

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra ochrany rostlin



Detekce a determinace významných patogenů řepky olejky
na úrovni nukleových kyselin

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Michaela Škeříková
Vedoucí práce: Ing. Jana Mazáková, Ph.D.

2012

....

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Detekce a determinace významných patogenů řepky olejky na úrovni nukleových kyselin“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji v příložené bibliografii.

V Kostelci nad Černými lesy dne:

.....
podpis autora práce

PODĚKOVÁNÍ:

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Janě Mazákové, Ph.D. za cenné připomínky, trpělivost a ochotu při vysvětlování laboratorních technik. Dále pak Ing. Miloslavu Zouharovi, Ph.D. a Ing. Lence Grimové, Ph.D. za praktické připomínky a cenné informace z oblasti molekulární diagnostiky a celému kolektivu Katedry ochrany rostlin za příjemné pracovní prostředí. Mgr. Josefu Fišerovi děkuji za pomoc při statistickém vyhodnocení.

SOUHRN

Dynamický rozvoj pěstování řepky olejky v České republice s sebou přináší zvýšení rizika napadení této plodiny chorobami a škůdci. Hlavní fytopatogenní organismy napadající řepku olejku jsou *Leptosphaeria maculans*, *Leptosphaeria biglobosa*, *Sclerotinia sclerotiorum* a *Verticillium* spp.

Pro zvolení správného, cíleného a vhodně načasovaného ošetření fungicidy je nutná spolehlivá detekce patogenů v rostlinném pletivu a vyhodnocení míry napadení porostu.

Diagnostika patogenů byla s postupem vývoje vědy zdokonalována a byly využívány různé metody determinace patogenů – od vizuálního hodnocení symptomů, přes kultivace na živných médiích, imunologických testů (např. ELISA) až k metodě „polymerázové řetězové reakce“ PCR (z anglického Polymerase Chain Reaction).

Principem metody je exponenciální znásobení – amplifikace úseku DNA, která je specifická pro určitého původce choroby. Reakce probíhá za použití primerů o délce a sekvenci unikátní pro zkoumaného patogena. Záporně nabitá DNA je při separaci v elektroforetické cele přitahována ke kladné elektrodě. Složitou strukturou gelu dojde k separaci jednotlivých úseků DNA podle počtu párů bází. Vizualizací v UV Transiluminátoru je možné pozorovat fragmenty patřící hledanému organismu.

Cílem práce bylo vytvoření a optimalizace postupů rozlišení nejvýznamnějších patogenů řepky olejky na molekulární úrovni a tyto postupy využít k detekci těchto patogenů v rostlinném pletivu řepky.

PCR metoda byla použita při detekci *L. maculans* a *L. biglobosa* u 265 rostlin z 52 lokalit. Bylo prokázáno četnější napadení *L. biglobosa* (180x) než *L. maculans* (109x). U obou původců fomové hniloby byl analýzou rozptylu evidován statisticky průkazný rozdíl v počtu napadených kořenů (23x a 25x) oproti mnohem četnějšímu výskytu patogenů na ostatních částech rostliny. *L. maculans* statisticky průkazně infikovala častěji kořenový krček než kořen a stonky. Při porovnání míry napadení stonku 1 a stonku 2 nebyly statisticky průkazné rozdíly. Diference v počtu pozitivních nálezů *L. biglobosa* na kořenovém krčku a oběma částmi stonku není statisticky průkazná.

Sclerotinia sclerotiorum a *Verticillium* spp. bylo analyzováno na 184 rostlinách z 35 lokalit. Přítomnost patogena *Verticillium* spp. nebyla potvrzena v žádném vzorku rostlinného

pletiva. *Sclerotinia sclerotiorum* byla potvrzena na 59 rostlinách. Statisticky významné rozdíly jsou mezi kořenem, který byl napaden 45x a kořenovým krčkem, kde byla přítomnost *S. sclerotiorum* prokázána 47x. Druhá statisticky významně se lišící dvojice je stonek 1, kde byl počet pozitivních nálezů 35, a stonek 2, který byl infikován 1x. Dle programu SPSS nejsou ve skupinách kořen/stonek 2, kořen/ stonek 1 a kořenový krček/stonek 1 signifikantní rozdíly.

Použitím PCR metody dojde k rychlému a přesnému označení původce choroby. Tato metoda je poměrně nákladná, ale oproti „prostému“ vizuálnímu hodnocení symptomů, které mohou někdy být shodné pro více patogenů, zde dochází k jednoznačnému určení původce choroby, což je důležité zejména při volbě fungicidního ošetření a konkrétního fungicidu. Patogena je taky možné rozpoznat v rostlině ještě před rozvojem vizuálních příznaků a optimalizovat tak způsob ochrany porostu.

