří naduřelé konidiogenní buňky, z nichž se tvoří hnědé jednobuněčné konidie. Plodnice jsou typu apothecium se stopkou, v nichž se vytvářejí osmisporová válcovitá vřečka. V současné době je popsáno v rámci tohoto rodu okolo 30 druhů, z nichž se většina vyskytuje na úzkém druhovém spektru hostitelských rostlin. Všeobecně jsou tyto druhy patogeny nebo endofyty rostlin nebo se vyskytují jako saprotrofové na rostlinných zbytcích nebo případně v půdě (Domsch et al. 2007).

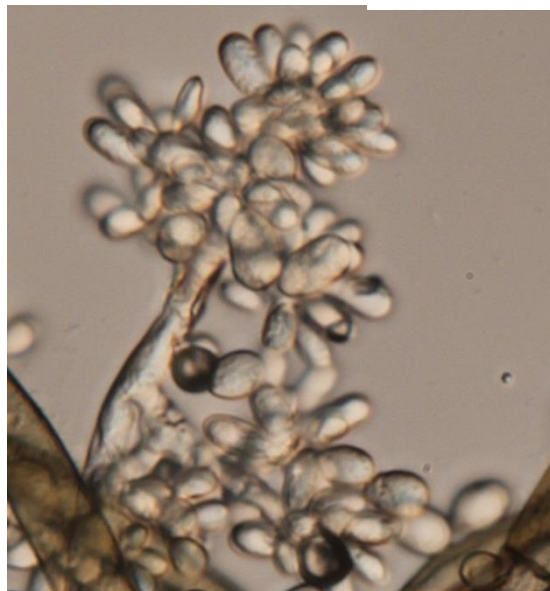
Druh *Botrytis cinerea* Pers. je nejznámějším z tohoto rodu a podle současných poznatků se jedná o komplex druhů, vyskytující se na širokém spektru hostitelských rostlin. Kolonie na ovesném agaru (OA) při teplotě 20 °C jsou 50 – 60 mm velké (po 10 dnech), vysoké, tvořené zpočátku hyalinním, později hnědým myceliem, z něhož se vytváří hnědé konidiofory, které jsou až 2 mm vysoké a 15 – 30 µm široké. Na konci konidioforů vznikají naduřelé konidiogenní buňky, z nichž se na krátkých zubech tvoří hnědé jednobuněčné konidie. Konidie obvejčité, světle hnědé, hladkostěnné, 8,0 – 14 × 6,0 – 9,0 µm velké. V kultuře se někdy vytváří stadium typu *Myrioconium*, které se vyznačuje kulovitými hyalinními mikrokonidiemi, velkými 2,5 – 3 µm. Někdy se v kulturách vytváří černá tvrdá sklerocia o velikosti do 12 mm (Domsch et al. 2007, Samson et al. 2004).



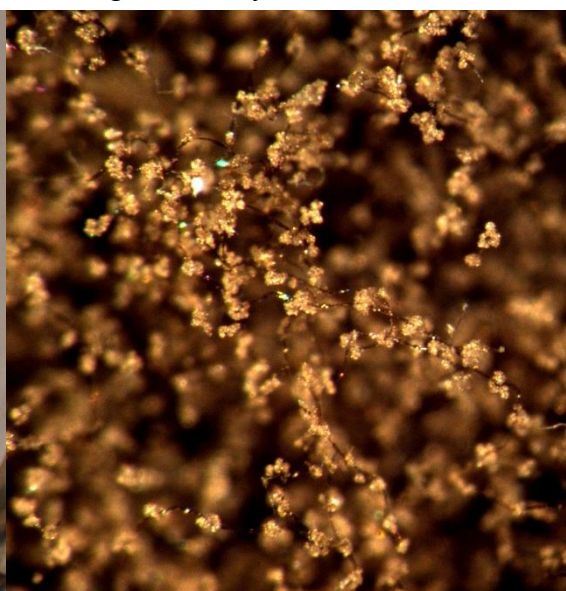
Obrázek č. 8: *Botrytis cinerea* – konidie



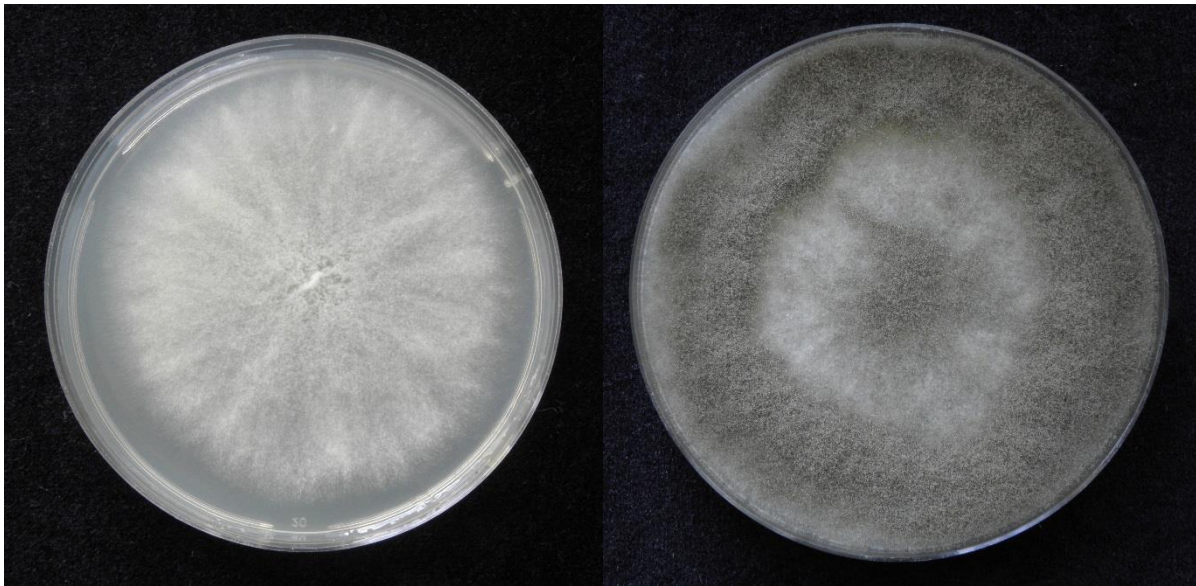
Obrázek č. 9: *Botrytis cinerea* – konidie vznikající z konidiogenní buňky



Obrázek č. 10: *Botrytis cinerea* – konidiofor s konidii



Obrázek č. 11: *Botrytis cinerea* – konidiofor s konidiogenními hlavicemi a skupinou konidií



Obrázek č. 12: *Botrytis cinerea* – kolonie na ovesném agaru po 10 dnech

Obrázek č. 13: *Botrytis cinerea* – kolonie na ovesném agaru po 14 dnech s vyvinutými konidioforami

2.4. Identifikace a detekce zájmových škodlivých mikroorganismů

2.4.1 Identifikace a detekce *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Pro správnou identifikaci a detekci bakterie *Xanthomonas c. pv. campestris* je nutné disponovat rutinní diagnostickou a kvantifikační metodou. Pro splnění těchto cílů představuje metoda Real Time PCR velmi dobře využitelný nástroj. Významnou výhodou je možnost kvantifikace DNA, která v rámci PCR funguje jako cílový templát. Využívá se přitom faktu, že nárůst množství amplifikované DNA v reakční směsi na jistou mez je přímo úměrný vstupnímu množství templátové DNA.

Jako nejvhodnější je detekovat gen *Zur* (Zinc uptake regulator), protože *Zur* je značně konzervativním genem pro *X. c. pv. campestris* a protože produkt genu *Zur* je pravděpodobně nezbytný v metabolických drahách této bakterie. Detailně popsáno v metodice Eichmeier et al. (2017). Pro ověření detekce je vhodné použít také primerový pár DLH120/DLH125 pro amplifikaci genu *hrpF* (Berg et al., 2005) při amplifikaci klasickou PCR za využití separace a vizualizace produktu na agarózovém gelu (Eichmeier et al., 2017).

Postup izolace *X. campestris* pv. *campestris* z hlávek zelí do čisté kultury:

Vzhledem k různým možným scénářům pro začátek infekce a šíření *X. c. pv. campestris* v rostlinách zelí (z pole, osiva, kapkami deště či závlahy, přenos hmyzem aj.) je pro získání komplexního obrazu o výskytu tohoto taxonu bakterie v testované rostlině vhodné odebírat vzorky z různých částí rostliny. U plně vyvinutých hlávek je to např. odběr ze tří částí, a to z košťálu, vnitřních listů a vnějších listů. Při odběru jsou z jednotlivých částí vyřezány čtvercové výseky, optimálně z přechodu zdravého a nekrotického, pletiva o rozměrech 4 × 4 mm (6 výseků z každé části rostliny), které jsou následně dezinfikovány v 2% roztoku chlornanu sodného a promyty dvakrát ve sterilní destilované vodě. Takto ošetřené výseky pletiv jsou umístěny na Petriho misky s Nutrient agar No. 2 nebo Mueller-Hinton agar (Sigma-

Aldrich, St. Louis, USA). Následně probíhá kultivace na Petriho miskách při 25 °C ve tmě. V případě přítomnosti *X. c. pv. campestris* lze očekávat za 3 – 5 dní nárůst typických nažloutlých kultur této bakterie. Optimální je zároveň nakultivovat si tuto bakterii na stejném agarovém živném mediu za stejných kultivačních podmínek jako pozitivní kontrolu nebo mít dobrou obrazovou dokumentaci o vzhledu kolonií vyrostlé za stejných podmínek. V případě pochyb o taxonomickém zařazení daného izolátu je možné provést jeho identifikaci prostřednictvím specifické PCR anebo sekvenace vybraného úseku genomu (16S rDNA, ITS) a porovnání získané sekvence se standardem pro *X. c. pv. campestris* (přehled uveden v publikaci Vicente et Holub, 2013).



Obrázek č. 14: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* – kolonie na Mueller-Hinton agar po 48 hodinách

Odběr vzorků a izolace DNA

V případě detekce *X. c. pv. campestris* pomocí molekulárně – genetických metod není termín odběru limitujícím faktorem, pokud je patogen v pletivech přítomen, popisované postupy jsou schopny jej detekovat. Ve vegetačním období je vhodné odebírat listy se symptomy, jako jsou černé nekrózy (často ve tvaru V). K homogenizaci je vhodné použít 0,05 g vzorku (listu), u osiva je lepší použít 0,025 g kvůli obsahu inhibičních látek. Optimální je rostlinný materiál co nejrychleji dopravit do laboratoře, tak aby byl co nejčerstvější a byl by v dobrém stavu, kde je z něj ihned izolována DNA. Případně je možné materiál před izolací DNA krátkodobě uchovávat (6 – 8 dní) při teplotě 3 – 5 °C, po delší dobu je vhodnější skladovat při teplotě -80 °C. Pro získání DNA v dostatečné kvalitě a kvantitě se doporučuje využít komerčně dostupný kit, např. kit NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel, Düren, Německo). Množství získané DNA se při izolacích z listů brukvovitých pohybuje v rozmezí 500 – 1000 ng/ml. Pro další postup je vhodné, aby se v případě vyšších koncentrací izolovaná DNA z jednotlivých vzorků naředila na pracovní koncentraci 500 ng/ml. Takto připravená DNA je

připravena k okamžitému použití. Krátkodobě je možno skladovat izolovanou DNA při teplotě -20 °C a dlouhodobě při teplotě -80 °C.

PCR detekce genu hrpF a Real Time PCR detekce genu Zur

Reakční mix pro PCR o celkovém objemu 20 µl (včetně DNA) připravitz 11,85 µl vody (čistota HPLC); 4 µl 5× GoTaq Flexi Buffer pro polymerázu (Promega, Madison, USA); 1,2 µl 25mM MgCl₂ (Promega, Madison, USA); 0,5 µl 10mM směsí dNTPs (MClab, San Francisco, USA); 1,25 U GoTaq G2 Flexi DNA polymerázy (5 U/µl) (Promega, Madison, USA); 1 µl 10µM kombinace primerů DLH120/DLH125 (sekvence a další informace viz Tab. č. 2) a nakonec přidat 2 µl zkoumané DNA. Pro amplifikaci se používají teploty 94 °C / 5 minut, 40 cyklů: 95 °C / 40s, 63 °C / 40 s, 72 °C / 40 s a finální krok 72 °C po dobu 7 minut pro primery skupiny DLH.

Tab. č. 2: Složení reakční směsi pro kvantifikaci detekce *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pomocí Real Time PCR založené na na genu *Zur*

Reagencie	Objem	Konečná koncentrace
kit 2× HoTaq Real-Time PCR kit (MClab, San Francisco, USA)	10,00 µl	1 x
H ₂ O (HPLC čistota)	6,00 µl	
primer Zur1-CAE-rev 10 µM	0,8 µl	0,4 µM
primer Zur2-EAC-fwd 10 µM	0,8 µl	0,4 µM
TaqMan sondy Zur1-TP 10 µM	0,4 µl	0,2 µM
Templátová DNA 10 ng / µl	2 µl	20 ng
Celkový objem (včetně DNA templátu)	20 µl	

Pro amplifikaci v přístroji pro Real Time PCR použít teploty 94 °C / 5 minut, 35 cyklů: 95 °C / 40s, 54 °C / 40s, 72 °C / 40s a finální teplota 72 °C po dobu 7 minut. Při vyvíjení postupu byl použitým přístrojem Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake, Australia).

Tab. č. 3: Sekvence oligonukleotidů a velikosti finálních PCR produktů

Primer nebo sonda	Sekvence ve směru 5-3	Cílený gen	Velikost produktu (pb)
DLH120 (Berg et al., 2005)	CCGTAGCACTTAGTGCAATG	Hypersensitive reaction and pathogenicity gene cluster	619
DLH125 (Berg et al., 2005)	GCATTTCCATCGGTCACGATTG	Hypersensitive reaction and pathogenicity gene cluster	619
Zur1-CAE-rev	AGGCGACGAAGGCATTGA	Zinc uptake regulator	142
Zur2-EAC-fwd	CAAACCGGTCAAGGCCTA	Zinc uptake regulator	142
Zur1-TP	FAM-CGCTGGATTTTTTGATTGG-BHQ	Zinc uptake regulator	

2.4.2. Identifikace a detekce *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*

Pro zjištění výskytu *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* je možné provést detekci přímo pomocí specifických primerů (viz níže) v substrátu anebo, pokud je potřeba získat kmen tohoto taxonu, je třeba kmen vyizolovat ze substrátu.

Pro rychlou a spolehlivou identifikaci a detekci formae speciales druhu *Fusarium oxysporum* je možné použít pouze molekulární metody. Alternativou je inokulace spektra potenciálních hostitelských rostlin a následné zjištění, zda se objevují charakterické symptomy, ale je to způsob pomalý a ne zcela spolehlivý. Identifikace formae speciales pomocí morfologických a fyziologických znaků není možná.

Při izolaci hub z rodu *Fusarium*, vč. *F. o.* f. sp. *conglutinans*, z rostlinného materiálu je nejprve vzorek očištěn pod tekoucí vodou, odebrán kus listu, stonku nebo kořene o délce 3 – 5 cm. Odebraný vzorek je povrchově sterilizován (70% etanol – 1 min, 10% NaClO – 3 min., 70% etanol – 30 s, sterilní voda – 15 s) a poté jsou sterilně rozřezány skalpelem na segmenty o velikosti 3 – 5 x 3 – 5 x 1 – 2 mm. Segmenty jsou po pěti rozmístěny na PCNB agaru v 90 mm Petriho miskách a inkubovány při teplotě 22 °C. Po 2 – 3 týdnech jsou vyrostlé kolonie prohlíženy a podezřelé kmeny *Fusarium* jsou odizolovávány do čistých kultur. Získané čisté kultury jsou identifikovány dle níže uvedeného PCR testu.

Detekce *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* pomocí PCR testu

Tento protokol byl vyvinut pro detekci *F. o.* f. sp. *conglutinans* v rostlinných pletivech a půdě. PCR je prováděna s oligonukleotidovými primery pgn1F a pgn1R specifickými pro uvedený taxon (Salava 2017). PCR test je zacílen na gen pro endopolygalakturonázu (*pgI*).

Přímý (pgn1F) a reverzní (pgn1R) oligonukleotidový primer jsou odvozeny ze sekvencí *pgl F. o. f. sp. conglutinans* získaných z GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>),
 pgn1F 5'- GACGAGTAGCTTGAAGGAGGGAG - 3'
 pgn1R 5'- GAGCACGCGACATATCAACCT - 3'
 Délka ampliconu (včetně sekvencí primerů) je 263 bp.

Extrakce DNA

DNA z rostlinných pletiv a z mycelia hub (kontroly extrakce) se izoluje pomocí DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) podle doporučení výrobce. Celková půdní genomová DNA se izoluje s použitím PowerSoil DNA Isolation Kit od firmy MO BIO Laboratories, Inc. (Carlsbad, USA) podle protokolu dodávaného výrobcem bez jakékoliv modifikace.

Polymerázová řetězová reakce

Tab. č. 4: Složení reakční směsi pro detekci *Fusarium oxysporum f. sp. conglutinans*

Reagencie	Objem	Konečná koncentrace
H ₂ O pro PCR	20,05 µl	
PCR pufr s MgCl ₂ * 10 x, 20 mM MgCl ₂	2,5 µl	2 mM MgCl ₂
Směs nukleotidů 20 mM	0,25 µl	0.2 mM každý nukleotid
Primer pgn1F 10 µM	0,4 µl	0,16 µM
Primer pgn1R 10 µM	0,4 µl	0,16 µM
<i>Taq</i> DNA polymeráza 2,5 U / µl	0,4 µl	1 U
Templátová DNA 40 ng	1 µl	
Celkový objem (včetně DNA templátu)	25 µl	

Vysvětlivky: *Pufr: Tris-HCl (pH 9.0) 750 mM, (NH₄)₂SO₄ 200 mM, Tween 20 0.1% (v/v)

Podmínky PCR: Po počáteční inkubaci 5 minut při 94 °C následuje 30 cyklů 30 sekund 95 °C, 20 sekund 62 °C a 45 sekund 72 °C a závěrečné prodlužování primerů 5 minut 72 °C.