KLÍČOVÁ SLOVA: řepka olejka, bílá hniloba, fomová hniloba, verticiliové vadnutí, PCR metoda

SUMMARY

Dynamic development oilseed rape (OSR) production in the Czech Republic brings also risk of higher infestation with diseases and pests. The most important phytopathogenic organisms OSR are *Leptosphaeria maculans*, *Leptosphaeria biglobosa*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Verticillium* spp.

For selection correct, targeted and suitable timed fungicides treatment is necessary to have a reliable pathogen detection system in plant tissue and evaluation of degree of stand infestation.

Pathogen diagnostics was during science progress improved and have been used different methods of pathogen determination – from visual evaluation of symptoms, cultivation on different nutrient mediums and immunological tests (e. g. ELISA) to method „polymerase chain reaction“ (PCR).

The principle of this method is exponential multiplying – amplification of DNA fragment specific for a certain pathogen. For this are used primers (nucleotides) of size and sequence typical for investigated organism. Electronegative DNA is during separation in electroforetic cell attracted to electropositive electrode. Complicated structure of gel enables separation of individual fragments of DNA molecule according to their base pair number.

The aim of this thesis was to create and optimize distinction procedures of the most important OSR pathogens on the molecular base and use this method for detection disease causal agent in rapeseed plant tissue.

PCR was used in detection of *L. maculans* and *L. biglobosa* in 265 plants from 52 localities. More numerous attacks were proved by *L. biglobosa* (180x) than *L. maculans* (109x). Both agents causes phoma stem rot had statistically significant difference in a count of attacked roots (23x and 25x) against more numerous occurrences of pathogens in the other parts of the plant. *L. maculans* infected root neck statistically significantly much more, than roots and stems. In comparison of degree of stem 1 and stem 2 attacks there were no statistically significant differences. Difference in a count of positive finding *L. biglobosa* in the root neck and both parts of the stem is not statistically significant.

Sclerotinia sclerotiorum and *Verticillium* spp. were analysed on 184 plants from 35 localities. Presence of pathogen *Verticillium* spp. was not proved in all samples of plant

tissue. *Sclerotinia sclerotiorum* was confirmed in 59 plants. Statistically significant differences are between roots (45 infestations) and root neck (47 infestations). The second statistically significantly different pair is the stem 1, where were 35 positive findings and stem 2 with one positive finding. According to SPSS program there are no significant differences between groups root/stem 2, root/stem 1 and root neck/stem.

By using PCR method we get fast and accurate designation of disease causal agent. This method is relatively expensive, but against „simple“ visual symptoms, that can be similar for more pathogens, PCR clearly identifies of disease causal agent. And that is very important especially for choice of fungicide treatment and specific preparation. It is also possible to recognize pathogen in the plant just before development of visual symptoms and to optimize protection.

KEY WORDS: oilseed rape, white mold, phoma stem rot, verticillium wilt, PCR

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. VĚDECKÁ HYPOTÉZA A CÍL PRÁCE	2
3. LITERÁRNÍ REŠERŠE	3
3.1 PŮVOD, ROZŠÍŘENÍ A CHARAKTERISTIKA ŘEPKY OLEJKY	3
3.2 PODMÍNKY PRO KONVENČNÍ PĚSTOVÁNÍ ŘEPKY OLEJKY	4
3.3 MOŽNOSTI VYUŽITÍ ŘEPKY OLEJKY A VÝROBKŮ Z NÍ	5
3.3.1 Využití v potravinářství	5
3.3.2 Využití v krmivářství	5
3.3.3 Výroba bionafty	6
3.3.4 Oleochemie	6
3.4 BÍLÁ SKLEROTINIOVÁ HNILOBA ŘEPKY	7
3.4.1 Systém a původ	7
3.4.2 Hostitelské spektrum	8
3.4.3 Rozmnožování a šíření	8
3.4.4 Životní cyklus	10
3.4.5 Příznaky na rostlině	10
3.4.6 Ochrana	11
3.5 FOMOVÁ HNILOBA	12
3.5.1 Systém a původ	12