PCR test byl optimalizován pro AmpONE™ *Taq* DNA polymerase (Geneall Biotechnology Co., Ltd., Seoul, Korea).

PCR amplicon je detekován po agarózové elektroforéze s vhodným markerem molekulové hmotnosti pomocí fluorescenčních barviv pro vizualizaci DNA, např. ethidium bromid a UV transiluminátoru.

Důležité informace o testu

Kontroly

Pro získání spolehlivých výsledků testu by každá amplifikace cílové DNA měla zahrnovat následující vnější kontroly:

- Negativní kontrolu amplifikace (NKA) pro vyloučení falešně pozitivních výsledků v důsledku kontaminace během přípravy reakční směsi: sterilní destilovaná voda použitá při přípravě reakční směsi.
- Pozitivní kontrolu amplifikace (PKA) pro kontrolu účinnosti amplifikace: DNA referenčního kmenu *F. o. f. sp. conglutinans* ze spolehlivého zdroje (např. Naktuinbouw R&D) ve sterilní destilované vodě nebo pufru pro uchování DNA.

Interpretace výsledků PCR:

Prověření kontrol:

- NKA by neměla produkovat žádné amplikony.
- PKA by měla produkovat amplikony dlouhé 263 bp.

Když jsou tyto podmínky splněny:

- Test je považován za pozitivní, když jsou produkovány amplikony dlouhé 263 bp.
- Test je považován za negativní, když nejsou produkovány žádné amplikony, nebo jsou-li produkovány amplikony odlišných délek.
- Testy by měly být opakovány v případě, že jsou získány jakékoliv rozporuplné nebo nejasné výsledky.

2.4.3 Identifikace a detekce *Botrytis cinerea*

Zjistit výskyt druhu *Botrytis cinerea* v substrátu je možné detekcí přímo pomocí specifických PCR primerů (Rigotti et al. 2002): nebo Real Time PCR (Anonymus 2016, Anonymus 2018) anebo pokud je potřeba získat živý kmen tohoto druhu, provede se izolace ze substrátu v *in vitro* podmínkách.

Při izolaci druhu *B. cinerea* z rostlinného materiálu (vč. rostlinných zbytků) je nejprve vzorek očištěn pod tekoucí vodou, odebrán kus listu, stonku nebo kořene o délce 3-5 cm. Odebraný vzorek je povrchově sterilizován (70 % etanol – 1 min, 10% NaClO – 3 min., 70% etanol – 30 s, sterilní voda – 15 s) a poté jsou sterilně rozřezány skalpelem na segmenty o velikosti 3 – 5 × 3 – 5 × 1 – 2 mm. Segmenty jsou po pěti rozmístěny na 2% sladinovém agaru a inkubovány při teplotě 20 °C. Po 2 – 3 týdnech jsou vyrostlé kolonie prohlíženy a zaznamenané kmeny *B. cinerea* jsou odizolovávány do čistých kultur. Jiný druh než *B. cinerea* z rodu *Botrytis* není ze zelí znám, takže identifikace není problematická.

2.5. Ochrana zelí před škodlivými mikroorganismy

Proti onemocněním lze bojovat různými opatřeními, a to jednak pěstováním rezistentních odrůd, vhodnou agrotechnikou při pěstování a sklizni, použitím chemických nebo bioracionálních pesticidů a biologickou ochranou.

2.5.1. Využití nanočástic stříbra k eliminaci bakterie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* v osivu rostlin z čeledi brukvovitých

Jednou z potenciálních možností ochrany osiva zelí před *X. c. pv. campestris* je využití nanočástic. Za nanočástice považuje Borm et al. (2006) částice s rozměry od 1 do 100 nm, přičemž jejich vlastnosti se liší v závislosti na materiálu, ze kterého jsou vytvořeny, na velikosti, tvaru a na vlastnostech povrchu. Využití nanočástic v průmyslu a při výrobě komerčních produktů zaznamenává v posledních letech velký nárůst. Porozumění interakčním mechanismům na molekulární úrovni mezi nanočásticemi a biologickými systémy je však stále nedostatečné (Barrena et al. 2009). Současně s tímto trendem jsou nalézány nové cesty využití nanočástic, nicméně mnohé z nich jsou stále ve fázi testování (Ngomsik et al. 2005, Uheida et al. 2006).

Jednou z využitelných vlastností některých kovových nanočástic v ochraně rostlin je jejich antibakteriální aktivita. Předpokládá se, že účinnost nanočástic proti bakteriím je založena na narušení funkce buněčné stěny (Ahmed et al. 2016). Antibakteriální vlastnosti stříbrných nanočástic jsou hojně využívány například při výrobě obvazových materiálů, cévních náhrad, protéz apod. Podobné účinky mají také nanočástice na bázi mědi (Giannousi et al. 2013) nebo nanočástice založené na oxidu titaničitým (Paret et al. 2013). Naproti tomu je třeba brát v potaz, že např. kovové nanočástice oxidů zinku se při jistých koncentracích ukázaly jako inhibiční v různých vývojových stádiích rostlin, jako je klíčení semen a prodlužování kořene (Hrdinová 2011). Dále je nutné brát v úvahu, že antibakteriální účinek jednotlivých nanočástic není univerzální a z hlediska účinnosti zde existuje pro daný druh patogenu významná specifická daná konkrétním typem nanočástic, jejich velikostí a koncentrací. Výhodou použití nanočástic stříbra v roztoku rozpouštědla je relativně nízká cena, jednoduchost přípravy a také jednoduchá aplikace.

Semena jsou umístěna do disperze nanočásticemi stříbra (colodial solution AgNPs 9 nm, NPIN Celichovski/Grobelny, Lodz University) v příslušném rozpouštědle (reference solution dor NPIN 8bd colloidal solution of AgNp size 9 nm, NPIN Celichovski/Grobelny, Lodz University) v množství 1 g semen na 100 ml přípravku a výsledná suspenze je dále umístěna na třepačku a při otáčkách do 350 ot.min⁻¹ po dobu alespoň jedné hodiny. Poté jsou semena osušena v tenké vrstvě, například za použití filtračního papíru. Koncentrace stříbrných nanočástic o rozměrech 9 nm v přípravku je 100 ppm, při níž jsou zajištěny dostatečné antibakteriální účinky přípravku při splnění podmínky aplikace přípravku na semena na třepačce po dobu alespoň jedné hodiny.

Vysoké koncentrace nanočástic nad 1000 ppm nejsou vhodné z důvodu možné fytotoxicity při vyšší koncentraci stříbra, nízké koncentrace pod 75 ppm naopak nezajišťovaly dostatečnou účinnost přípravku proti bakterii *Xanthomonas c. pv. campestris*. Důležitý je také rozměr nanočástic, při testování větších nanočástic (19, 35 a 61 nm) není eliminační účinek vůči *X. c. pv. campestris* výrazný nebo žádný. Naopak při velikostech nanočástic menších než 9 nm může být vysoký inhibiční účinek vůči *X. c. pv. campestris* doprovázen nežádoucími fytotoxickými účinky na ošetřená semena.

Účinnost nanočástic je hodnocena na základě kvantifikace množství DNA *X. c. pv. campestris* v klíčících rostlinách vzešlých z uměle infikovaných semen po jejich ošetření různými variantami nanočástic. Pro zjišťování přítomnosti *X. c. pv. campestris* v klíčících rostlinách je použita metoda fungující na bázi detekce vybraného úseku DNA typického pro

tento druh bakterie po jeho předchozím namnožení v rámci PCR (postup popsáný v kapitole 2.4.1). Na základě doby nástupu detekčního signálu od začátku analýzy, tzv. Ct hodnoty, která v nepřímé úměře odpovídá množství detekovaných úseků DNA ve vzorku, jsou jednotlivé varianty hodnoceny z hlediska obsahu *X. c. pv. campestris* a u ošetřených variant také z hlediska míry účinnosti nanočástic stříbra o velikosti 9 nm v závislosti na době působení a koncentraci v aplikovaném roztoku.

Z výsledků uvedených v tabulce č. 5 je vidět, že nejúčinnější pro eliminaci *X. c. pv. campestris* jsou právě varianty rostlin vzešlé z osiva ošetřeného nanočásticemi o koncentraci 100 ppm, přičemž po inkubaci po dobu jedné či dvou hodin s touto koncentrací není tento druh bakterie vůbec detekován. Klíčící rostliny nevykazovaly průkazné poškození fyto toxickým působením nanočástic.

Tabulka č. 5: Vliv koncentrace a délky ošetření nanočásticemi stříbra na pořadí cyklu v přístroji pro Real Time PCR (RT), v němž je zjištěna přítomnost DNA *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* v rostlinách zelí vyrostlých z osiva ošetřeného nanočásticemi

Doba inkubace	Koncentrace NPs (ppm)	Ct (průměrné pořadí cyklů)
1 hodina	100	∞
	20	19,56
	2	21,74
	0	21,32
2 hodiny	100	∞
	20	22,17
	2	21,17
	0	21,06
Pozitivní kontrola – semena neošetřená nanočásticemi	0	7,15

Vysvětlivky: NPs – nanočástice stříbra;

Pozn.: Při vyšší koncentraci DNA *X. c. pv. campestris* dojde k zjištění této DNA při cyklu s nižším pořadovým číslem a opačně.

Postup je tedy možné doporučit pro rutinní předseťovou úpravu osiva u velkoproducentů brukvovitých zelenin a také jako preventivní i kurativní nástroj pro eliminaci patogenu *X. c. pv. campestris* v osivu, popřípadě snížení jeho výskytu u šlechtitelských firem, které osivo zelí hlávkového produkují a obchodují s ním. Tím je možné hned před distribucí do prodeje zaručit kvalitu osiva. Navržený postup je navíc možno využít uvnitř šlechtitelských firem v rámci procesu odstraňování *X. c. pv. campestris* z osiva šlechtitelsky významných linií.

2.5.2. Využití esenciálních olejů při ochraně zelí před *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* a *Botrytis cinerea*.

Především v poslední době je při ochraně rostlin zvýšený zájem používat prostředky, které co nejméně poškozují životní prostředí. Mezi ně patří látky získané z rostlin, a to směsí nebo v čisté podobě (rostlinné oleje, esenciální oleje rostlinného původu).

V současné době je na trhu celá řada esenciálních olejů, ale pouze některé z nich omezují růst a vývoj hub. Mezi ty, u nichž je známo, že mají takovýto účinek, patří esenciálních oleje z rostlin *Litsea cubeba* (litsea oil), *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon oil), *Thymus vulgaris* (thyme oil), *Cymbopogon citratus* (lemongrass oil), *Thymus capitatus* (origanum oil) a *Eugenia* sp. (clove oil).

Hodnocení esenciálních olejů se provádí nejprve v testech na kulturách hub v *in vitro* podmínkách a teprve ty, které vykáží za takovýchto podmínek účinnost, jsou hodnoceny při aplikaci na rostliny.

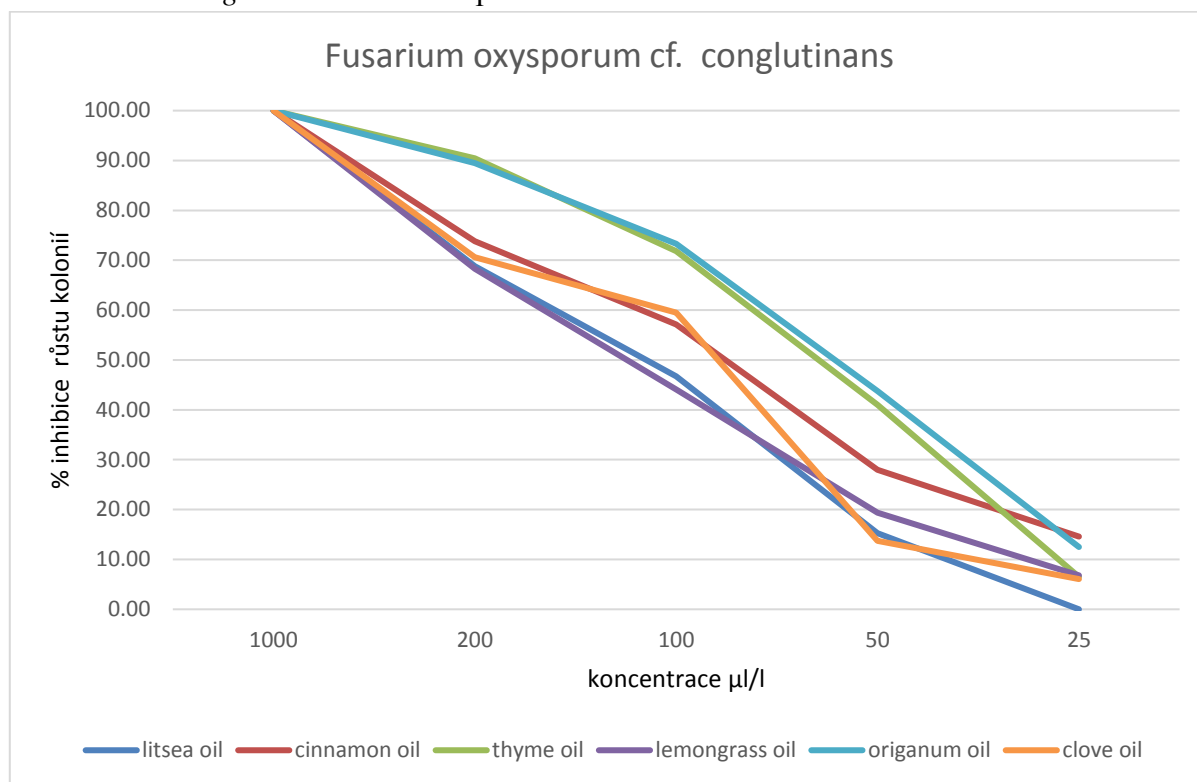
Příprava esenciálního oleje

Při přípravě roztoků v miskových testech se postupuje jinak než při aplikaci na rostliny.

V případě hodnocení v *in vitro* podmínkách je esenciální olej smíchán s dimethylsulfoxidem (DMSO) v poměru 1:1 a vzniklý roztok je následně ředěn v destilované vodě až na požadované koncentrace a přidán do chladnouceho agaru (optimálně s teplotou do 3-7°C nad bodem tuhnutí agaru). Hodnocení se v případě *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* i *Botrytis cinerea* provádí na sladidlovém agaru při teplotě 25 °C, kdy se po 7 dnech hodnotí velikost kolonií v porovnání s kontrolou.

V případě *F. o. f. sp. conglutinans* všechny hodnocené rostlinné esence jsou schopny omezovat růst testovaných kmenů této houby. Nejvyšší průměrný inhibiční účinek je u olejů z *Thymus vulgaris* (thyme oil) a *Thymus capitatus* (origanum oil) (okolo 72 a 73% inhibice růstu při koncentraci 100 µl/l), kdy i při nízké koncentraci (50 µl/l) tyto oleje omezují růst téměř o 50 %. Stoprocentní účinnost všech testovaných esencí je při koncentraci 1000 µl/l a vyšší. (graf č. 1)

Graf č. 1: Vliv jednotlivých esenciálních olejů na růst kolonií *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* v *in vitro* podmínkách



V případě *B. cinerea* všechny hodnocené rostlinné esence jsou schopny omezovat růst testovaných kmenů této houby. Inhibiční účinek v rozmezí 90 – 100 % všech hodnocených olejů je u většiny kmenů při koncentracích nad 200 µl/l. Jako nejúčinnější jsou esenciální oleje z *Thymus vulgaris* (thyme oil) a *Thymus capitatus* (organum oil), kdy i při nízké koncentraci (25 µl/l) tyto oleje omezují růst o 40 – 50 %.

Při ošetření hlávek zelí je nejprve připraven 40% roztok Tweenu 20 v destilované vodě a paralelně s tím je připraven 50% roztok esenciálního oleje v řepkovém oleji. Tyto dva roztoky jsou smíchány v poměru 1,5:1 za velmi intenzivního míchání na třepačce typu vortexu při 2500 rpm po dobu 15 minut. Vzniklý roztok je zásobním roztokem pro další použití a může být skladován po dobu několika týdnů v chladničce při teplotě 4 °C. Esence je pak dále naředěna na koncentraci 1000 µl/l a jsou nanášeny ve formě postřiku na hlávky.

Na základě dat získaných při miskových testech byly vybrány tři silice (clove oil, thyme oil, organum oil), které vykazovaly nejvyšší míru inhibice růstu *B. cinerea* v *in vitro* podmínkách. Bylo provedeno zjištění efektivity těchto silic v různých variantách, při kterých může docházet k infekci hlávek zelí ve skladu. K rozvoji infekce může dojít dotykem s rozvíjející se nebo rozrostlou kulturou *B. cinerea* (jiná infikovaná hlávka) nebo vyklíčením ze spory. Byla hodnocena velikost lézí vytvořených *B. cinerea* na hlávce zelí.

Varianty

- V1) nedotýkající se hlávky – aplikace silic, poranění hlávky, inokulace kulturou *B. cinerea* – situace kdy jsou preventivně ošetřeny hlávky a k poranění hlávky dojde po tomto ošetření
- V2) nedotýkající se hlávky – poranění hlávky, aplikace silic, inokulace kulturou *B. cinerea* – hlávky jsou následkem manipulace při sklizni poškozeny a došlo k narušení pletiv a tedy ke vzniku míst, kde může začít infekce *B. cinerea*
- V3) dotýkající se hlávky – poranění hlávky, aplikace silic, inokulace kulturou *B. cinerea* – v základu situace, ke které dochází při skladování hlávek v bednách, kde jsou hlávky zelí vedle sebe a nad sebou ve vrstvách

Tabulka č. 6: Vliv esenciálních olejů a způsobu inokulace na velikost lézí vytvořených *Botrytis cinerea* na hlávkách zelí po 1 měsíci od inokulace při teplotě 4 °C

Varianty	Rostlinná silice	Způsob inokulace	
		Kontakt s aktivní kulturou (mm)	Spory (mm)
V1	O	10.00	2.11
	T	6.67	0.57
	H	6.36	4.00
V2	O	10.00	0.75
	T	10.00	0.17
	H	10.00	10.00
V3	O	8.13	9.25
	T	6.13	4.06
	H	4.81	6.50
Kontrola s inokulací <i>Botrytis cinerea</i>		9,06	10.00
Kontrola bez inokulace		0.00	0.00

Vysvětlivky: O - origanum oil, T – thyme oil, H - clove oil

Výsledky ukázaly, že origanum oil a thyme oil výrazně omezují rozvoj *B. cinerea*, pokud dojde k infekci sporami a místa vzniku infekce nejsou v bodech, kde se hlávky vzájemně dotýkají. Při kontaktu hlávek s aktivní kulturou rostoucí na nebo v nějakém živném médiu je rozvoj *B. cinerea* velmi málo až nulově omezen (Tab. č. 6).