3.5.2	Hostitelské spektrum	14
3.5.3	Rozmnožování a šíření	15
3.5.4	Životní cyklus	16
3.5.5	Příznaky na rostlině	17
3.5.6	Ochrana	18
3.6	VERTICILIOVÉ VADNUTÍ	19
3.6.1	System a původ	19
3.6.2	Hostitelské spektrum	20
3.6.3	Rozmnožování a šíření	21
3.6.4	Životní cyklus	22
3.6.5	Příznaky na rostlině	23
3.6.6	Ochrana	24
3.7	METODY DIAGNÓZY ROSTLINNÝCH POŠKOZENÍ	25
3.8	POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE	26
3.8.1	Izolace DNA	26
3.8.2	Princip polymerázové řetězové reakce	27
3.8.3	Gelová elektroforéza	29
3.8.4	Měření čistoty DNA	30
4.	MATERIÁL A METODY	31

4.1 ODBĚR VZORKŮ	31
4.2 ZPRACOVÁNÍ ROSTLIN	31
4.3 IZOLACE DNA	32
4.4 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE	33
4.5 ELEKTROFORETICKÁ SEPARACE	35
4.6 MĚŘENÍ ČISTOTY DNA	36
4.7 VYHODNOCENÍ	36
5. VÝSLEDKY	37
6. DISKUSE	48
6.1 FOMOVÁ HNILOBA	48
6.2 VERTICILIOVÉ VADNUTÍ	50
6.3 BÍLÁ HNILOBA	50
7. ZÁVĚR	52
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	54
9. SEZNAM LITERATURY	55
10. SEZNAM PŘÍLOH	66
11. PŘÍLOHY	67
11.1 PŘÍLOHA Č. 1: UKÁZKA ELEKTROFOREOGRAMU	66
11.2 PŘÍLOHA Č. 2: TABULKA VÝSLEDKŮ	67
11.3 PŘÍLOHA Č. 3: ANALÝZA ROZPTYLU	104
11.3.1 Analýza rozptylu <i>Leptosphaeria maculans</i>	104
11.3.2 Analýza rozptylu <i>Leptosphaeria biglobosa</i>	107
11.3.3 Analýza rozptylu <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	112

1. ÚVOD

Řepka olejka v roce 2011 byla v České republice sklizena z 373 386 ha s průměrným výnosem 2,80 t/ha. Celková produkce řepkového semene byla 1 046 071 tun (Český statistický úřad, 2012). Česká republika se tak řadí k evropské špičce v pěstování této plodiny.

Pěstování řepky olejky je zatím rentabilní, a tak je v osevních postupech ve vysokém zastoupení. Její nevhodné a časté zařazování do osevního postupu s sebou však přináší problémy. Nedostatečná časová a prostorová izolace porostů brukvovitých vytváří vhodné podmínky pro přežívání původců chorob a škůdců, a napomáhá tak jejich vyššímu tlaku v porostech.

Dvouděložné plodiny jsou obvykle napadány jiným komplexem chorob než obiloviny. Intenzita napadení, symptomy a škody na výnosech se mohou v jednotlivých plodinách lišit. Pro řepku olejku jsou nejzávažnější choroby: bílá hniloba (*Sclerotinia sclerotiorum*), fomová hniloba (*Leptosphaeria maculans* a *Leptosphaeria biglobosa*) a verticiliové vadnutí (*Verticillium* spp.) Při absenci chemické ochrany mohou ztráty na výnose být i více než 50 %.

Pro navržení vhodného způsobu ochrany plodiny před původcem choroby je důležité včasné rozpoznání patogena. Metoda polymerázové řetězové reakce je relativně jednoduchá, rychlá, citlivá a má široké spektrum použití. Stala se tak obvyklým postupem v diagnostice patogenů. Především u diagnostiky hub a bakterií je její předností rychlost, neboť odpadá několikadenní kultivace patogena na živném médiu, což je nezbytné pro mikroskopickou diagnostickou metodu.

Využitím PCR metody je možno původce chorob detekovat v rostlinném pletivu ještě před rozvojem choroby. Na základě zjištěného napadení lze optimalizovat ochranu rostlin i preventivní opatření, a to jak u řepky olejky, tak u následných plodin.

2. VĚDĚCKÁ HYPOTÉZA A CÍL PRÁCE

Hypotéza: existují metody detekce patogenů řepky olejky v infikovaném rostlinném pletivu.

Cíl diplomové práce: vytvořit a optimalizovat postupy rozlišení nejvýznamějších patogenů řepky olejky na molekulární úrovni a využít tyto postupy k detekci těchto patogenů v rostlinném pletivu řepky.

3. LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1 PŮVOD, ROZŠÍŘENÍ A CHARAKTERISTIKA ŘEPKY OLEJKY

Řepka olejka (*Brassica napus* L. var. *napus*) s vysokou pravděpodobností nemá žádného planého předka. Vznikla patrně zkřížením brukve zelné (*Brassica oleracea*) a brukve řepáku (*B. campestris*), (řepice či vodnice) jako tzv. amfitetraploid s 38 chromozomy v oblasti středomořského genového centra (Baranyk a kol., 2010). Ač se to zdá jako šedá historie, i v současné době takovýmto způsobem řepka v omezené míře znovu vzniká. Jedná se o resyntetizované odrůdy, jež si některé šlechtitelské firmy vyrábějí za účelem zvýšené genetické diverzity pro tvorbu nových odrůd (Baranyk a kol., 2005).

Areál pěstování řepky olejky zasahuje do celé oblasti mírného klimatického pásu (Baranyk a kol., 2005; Youn-sung *et al.*, 2011). Po Číně a Kanadě je Indie 3. největším producentem na světě (Singh *et al.*, 2011).

Při klíčení vyžaduje semeno řepky přibližně 60 hmotnostních procent vody a proces klíčení začíná při teplotě okolo 1 °C. Optimální teplota klíčení je 20 – 25 °C (Fábry, 2007). Růst probíhá za příznivých podmínek velmi rychle. U ozimých forem dosahuje počet listů do začátku zimy počtu 8 – 15, a to v závislosti na odrůdě, době setí a délce podzimní vegetace. (Fábry a kol., 1992).

Baranyk (2005) uvádí, že pokud je průměr kořenového krčku alespoň 0,8 cm, rostlina je schopna odolávat mrazům až do –20 °C. Řepka vytváří mohutný kulový kořen s velkým množstvím postranních kořínků.

Nadzemní část ozimé řepky vyrůstá ve 2 fázích – přezimuje ve fázi listové růžice (fáze vegetativní) a na jaře přejde v generativní – prodlužovací, rychlého růstu. Období zimní vegetace charakterizuje doba od poklesu průměrných denních teplot vzduchu pod 2 °C až do obnovení vegetace s nástupem průměrných denních teplot vzduchu nad 5 °C. Toto období kryptovegetace neznamena absolutní vegetační klid, protože pokračuje i nadále měřitelný růst kořenového systému, vyvíjí se vzrostný vrchol a probíhají adaptační procesy odolnosti proti nízkým teplotám (Fábry a kol., 1992).

Na jaře nastupuje období vegetace, kdy průměrné denní teploty vzduchu stoupají nad 5 °C. Toto období trvá 70 – 80 dní. Období kvetení trvá přibližně 20 dní a poslední období, od konce kvetení až po dozrání semen, trvá 30 – 40 dní (Fábry a kol., 1992).

Lodyha má výšku 120 – 220 cm, nejčastěji však 140 – 160 cm. Na lodyze vyrůstá v úžlabí 6 – 8 větví, které se dále dělí. Květ je stavěn podle čísla 4. Obvykle má barvu jasně žlutou, výjimečně světle žlutou až bílou. Řepka olejka je rostlina včelomilná, i když z větší části samosprašná. Kvetení porostu zpravidla trvá 20 – 25 dní a většinou celé probíhá v květnu. Rostliny při hustotě 60 jedinců na m² mají 300 – 500 květů, ze kterých se do sklizně obvykle vyvine 80 – 120 šesulí. Tato dvouřadá šesule by měla obsahovat 15 – 20 tmavě zbarvených semen s hmotností tisíce semen (HTS) 4,5 – 5,5 g, výjimečně až 10 g. Vyskytují se však i čtyřřadá šesule a šesule obsahující 40 – 50 semen. Semena mohou být i žlutě zbarvena (Baranyk a kol., 2005).

Jedním ze šlechtitelských cílů je vyšlechtění typů se žlutým osemením (Baranyk a kol., 2010). Jeho výhody jsou tenčí slupka, vyšší obsah bílkovin a oleje a méně nestravitelných vláken (Shirzedegan and Robbelen, 1985).

V klimatických podmínkách České republiky má řepka olejka vegetační dobu 300 – 320 dní, ale v nadmořských výškách nad 600 m to může být i 360 dní (Baranyk a kol.).

3.2 PODMÍNKY PRO KONVENČNÍ PĚSTOVÁNÍ ŘEPKY OLEJKY

Řepce olejce nejvíce vyhovují lokality s ročním průměrem teplot 7 – 9 °C, ročním průměrem srážek 450 – 700 mm a nadmořskou výškou do 650 m n. m. V nížinách si řepka a cukrová řepa konkurovaly o hnůj, proto se velká část ploch řepky přenesla do vyšších poloh a podhůří. Má zde vhodné ekologické podmínky s dostatkem srážek a menším tlakem škůdců a sněhovou pokrývkou chránící porosty proti holomrazům (Baranyk a kol., 2010).