Ošetření origanum oil a thyme oil je možné doporučit jako pomocný prostředek na snížení míry rizika poškození hlávek zelí *B. cinerea* při infekci zelí sporami. V uvedené podobě a způsobu aplikace nemůže ochránit skladované zelí před poškozením způsobeným *B. cinerea* při prorůstání mycelia z hlávky do hlávky, kdy jsou skladované hlávky těsně vedle sebe. Vzhledem k tomu, že *B. cinerea* v hojné míře vytváří na napadených hlávkách zelí konidiofory s konidii, které se mohou šířit v rámci skladu, má toto ošetření smysl. V případě obou rostlinných silic (origanum oil a thyme oil) se jedná o látky, které jsou přírodního původu, a dochází časem k jejich degradaci. To sice znamená, že při dlouhodobějším skladování je nutné tyto silice aplikovat opakovaně, nejméně dvakrát, ale nepředstavují zdravotní riziko pro člověka, který s nimi přijde do kontaktu buď jako operátor nebo konzument.

2.5.3. Odolnost odrůd zelí vůči *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Efektivní ochrana proti výskytu a šíření bakterie *X. c. pv. campestris* je nyní založena především na znalosti rasové struktury *X. c. pv. campestris* v dané oblasti a šlechtění odrůd odolných či přímo rezistentních vůči dané rase (rasám). V současné době je známo 27 rasově specifických rezistentních odrůd rodu *Brassica* vyšlechtěných v USA, Rusku, Velké Británii a Portugalsku (Rubel et al., 2017).

Testování odolnosti vůči patogenu *X. c. pv. campestris* by mělo zahrnovat reakce na všechny doposud známé rasy nebo přinejmenším na nejrozšířenější rasy 1 a 4 a rasy, které se vyskytují v oblastech, v nichž se bude daná odrůda zelí pěstovat. Izoláty rasy 6 mohou být základem doprovodného testování na případnou rasově nespecifickou rezistenci (Vicente et al., 2001). Jednotlivé pokusy a sledování reakce rostlin zelí na napadení by mělo probíhat v izolovaných podmínkách skleníku či venkovních podmínkách zajištěných proti šíření infekce škůdci a závlahou.

Pro testování reakce rostlin na napadení *X. c. pv. campestris* lze doporučit inokulaci listů rostlin propíchnutím párátky namočenými v bakteriální suspenzi dle metodiky ISTA (International Seed Testing Association, 2015) ve fázi měsíc staré sadby. Jako inokulační suspenzi je vhodné zvolit směs bakteriálních izolátů, která zahrnuje jak nejrozšířenější rasy 1 (kmen např. Horticulture research Warwick HRIW 3811) a 4 (kmen např. Horticulture research Warwick HRIW 1279A), případně pokud není k dispozici bližší určení rasové struktury v dané oblasti, tak kmen získaný z této oblasti. V případě exportu osiva do zahraničí je důležité zahrnout rasy cílové lokality. Pozorování odolnosti testovaných položek by mělo probíhat nejméně měsíc od inokulace, kdy je zaznamenána nejen reakce sadby na přímé napadení bakterií *X. c. pv. campestris*, ale i reakce starších rostlin. Výsledky dosavadních pokusů potvrdily u starších rostlin nízký výskyt symptomů i jejich absenci, přestože se ve stádiu sadby (14 dní po inokulaci) vyznačovaly vysokými stupni napadení. Předčasná eliminace těchto položek tedy může vést k vyřazení perspektivních genotypů.

K vizuálnímu hodnocení míry napadení jednotlivých rostlin lze použít pětibodovou stupnici napadení založenou na procentuálním výskytu symptomů černé bakteriální žilkovitosti na povrchu inokulovaných listů (Peňázová et al. 2018) (Tab. č. 7).

Tab. č. 7: Stupnice k hodnocení napadení rostlin bakterií *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Stupeň napadení	1	2	3	4	5
Zasažení povrchu	0 %	< 25 %	25-50 %	50-75 %	> 75 %

Vizuální pozorování symptomů by mělo být vždy potvrzeno metodami molekulární detekce, které dokážou odhalit přítomnost bakterie ve velmi nízkém množství i případnou latentní infekci.

Testování rostlin by mělo probíhat ve víceletém opakování, neboť je známá závislost rozvoje bakterie v pletivech rostlin na okolních podmínkách. Rozdílné období pěstování ve venkovních izolovaných podmínkách také vede k odlišné míře projevu symptomů. Odolnější

linie však vykazují stabilně nízkou míru infekce i její četnost. Perspektivní kultivary (genotypy) vykazující odolnost k infekci bakterií *X. c. pv. campestris* ve směsné suspenzi by měly být dále testovány prostřednictvím inokulací jednotlivými rasami z použité směsi pro zjištění reakce na konkrétní rasy.

2.5.4. Ochrana porostů a skladovaného zelí před poškození *Xanthomonas campestris pv. campestris*, *Fusarium oxysporum f. sp. conglutinans* a *Botrytis cinerea*

Při hledání účinné strategie ochrany porostů zelí hlávkového vůči negativním dopadům *X. c. pv. campestris* si je třeba uvědomit životní cyklus této bakterie v přírodě a možné zdroje jeho inokula. Jak již bylo uvedeno, buňky *X. c. pv. campestris* mohou přežít v půdě, v posklizňových zbytcích z infikovaných rostlin, v nekulturních hostitelských druzích (plevele) anebo také přímo v semenech zelí. Od toho se také odvíjí obvyklé scénáře šíření infekce a s tím související možná preventivní opatření, která mohou být významným předstupněm pro účinnou ochranu porostů. Jak uvádí Boost (2011) ve své práci, mezi základní preventivní opatření je používání zdravého a certifikovaného osiva a sazenic, použití alespoň tříletého osevního postupu, použití vždy nových nebo dezinfikovaných sadbovačů. Dále je zde doporučení nepoužívat na závlahu postřikovače, zamezit vzájemnému dotyku mokrých rostlin, udržovat čistotu mechanizace a nářadí, po sklizni rychle zaorat rostlinné zbytky pro jejich co nejrychlejší rozložení, použití chemického ošetření během vegetace a v neposlední řadě vybírat odolné odrůdy. V případě odrůd zelí hlávkového rezistentních vůči *X. c. pv. campestris* je však nabídka poměrně omezená. V oblasti preventivních opatření Kuchárek a Strandberg (2000) dále doporučují nevysévat zelí hlávkové blíže než cca půl kilometru od jiných plodin/zahrad s rostlinami ze stejné čeledi, odstraňovat plevele z okolí patřící do stejné čeledi, použít předseťové ošetření horkou vodou a kontrolovat porost každý den s případným okamžitým odstraněním napadené rostliny. Přihnojování dusíkem během vegetace může také zvýšit obranyschopnost rostliny a tím zpomalit nebo zamezit rozvoji *X. c. pv. campestris* (McElhaney et al., 1998). V případě kombinace výskytu infikovaných rostlin a potenciálních hmyzích vektorů je pak zásadní rychlé ošetření porostu vhodným insekticidním přípravkem.

Velmi často používané byly dříve při ochraně rostlin proti bakteriálním chorobám v evropských zemích také přípravky na bázi mědi. Dnes je jejich použití v zemích Evropské unie kvůli negativnímu vlivu na životní prostředí omezeno (podle předpisu 473/2002). Dalším problémem je jejich nízká účinnost proti některým bakteriálním patogenům. Z těchto důvodů jsou v ochraně rostlin proti bakteriálním chorobám obecně vyhledávány nové prostředky s nižší zátěží na životní prostředí. Jednou z možných cest je využití rostlinných extraktů s antibakteriálními účinky. Jak esenciální oleje, tak čisté biologicky aktivní látky těchto olejů mají dlouhou historii používání. Uplatňují se na celém světě při přípravě jídel (jako koření), ve farmaceutickém průmyslu (parfémy) a v neposlední řadě i jako aromaterapie v lékařství (Pavela, 2006). K velkým výhodám těchto látek patří nejedovatost éterických olejů vůči teplokrevným živočichům, velmi nízká toxicita byla zaznamenána i u ryb. Z rostlinných extraktů majících největší antibakteriální účinek přímo vůči *X. c. pv. campestris* byl identifikován extrakt z listů *Camellia sinensis* Kuntze. Další rostliny s inhibičním účinkem příslušných extraktů na *X. c. pv. campestris* jsou *Acacia arabicae* (Lam.) Willd., *Aegle Marmelos* (L.) Corrêa, *Acacia catechu* (Lf) Hurter & Mabb., *Achyranthes aspera* (L.),

Asparagus racemosus Willd., *Azadirachta indica* Juss., *Callistemon lanceolatus* (Sm.) DC. a *Acacia farnesiana* (L.) Wight et Arn (Bhardwaj a Laura, 2009). V jiné práci zahrnující také *X. c. pv. campestris* v okruhu testovaných bakterií (van der Wolf et al., 2008) byl jako poměrně účinný vůči *X. c. pv. campestris* identifikován extrakt z *Thymus vulgaris* (thyme oil) a *Thymus capitatus* (origanum oil). Novou možností využitelnou v ochraně rostlin proti bakteriálním patogenům by mohla být také kombinace rostlinných extraktů či esenciálních olejů s měďnatými nebo jinými chemickými sloučeninami, která by mohla zvýšit jejich účinnost.

Druh *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* dosud nebyl zaznamenán na území České republiky, a proto základem pro ochranu před ním je neumožnit se na toto území rozšířit z míst, kde se nyní vyskytuje. Toto opatření platí v měřítku polí nebo jednotlivých oblastí, kde se zelí pěstuje. Další efektivní ochranou je pěstování odrůd zelí odolných vůči této houbě. Koudela et al. (2018) vypracovali metodiku hodnocení rezistence zelí vůči jednotlivým rasám této fytopatogenní houby a díky ní může být u jednotlivých odrůd zjištěno, zda jsou rezistentní či nikoliv. Dosud není v České republice k dispozici žádná souhrnná informace o rezistenci jednotlivých odrůd zelí od různých šlechtitelských firem k tomuto taxonu houby. V případě podezření na výskyt *F. o. f. sp. conglutinans* na zelí je možné provést detekci pomocí konvenční PCR se specifickými primery, díky níž se rychle a spolehlivě určí, zda se jedná skutečně o tento taxon či nikoliv a je možné provést opatření k zamezení rozšíření této houby na území, kde se dosud nevyskytovala. Postup této detekce je součástí této metodiky. Napadení rostlin zelí může zvyšovat nedostatek draslíku ve výživě (Koike et al. 2007), a proto je potřeba zajistit zejména v oblastech s rizikem výskytu *F. o. f. sp. conglutinans* kvalitní výživu pěstovaných rostlin. Eradikace této houby z místa výskytu je složitá, protože tento taxon vytváří chlamydospory, které mohou přetrvávat několik let v půdě v inaktivním stavu a poté za příznivých podmínek infikovat a poškodit rostliny zelí. Napadeny mohou být i některé planě rostoucí brukvovité rostliny a na nich může tato houba přežívat. Protože tato houba přežívá v půdě a rostlinných zbytcích v půdě, tak v případě jejího výskytu není žádoucí na těchto místech pěstovat brukvovité rostliny více let. Řešení ošetřením chemickými přípravky je obtížné, protože je potřeba ošetřovat přímo zeminu, což lze velmi obtížně. Možností je provádět fumigaci, což není šetrné vůči životnímu prostředí nebo se pokusit eradikovat tuto houbu solarizací (Morrison 2007).

Při ochraně různých zemědělských rostlin před *Botrytis cinerea* se používá celá řada chemických přípravků, ale v případě zelí se tato choroba rozvíjí ve většině případů až po sklizni, takže je problém použít některý chemický přípravek z důvodu ochranné lhůty. Na ochranu před touto houbou jsou v současné době je povoleny pouze přípravek Chitosan hydrochlorid, který zvyšuje odolnost rostlin vůči houbovým a bakteriálním chorobám. Kromě toho je povolen přípravek Serenade ASO pro biologickou ochranu na bázi bakterie *Bacillus subtilis*. I některé další přípravky povolené na ochranu před jinými druhy fytopatogenních hub poškozujícími zelí mohou omezovat klíčení spor a růst této houby. Zároveň je vysoce nežádoucí, aby jakýmkoliv pesticidy nebo jinými používanými látkami došlo k poškození pletiv tak, aby byly snadněji napadnutelné *B. cinerea*. Při pěstování zelí je potřeba také zajistit dostatečnou výživu, díky níž nebudou hlávky deformovány a nebudou tedy vznikat přirozené vstupní brány pro infekci.

B. cinerea přežívá ve zbytcích rostlinných pletiv a v případě živých rostlin se vyskytuje především na odumírajících, poraněných nebo přezrálých částech rostlin. Na takovýchto částech rostlin často vytváří husté vysoké mycelium, na němž se tvoří velké množství

nepohlavních spor, které pak mohou být snadno rozšiřovány do okolí a následně, pokud se dostanou na vhodný substrát, mohou začít klíčit a napadat další rostliny nebo rostlinné zbytky. Proto je potřeba při sklizni a naskladňování hlávek zelí zabránit mechanickému poškození a nezanášet spolu s hlávkami rostlinné zbytky nebo hlávky s příznaky napadení *B. cinerea*, které by mohly být zdrojem pro další šíření této houby. Je potřeba hlávky zelí sklízet dříve, než jsou přezrálé a začnou procesy rozkladu tak, jak to je přirozené v životním cyklu této rostliny. Dále je žádoucí, aby hlávky byly suché, nepoškozené nízkou nebo vysokou teplotou, díky níž by se staly více vnímavé pro infekci tímto druhem houby. Pomocí při ochraně po nebo během naskladňování může být ošetření rostlinnými silicemi (origanum oil a thyme oil), které omezují klíčení spor této houby.

2.6. Závěr

Výše uvedené postupy poskytují možnosti detekce *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* a *Botrytis cinerea* a ochrany zelí před nimi různými způsoby. Dávají možnost efektivně snížit míru poškození pěstovaného zelí a zároveň snižují negativní vliv na životní prostředí. Včasná a rychlá detekce je jedním z důležitých prvků tohoto řešení, ale její nevýhodou je větší náročnost na přístrojové vybavení. Využití nanočástic na bázi stříbra je použitelné pouze při ochraně osiva, protože při efektivní aplikaci na rostliny by objem aplikovaných nanočástic musel být větší a jejich výsledná koncentrace v zelí a životního prostředí by mohla být nežádoucí na zdraví člověka životní prostředí. Další alternativou jsou esenciální oleje, které jsou přírodního původu, a riziko poškození životního prostředí, je naprosto zanedbatelné, protože se přirozeně rozkládají. Vysoce důležitým nástrojem při pěstování zelí je také znalost, které odrůdy jsou odolné vůči *X. c.* pv. *campestris*, *F. o. f. sp. conglutinans* a *B. cinerea* a které nikoliv. Odolnost odrůd zelí je vůči *X. c.* pv. *campestris* možné otestovat dle postupu v metodice.

3. Srovnání novosti postupů

V předložené metodice jsou optimalizované postupy spolehlivé detekce *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* a *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* pomocí molekulárně-genetických metod založených na PCR, které jsou spolehlivější a časově méně náročné než diagnostika pomocí standardních mikrobiologických metod. V případě *X. c.* pv. *campestris* je využito postupů na bázi Real Time PCR a v případě *F. o. f. sp. conglutinans* pomocí konvenční druhově specifické PCR. Předností je, že přítomnost obou uvedených mikroorganismů lze zjistit už v časných fázích infekce. Dosud nebyl v českém jazyce publikován metodický postup pro detekci patogena *F. o. f. sp. conglutinans*.

Byly navrženy inovované postupy a možnosti ochrany zelí, vč. osiva. V případě *X. c.* pv. *campestris* byla doporučena možnost využití nanočástic a byl navržen postup hodnocení odolnosti odrůd zelí. Nově byla zhodnocena a předložena možnost využití esenciálních olejů pro ochranu zelí před *F. o. f. sp. conglutinans* a *Botrytis cinerea*.

4. Popis uplatnění metodiky

Komplexní metodika je určena pro pěstitele, šlechtitele zelí a subjekty zabývající se diagnostikou škodlivých mikroorganismů a ochranou zemědělsky významných rostlin.

Metodika poskytuje informace, jak postupovat při detekci *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* a *Botrytis cinerea* v pletivech zelí, a uvádí alternativní možnosti ochrany této zeleniny.

Diagnostickou část metodiky mohou využívat všechna pracoviště mající potřebné technické a personální vybavení pro diagnostiku fytopatogenních hub a bakterií. Jsou to jak nestátní subjekty, tak orgány státní správy (např. ÚKZÚZ).

Metodika je uplatněna prostřednictvím firmy MORAVOSEED CZ a.s., se kterou je uzavřena smlouva o uplatnění metodiky.

5. Ekonomické aspekty

Metodika bude z ekonomického hlediska přínosná v několika oblastech. Bude to jednak pro přímé uživatele a také pro nepřímé uživatele (celá společnost), protože dojde ke snížení zátěže životního prostředí (vyčíslení její hodnoty je velmi složité) související s využíváním těchto nových postupů.