Řepka olejka má mohutný kořenový systém, a proto je rostlinou relativně suchovzdornou, náročnou na srážky pouze po zasetí a v době tvorby semen (Baranyk a kol., 2010). Tato plodina je velmi flexibilní, ale přesto nemá ráda stanoviště, které je zamokřené déle než jeden týden, lokality s déle trvajícím holomrazy –15 °C až –20 °C a zbytky sulfomočoviny v půdě, které způsobují její nepřírozený retardovaný vývoj. Z klimatických faktorů, které negativně ovlivňují vzcházení a vývoj řepky je to sucho nebo naopak nadbytek srážek, zimní kolísání teplot, silné mrazy nebo holomrazy v předjaří či na jaře a vysoké teploty v době květu (Baranyk a kol., 2005).

3.3 MOŽNOSTI VYUŽITÍ ŘEPKY OLEJKY A VÝROBKŮ Z NÍ

Řepkový olej je základem pro nespočet produktů. Jeho hodnota a velikost potenciálních trhů mohou být dále optimalizovány produkcí řady profilů mastných kyselin (Jevič, 2009). Nezbytnou podmínkou rentabilní produkce je zejména zajištění stabilního odbytu řepkového semene za dobré ceny. Při jeho zpracování vzniká široká škála hodnotných produktů, proto je podmínkou rozvoje této komodity i znalost a zajištění jejich odbytu za fungujících ekonomických podmínek (Nerad, 2007). Nerad (2007) rozděluje využití produktů řepky olejky na 4 odvětví:

3.3.1 Využití v potravinářství

Weißen (2009) uvádí, že řepkový olej je buď rafinovaný, nebo za studena lisovaný. Je vhodný pro teplou i studenou kuchyni. Velmi dobře snáší teploty až 180 °C. Rafinovaný řepkový olej má trvanlivost minimálně jeden rok. I při tepelných úpravách zůstává chuťově neutrální. Ze zdravotního hlediska se řepkový olej za studena lisovaný od rafinovaného liší jen nepatrně. Rozdíl je v chuti a způsobu přípravy. Z dietetického hlediska patří řepkový olej k nejcennějším stolním olejům. Pro lidský organismus je ještě vhodnější než olivový.

Důvody pro to, dle Nerada (2007), jsou:

- nižší obsah nasycených mastných kyselin (6 – 8 %)
- vysoký obsah nenasycené mastné kyseliny olejové (a to na úrovni přibližně srovnatelné s olivovým olejem, tj. 50 – 60 %)
- bohatý obsah kyseliny alfa-linolové (20 – 22 %)
- poměr kyseliny linolové ku linolenové je příznivý, a to 1 : 2

3.3.2 Využití v krmivářství

Řepkové extrahované šroty a výlisky, případně drcená semena, jsou významnou bílkovinnou součástí krmných směsí pro hospodářská zvířata. Řepkovými šroty současných „00“ odrůd lze do značné míry nahrazovat šroty sójové, které jsou zvláště v posledních letech do České republiky silně importovány (Baranyk a kol., 2010).

3.3.3 Výroba bionafty

Chemickou reakcí řepkového oleje s metylalkoholem (transesterifikace) je získáván metylester řepkového oleje (MEŘO) nebo-li bionafta. Výhody plynoucí z používání „MEŘO“ jako pohonné hmoty jsou významné – jedná se o alternativní palivo velmi podobné motorové naftě s přesně normovanými parametry, biologická rozložitelnost, pozitivní uhlíková bilance, neobsahuje síru, aromáty ani polyaromatické uhlovodíky, výrazně nižší kouřivost a v neposlední řadě skýtá možnost rozvoje tuzemské zemědělské výroby. K obecným nevýhodám bionafty patří omezená možnost její produkce, mírný nárůst spotřeby oproti komerční naftě, agrese vůči běžným plastům, mírně zhoršené chladové vlastnosti a nutnost doaditivace depresanty zejména pro tvrdší zimní podmínky (Nerad, 2007).

3.3.4 Oleochemie

Rostlinné oleje a technické výrobky z nich jsou biologicky snadno odbouratelné, a tím minimalizují poškození lidského organismu a životního prostředí. Průmyslové využití rostlinných olejů je určováno ekonomikou, která v současné době dává prostor pro výrobu mnoha produktů jako glycerolu, vyšších mastných kyselin, jejich solí a esterů, vyšších mastných alkoholů a aminů, oligomerních mastných kyselin, které slouží k výrobě plastických hmot, pryskyřic, laků, detergentů, emulgátorů, umělých vláken, mazacích prostředků, farmaceutických výrobků, plastifikátorů, různých aditiv aj. (Baranyk a Ehrenbergrová, 2005).

3.4 BÍLÁ SKLEROTINIOVÁ HNILOBA ŘEPKY

3.4.1 Systém a původ

Soustava	<i>Vitae</i>	živé organismy
Doména	<i>Eukaryota</i> Whittaker & Margulis, 1978	jaderní
Nadříše	<i>Unikonta</i>	
	<i>Opisthokonta</i> Cavalier-Smith, 1987 b	
Říše	<i>Fungi</i> Whittaker, 1959	houby
Oddělení	<i>Ascomycota</i> Caval.-Sm.	houby vřeckovýtrusé
Podkmen	<i>Pezizomycotina</i> O. E. Erikss. & Winka	
Třída	<i>Leotiomycetes</i>	
Podtřída	<i>Leotiomycetidae</i>	
Řád	<i>Helotiales</i> Nannf., 1932	voskovičkotvaré
Čeleď	<i>Sclerotiniaceae</i>	hlízenkovité
Rod	<i>Sclerotinia</i> Fuckel	hlízenka
Druh	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary	hlízenka hlíznatá

(zdroj: www.biolib.cz)

Purdy (1979) uvádí, že madam M. A. Libert v roce 1837 nejdříve popsala *Peziza sclerotiorum*, což názvem houby zůstalo do doby, kdy Fuckel v roce 1870 popsal a ustanovil rod *Sclerotinia*. Jako poctu madam Libert chtěl přejmenovat *Peziza sclerotiorum* dle nového názvosloví na *Sclerotinia libertiana*, což bylo následně akceptováno a po celém světě používáno jako *S. libertiana* Fuckel. Avšak E. N. Wakefield v roce 1924 poukázal na neshodu s Mezinárodními pravidly pro botanickou nomenklaturu a citoval G. E. Masee, který v roce 1895 použil název *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) Masee. De Bary však toto pojmenování použil již v roce 1884, a proto je vědeckým názvem *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (1884).

S. sclerotiorum je původcem choroby „bílá hniloba řepky“, starším názvem „hlízenka obecná“ (Plachká, 2010). Bílá sklerotiniiová hniloba řepky je tedy známá více než století, avšak až začátkem 50. let s rozmachem pěstování řepky olejky po celém světě vzrostl její

význam (Buchwaldt, 2007). Ztráty na výnose mohou dosahovat 30 – 50 % (Maylandt and Bothe, 2009, Plachká, 2010), jsou způsobeny menším počtem zrn na rostlině, nižší hmotností tisíce semen a ztrátami v důsledku předčasného otevírání šešulí (Maylandt and Bothe, 2009).

3.4.2 Hostitelské spektrum

S. sclerotiorum (Lib.) de Bary (1884) je jedním z nejničivějších a nejrozšířenějších rostlinných patogenů (Purdy, 1979) a způsobuje bílou hnilobu na různých rostlinných druzích (Aghajani and Safaei, 2008). Napadá nejen dvouděložné plodiny jako jsou slunečnice, sója, řepka olejka, fazole, cizrna, hrách, čočka a rozmanitá zelenina, ale i jednoděložné druhy jako jsou cibule a tulipány (Boland and Hall, 1994).

Informace o citlivosti nekulturních druhů ke *S. sclerotiorum* jsou několikanásobně omezenější než o ekonomicky důležitých kulturních plodinách (Jensen *et al.*, 2008). V rámci epidemiologické studie v Iránu byly nalezeny symptomy bílé hniloby na plevelích v řepkovém poli. Deset druhů bylo nových pouze v této zemi, avšak u šesti druhů byla jejich náchylnost k bílé hnilobě potvrzena poprvé na světě. Jednalo se o druhy *Artemisia annua*, *Avena sterilis*, *Papaver pavonium*, *Poa annua*, *Rumex conglomeratus* a *Urtica dioica* (Aghajani and Safaei, 2008). Garibaldi *et al.* (2007) poprvé celosvětově potvrdili *Oreganum vulgare* jako nový hostitelský druh.

Purdy (1979) uvádí, že *S. sclerotiorum* napadá 361 rostlinných druhů z 225 rodů a 64 rostlinných čeledí. Ovšem další výzkum z roku 1994 potvrdil další nárůst hostitelského spektra tohoto patogena na 408 druzích ze 278 rodů a 75 čeledí. Většina z nich náleží do dvouděložných rostlin (Boland and Hall, 1994). Většina druhů náchylných k nekrotrofnímu patogenu *S. sclerotiorum* náleží do čeledi *Solanaceae*, *Brassicaceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Chenopodiaceae* a *Fabaceae* (Willetts and Wong, 1980).