Náklady na stanovení *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* molekulárními technikami založenými na konvenční PCR se specifickými primery v jednom vzorku se pohybují okolo 400 Kč, přičemž výše částky závisí především na počtu souběžně zpracovávaných vzorků. Používání metodiky umožní detekci této forma specialis, což je klasickými mykologickými, mikrobiologickými a fytopatologickými metodami velmi obtížné a umožní také zvýšit výkonnost diagnostické laboratoře a produktivitu práce v ní. Používání molekulárních technik umožní eliminovat chyby, které vznikají při identifikaci hub pomocí kultivačních a následně mikroskopických metod. Metodika je dobře rutinně aplikovatelná, přičemž analýza od přijetí vzorků do laboratoře, přes extrakci DNA až po samotné stanovení přítomnosti patogenních hub trvá pouze 2 - 3 dny. Časově nejnáročnějším krokem je extrakce celkové DNA z rostlinných pletiv. Vzhledem k obvyklé kapacitě centrifugy je jeden pracovník schopen extrahovat okolo 40 vzorků denně. Díky včasnému zjištění taxonu *F. o. f. sp. conglutinans* bude možné eliminovat nebo snížit jeho rozšíření do porostů zelí v ČR. Riziko výskytu této houby se zvyšováním teploty v České republice stoupá. Při roční produkci zelí, která je nyní zhruba 55 000 tun, při ceně 5000,- Kč za tunu a při předpokladu, že se podaří zachránit 5 % produkce, dojde k ekonomickému přínosu v částce okolo 13,5 mil. Kč.

Náklady na stanovení *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* molekulárními technikami založenými na Real Time PCR v 1 vzorku se pohybují okolo 900 Kč apřesnější výše částky závisí především na počtu souběžně zpracovávaných vzorků. V současné době ztráty způsobené touto bakterií činí okolo 3 % pěstovaného zelí. Pokud se díky včasné detekci podaří snížit ztráty na polovinu, tedy na 1,5 %, dojde k ekonomickému přínosu (při roční produkci zelí, která je nyní zhruba 55 000 tun, při ceně 5000,- Kč za tunu) v částce okolo 4,1 mil. Kč ročně. Z hlediska ekonomiky je nejefektivnější zjistit výskyt této bakterie v osivu, protože se zamezí jejímu dalšímu šíření na poli a zároveň nebudou vynakládány finance spojené s pěstováním na poli.

Při skladování zelí je 10 % z něho zničeno skládkovými chorobami. Při výrobě kysaného zelí je využito 25 % vypěstovaného zelí, tedy okolo 14 860 tun ročně, což při ceně 5000,- Kč za tunu dojde ročně ke ztrátě zhruba 7,4 mil. Kč. Při předpokladu, že se podaří pomocí esenciálních olejů snížit ztráty způsobené houbou *Botrytis cinerea* o 25 %, dojde k ekonomickému přínosu v hodnotě okolo 1,86 mil. Kč ročně.

V případě ochrany osiva je metoda ošetření horkou vodou nahrazena účinnější metodou na bázi využití nanočástic stříbra. Nová metoda umožní kvalitnější ošetření osiva a sníží riziko poškození semen (míru klíčivosti), ke kterému dochází při ošetření horkou vodou. Ošetření osiva s cílem zničit škodlivé mikroorganismy, které jsou jím přenášeny, se provádí pouze u osiva, u kterého je nadstandardní míra pravděpodobnosti přítomnosti takovýchto organismů.

6. Seznam použité literatury

- Anonymus (2016): Botrytis cinerea TaqMan PCR Kit. Norgen Biotek Corp. <https://norgenbiotek.com/sites/default/files/resources/Botrytis-cinerea-TaqMan-PCR-Kit-Insert-PITM29400-1.pdf> [přístup 20. prosince 2018]
- Anonymus (2018): Techne® qPCR test Botrytis cinerea Species-specific fragment http://www.techne.com/docs/b_cinerea.pdf [přístup 21. prosince 2018]
- Aoki T., O'Donnell K., Geiser D. M. (2014): Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges – J. Gen. Plant Pathol. 80(3): 189–201.
- Assis S. M. P., Mariano R. L. R., Michereff S. J., Coelho R. S. B. (1997): Antagonism of *Bacillus* spp. to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on cabbage phylloplane in the field. In: Proceedings of the 4th International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-Present Status and Future Prospects. Japan: OECD. s. 345-348.
- Aveling T. A. S., Robbertse P. J. (1990): Evaluation of antibiotics against *Xanthomonas campestris* causing black rot of *Brassica*. Phytomycol. 22(2): 229-231.
- Benitez T., Rincon A. M., Limon M. C., Codon A. C. (2004): Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. Int. Microbiol. 7:249-260.
- Berg T., Tesoriero L., Hailstones D. L. (2005): PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pathovars in *Brassica* seed. Plant Pathol. 54(3): 416-427.
- Bhardwaj S. K., Laura J. S. (2009): Antibacterial activity of some plant extracts against plant pathogenic bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Indian J. Agric. Res. 3(1), 26-31.
- Bhat N. A., Masoodi S. D., Sidique S. H. (2000): Chemical control of black rot of cabbage under field conditions in Kashmir valley. Appl. Biol. Res. 2(1/2): 87-89.
- Blaszczak L., Basinska-Barczak A., Cwiek-Kupczynska H., Gromadzka K., Popiel D., Stepień L. (2017): Suppressive effect of *Trichoderma* spp. on toxigenic *Fusarium* species. Pol. J. Microbiol. 66:85-100.
- Borm P. J., Robbins D., Haubold S., Kuhlbusch T., Fissan H., Donaldson K., Schins R., Stone V., Kreyling W., Lademann J., Krutmann J., Warheit D., Oberdorster E. (2006): The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. Particle and fibre toxicology 3/11.
- Bost S. (2011): Black Rot of Crucifers. Plant diseases. The University of Tennessee, (0W273). - https://trace.tennessee.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1051&context=utk_agexdise [přístup 10. září 2018]
- Buchtová I. (2017): Situační a výhledová zpráva Zelenina. MZe ČR, Praha, ČR65 s.
- Caldeira A. T., Santos Arteiro J. M., Coelho A. V., Roseiro J. C. (2011): Combined use of LC-ESI-MS and antifungal tests for rapid identification of bioactive lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CCM11051. Process. Biochem. 46:1738-1746.

- Cruz J., Tenreiro R., Cruz L. (2017): Assessment of diversity *Xanthomonas campestris* pathovars affecting cruciferous plants in Portugal and disclosure of two novel *X. campestris* pv. *campestris* races. *J. Plant Pathol.* 99(2): 403-414.
- Da Silva R. S., Moutinho B. L., dos Santos D. R., Vasconcelo-Rodriguez I. S., Talamini V., Fernandes M. F., Fernandes R. P. M. (2018): Using antagonistic soil bacteria and their cell-free filtrates to control the bacterial rot pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J. Phytopathol.* 166: 494-501.
- Dean R., VanKan J. A. L., Pretorius Z. A., Hammond-Kossack K. E., diPietro A., Spanu P. D., Rudd J. J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J. Foster G. D. (2012): The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molec. Plant Pathol.* 13: 414-430.
- DiPietro A., Madrid M. P., Caracuel Z., Delgado-Jarana J., Roncero M. I. G. (2003): *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molec. Plant Pathol.* 4: 315-325.
- Domsch K. H. Gams W., Anderson T. H. (2007): Compendium of soil fungi. Second edition. IHW Verlag, Eching, Německo, 672 s.
- Eichmeier A., Peňázová E., Baránek M. (2017) Metodika detekce a kvantifikace bakterie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pomocí TaqMan® Real Time PCR systému: certifikovaná metodika. Brno: Mendelova univerzita v Brně.
- Fillinger S., Elad Y. (eds.) (2016): Botrytis – the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems. Springer, London, UK, 486 s.
- Fargier E., Manceau C. (2007): Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathol.* 56(5): 805-818.
- Fourier G., Steenkamp E. T., Ploetz R.C., Gordon T. R., Viljoen A. (2011): Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis *cubense* within the *Fusarium oxysporum* complex. *Infect. Genet. Evol.* 11:533–542.
- Görner F., Valík L. (2004). Aplikovaná mikrobiológia požívatin. Malé centrum, Bratislava, SR, 528 s.
- Ishikawa R., Suzuki-Nishimoto M., Fukuchi A., Matsuura K. (2004): Effective control of cabbage black rot by validamycin A and its effect on extracellular polysaccharide-production of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J. Pestic. Sci.* 29(3): 209-213.
- Jensen B. D., Vicente J. G., Manandhar H. K., Roberts S. J. (2010): Occurrence and diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in vegetable *Brassica* fields in Nepal. *Plant Dis.* 94(3): 298-305.
- Jo Y., Kim B. H., Jung B. (2009): Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant Dis.* 93(10): 1037-1043.
- Kamoun S., Kamdar H. V., Tola E., Kado C. I. (1992): Incompatible interactions between crucifers and *Xanthomonas campestris* involve a vascular hypersensitive response: role of the hrpX locus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5: 22-33.
- Katan J. (2017): Diseases caused by soilborne pathogens: biology, management and challenges. *J. Plant Pathol.* 99:305-315.
- Kirk P. M., Cannon P. F., Minter D. W., Stalpers J. A. (eds.) (2008): Ainsworth & Bisby'S Dictionary of the fungi. 10th edition, CABI, Wallingford, UK, 771 s.