3.4.3 Rozmnožování a šíření

Houba přežívá v půdě ve formě sklerocií (Buchwaldt, 2007). Sklerocia jsou tmavě nepravidelně zvrásněné útvary, které jsou uvnitř bílé až narůžovělé (Buchwaldt, 2007). Jejich velikost je velmi variabilní v závislosti na hostitelské rostlině. U slunečnice může být 1 cm silné a přes 35 cm dlouhé, naproti tomu u fazolí jsou sklerocia kulovitá 2 – 10 mm velká (Bolton *et al.*, 2006). Sklerocia hrají hlavní roli v životním cyklu choroby – produkují inokulum a jsou formou pro dlouhodobé přežití patogena (Willetts and Wong, 1980). Sklerocia mohou být v půdě vitální až 8 let (Adams and Ayers, 1979).

Sklerocia vytváří buď mycelium nebo apothecia, záleží na podmínkách vnějšího prostředí. Sklerocia klíčící rovnou ve formě mycelia produkují hyfy, které mohou přímo napadat rostlinné pletivo (Bardin and Huang, 2001; Le Turneau, 1979). Hyfy tvořící bílé až světle hnědé, vatovité mycelium jsou hyalinní, přehrádkované, rozvětvené a mnohoaderné (Kohn, 1979).

Obrázek č. 1: Sklerocia ve stonku řepky olejky (zdroj: archiv SPZO)

Obrázek č. 2: Apothecia vyrůstající ze sklerocia (převzato podle: alfieisb.blogspot.com)



Infekce původcem a zároveň rozrůstání mycelia je maximalizována přítomností volné vody na povrchu rostlin (Bolland and Hall, 1994; Abawi and Grogan, 1975). Vnější vlivy podmiňující tvorbu apothecií ze sklerocií, zahrnují půdní teplotu (Huang and Kozub, 1989) a půdní vlhkost (Morrall, 1979).

Sklerocia k tvorbě apothecií vyžadují půdní vodní potenciál 100 kPa po 1 – 2 týdny při teplotách 10 – 25 °C (Clarkson *et al.*, 2004). Apothecia obvykle nejsou produkována, dokud se nezavřou okvětní plátky, neboť zastínění pomáhá udržovat půdní vlhkost. Půdní vlhkost je kritický faktor v produkci apothecií a je jedním z hlavních důvodů, proč původci chorob šířených askosporami jsou propojeni se zavlažováním nebo obdobím vysokých srážek (Bolton *et al.*, 2006).

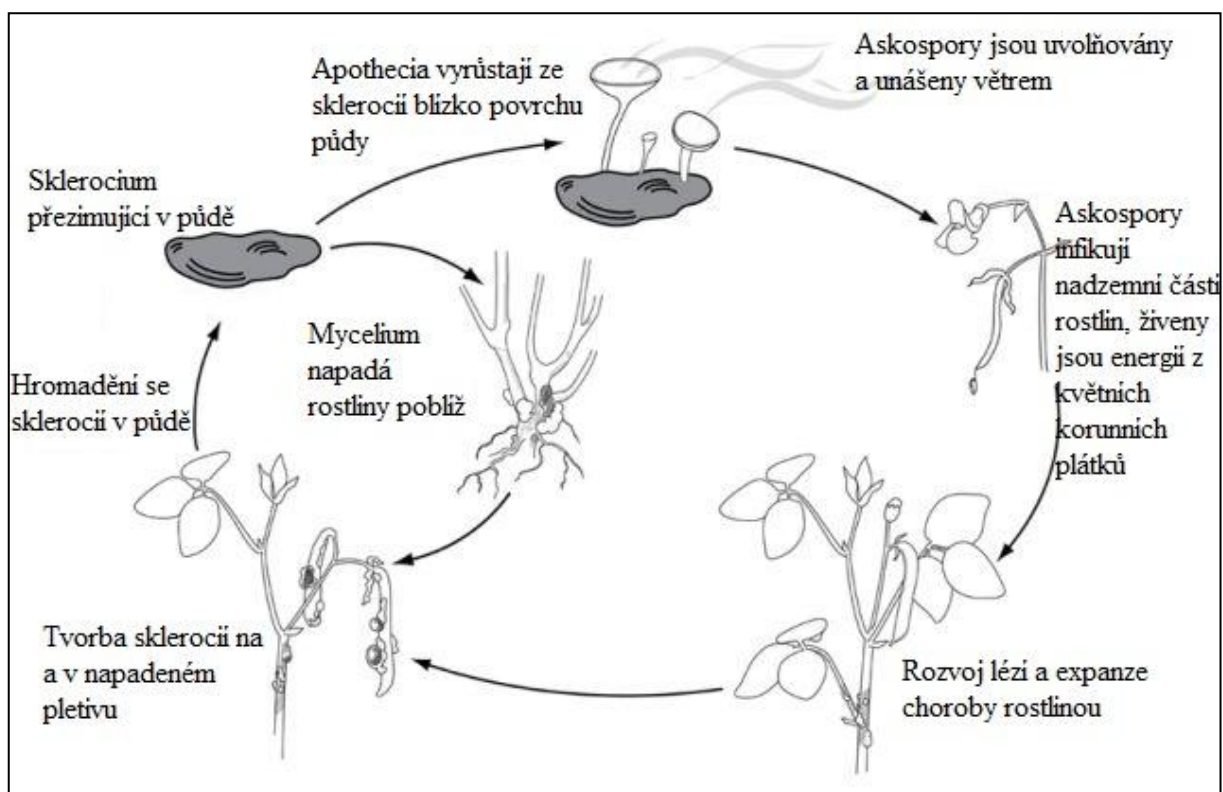
Apothecia vyrůstající ze sklerocií jsou malé plodničky, které následně produkují a uvolňují do vzduchu askospory a ty následně infikují nadzemní části hostitelských rostlin (Kohn, 1979b). Infekce vrcholí v období kvetení, kdy askospory uvolňované z apothecií ulpívají na okvětních plátcích řepky, které jsou po opadu a zachycení na rostlinách zdrojem výživy pro klíčící askospory (Hoffman and Schmutterer, 1999).