- Koike S. T., Gladders P., Paulus A. O. (2007): Vegetables diseases A colour handbook. CRC Press, London, UK, 448 s.
- Koudela M., Kofránková V., Jelínek T., Novotný Č., Novotný D. (2018): Vyhodnocení odolnosti šlechtitelských materiálů a dalších genových zdrojů vůči *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*. Certifikovaná metodika, Česká zemědělská univerzita v Praze, (in press).
- Kucharek T. J., Strandberg J. (2000): Black Rot of Crucifers. Plant Pathology Fact Sheet. Florida: University of Florida. <https://plantpath.ifas.ufl.edu/media/plantpathifasufledu/factsheets/pp0013.pdf> [přístup 10. září 2018]
- Leslie J. F., Summerell B. A. (2006): The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell publishing, Ames, USA, 388 s.
- Ligon J. M., Hill S. D., Hammer P. E., Torkewitz N. R., Hofmann D., Kempf H. J., van Pee K. H. (2000): Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. Pest Manag. Sci. 56: 688-695.
- 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. J. Phytopathol 165: 813-821.
- Mansfield J., Genin S., Magori S., Citovsky V., Sriariyanum M., Ronald P., Dow M., Verdier V., Beer V., Machado M. A., Toth I., Salmond G., Foster G. D. (2012): Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. Molec. Plant Pathol., 13(6): 614-629.
- McElhaney R., Alvarez A. M., Kado C. I. (1998): Nitrogen limits *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* invasion of the host xylem. Physiol. Mol. Plant Pathol. 52(1): 15-24.
- Meenu G., Vikram A., Bharat N. (2013): Black rot – a devastating disease of crucifers: a review. Agric. Rev. 34: 269-278.
- Monteiro L., de Lima Ramos Mariano L., Souto-Maior A. M. (2005): Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Braz. Arch. Biol. Technol. 48: 23-29.
- Morrison R. H. (2007): Yellows (*Fusarium* wilt) – In: Rimmer S. R., Shattuck V. I., Buchwaldt L. (eds.), Compendium of *Brassica* diseases, s. 59-60, APS Press, St. Paul, USA.
- Ocsoy I., Paret M. L., Ocsoy M. A., Kunwar S., Chen T., You M., Tan W. (2013): Nanotechnology in plant disease management: DNA-directed silver nanoparticles on graphene oxide as an antibacterial against *Xanthomonas perforans*. Acs Nano 7(10): 8972-8980.
- Pavela R. (2006): Rostlinné insekticidy: hubíme hmyz bez chemie. Grada Publishing a.s., Praha, ČR, 96 s.
- Peňázová E., Kopta T., Jurica M., Pečenka J., Eichmeier A., Pokluda R. (2018): Testing of inoculation methods and susceptibility testing of perspective cabbage breeding lines (*Brassica oleracea* convar. *capitata*) to the black rot disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Acta Univ. Agric. Silv. Mendel. Brun. 66(1): 139-148.
- Rigotti S., Gindro K., Richter H., Viret O. (2002): Characterization of molecular markers or specific and sensitive detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. in strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) using PCR. FEMS Microbiol Lett. 209: 169–174.
- Rimmer S. R. (2007): Bacterial soft rot – In: Rimmer S. R., Shattuck V. I., Buchwaldt L. (eds.), Compendium of *Brassica* diseases, s. 56-58, APS Press, St. Paul, USA.

- Rod J., Hluchý M., Zavadil K., Prášil J., Somssich, Zacharda M. (2005): *Obrazový atlas chorob a škůdců zeleniny střední Evropy*. Biocont Laboratory spol. s.r.o., Brno, ČR, 392 s.
- Roberts S. J., Koenraadt H. (2015): Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on *Brassica* spp., - In: Anonymus, International Rules for Seed Testing, Annexe to Chapter 7: Validated Seed Health Testing Methods, 7–019a, International Seed Testing Association Bassersdorf.
- Rubel M., Robin A., Natarajan S., Vicente J., Kim H. - T., Park J. - I., Nou I. - S. (2017): Whole-genome re-alignment facilitates development of specific molecular markers for races 1 and 4 of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the cause of black rot disease in *Brassica oleracea*. *Int. J. Mol. Sci.* 18(12): 2523-2538.
- Samson R. A., Hoekstra E. S., Frisvad J. C. (2004): *Introduction to food- and airborne fungi*. Utrecht, Nizozemí, 389 s.
- Sanchez C., Belleville P., Popall M., Nicole L. (2011): Applications of advanced hybrid organic–inorganic nanomaterials: from laboratory to market. *Chem. Soc. Rev.* 40(2): 696-753.
- Shafi J., Tian H., Ji M. (2017): *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 31: 446-459.
- Singh D., Dhar S. (2010): Effect of endophytic bacterial antagonists against black rot disease of cauliflower caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Indian Phytopath.* 63(2): 122-126
- Taylor J. D., Conway J., Roberts S. J., Astley D., Vicente J. G. (2002): Sources and origin of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica* genomes. *Phytopathology* 92: 105–111.
- Umesha S., Jyothi N., Roohie R. K. (2015): Detection of bacterial and *Fusarium* wilt pathogens in cabbage by multiplex PCR. *J. Plant Sci.* 3(4): 185-190.
- Van der Wolf J. M., Birnbaum Y., Van der Zouwen P. S., Groot S. P. C. (2008): Disinfection of vegetable seed by treatment with essential oils, organic acids and plant extracts. *Seed Sci. Technol.* 36(1): 76-88.
- Vicente J. G., Holub E. B. (2013): *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to *Brassica* crops. *Mol. Plant Pathol.* 14: 2-18.
- Vicente J. G., Conway J., Roberts S. J., Taylor J. D. (2001): Identification and origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races and related pathovars. *Phytopathology* 91(5): 492-499.
- Vicente J. G., Conway J., Roberts S. J., Taylor J. D. (2001): Identification and origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races and related pathovars. *Phytopathology* 91: 492-499.
- Vicente J. G., Ignatov A., Conway J., Roberts S. J., Taylor J. D. (1998): Development of an improved *Brassica* differential series for the identification of races of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. In: 7th International Conference on Plant Pathology Abstracts 1998. s. 2.2.71.
- Williams P. H. (1980): Black rot: a continuing. *Plant Dis.* 64: 736-742.

Wretlind B., Pavlovskis O. R. (1984): Genetic mapping and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* mutants defective in the formation of extracellular proteins. J. Bacteriol. 158: 801-808.

Zvirin T., Herman R., Brotman Y., Denisov Y., Belausov E., Freeman S., Perl-Treves R. (2010): Differential colonization and defence responses of resistant and susceptible melon lines infected by *Fusarium oxysporum* race 1.2. Plant Pathol. 59: 576-585.

7. Seznam publikací, které předcházely metodice

Eichmeier A., Čechová J., Peňázová, E. (2015): Genetic diversity of partial hrpF and Zur genes in populations of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica oleracea* convar. *capitata* in the Czech Republic. Acta Hort. 1105:180-188.

Eichmeier A., Peňázová E., Baránek M. (2017) Metodika detekce a kvantifikace bakterie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pomocí TaqMan® Real Time PCR systému. Certifikovaná metodika. Mendelova univerzita v Brně, Brno, ČR.

Eichmeier, A., Peňázová, E., Pečenka, J., Čechová, J., Pokluda, R., Tekielska, D., & Baránek, M. (2016). Rapid Communication. Monitoring the occurrence of bacteria in stored cabbage heads. J. Plant Prot. Res. 57(1): 56-61.

Novotný D., Šillerová J. (2018): Esenciální oleje – ochrana brukvovitých před původcem fuzáriového vadnutí. Zahradnictví 17 (5): 64-66.

Peňázová E., Eichmeier A., Čechová J., Baránek M., Pokluda R. (2015): Evaluation of different methods of DNA extraction for detection of bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cabbage leaves. Acta Sci. Pol.-Hortoru. 14(6):141-150.

Peňázová E., Kopta T., Jurica M., Pečenka J., Eichmeier A., Pokluda R. (2018): Testing of inoculation methods and susceptibility testing of perspective cabbage breeding lines (*Brassica oleracea* convar. *capitata*) to the black rot disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Acta Univ. Agric. Silvic. Mendel. Brun. 66(1): 139-148.

Salava J. (2017): Reakční směs pro diagnostiku houby *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* pomocí PCR, číslo užitého (průmyslového) vzoru: 30613.

Autoři: RNDr. David Novotný, Ph.D., doc. Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D., Ing. Aleš Eichmeier, Ph.D., doc. Dr. Ing. Jaroslav Salava, Ing. Bc. Eliška Peňázová, Ing. Jakub Pečenka, doc. Ing. Martin Koudela, Ph.D.

Název: Prostředky diagnostiky a ochrany proti vybraným druhům škodlivých mikroorganismů zelí

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha 6 - Ruzyně ve Výzkumném ústavu zemědělské techniky, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha 6 - Ruzyně

Sazba a tisk: Výzkumný ústav zemědělské techniky, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha 6 - Ruzyně

Náklad: 50 ks

Metodika je veřejně přístupná na adrese www.vurv.cz.

Vyšlo v roce 2019.

Vydáno bez jazykové úpravy.

Autor titulních fotografií: RNDr. David Novotný Ph.D.

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2019

ISBN: 978-80-7427-291-2