3.4.4 Životní cyklus choroby

Sklerocia přežívající v půdě dříve infikují rostliny a jsou primárním zdrojem inokula. Osivo kontaminované sklerocií může zavléci bílou hnilobu na dosud zdravé pozemky (Buchwaldt, 2007).

Extracelulární bílkoviny vylučované *S. Sclerotiorum* jsou schopny rozkládat komponenty buněčných stěn hostitelských rostlin, a rozrušovat tak rostlinná pletiva (Riou *et al.*, 1991). Infekce se šíří celou rostlinou a při vhodných podmínkách vytváří bílé mycelium. Nová sklerocia se tvoří ve stonku i zásobních orgánech a při vysoké vlhkosti i v myceliu vně napadené rostliny. Sklerocia se pak dostávají do půdy při kultivaci a mohou i po jistou dobu ještě vznikat na zaklopených rostlinných zbytcích (Buchwaldt, 2007).

Obrázek č. 3: Životní cyklus *S. sclerotiorum* bílé hniloby, (převzato podle www.apsnet.org)



3.4.5 Příznaky na rostlině

Vzhledem k širokému spektru hostitelských rostlin nejsou pro napadení *S. sclerotiorum* žádné unikátní symptomy, které by měly všechny rostliny napadené tímto patogenem společné (Bolton *et al.*, 2006). Obvyklé jsou vodou nasáklé nepravidelné skvrny na plodech, stoncích, listech nebo řapících. Zasažené oblasti jsou pokryty bílým vatovitým myceliem, které bývá

nejvíce zřejmým důkazem o napadení patogenem *S. sclerotiorum* (Fernando *et al.*, 2004; Bolton *et al.*, 2006).

Obrázek č. 4 a 5: Příznaky na rostlině (zdroj: archiv SPZO)



Léze na stoncích řepky bývají popelavě šedé až bělavé. Infekce postupuje k horním větvím až šešulím. V místě infekce se přeruší cévní svazky, což vede k vadnutí a následnému odumření rostliny. Sklerocia se tvoří na nebo ve stonku (Martens *et al.*, 1994).

3.4.6 Ochrana

Významným faktorem ovlivňujícím šíření chorob polních plodin je způsob zpracování půdy v kombinaci s osevním postupem (Hýsek a kol., 2008). Mueller *et al.* (2002) uvádějí, že osevní postup nemá podstatný vliv na rozmístění sklerocií v půdním profilu nebo na výskyt bílé hniloby, ale že ovlivňuje počet vyklíčených apothecií a výnos plodiny. Jejich výzkum dokládá, že při orebném zpracování půdy se oddálí objevení se apothecií na povrchu půdy. Gulya *et al.* (1997) doporučují minimálně 5-letou rotaci 2 nehostitelských plodin, jako nezbytnost ke snížení úrovně napadení pozemku.

Existují kulturní metody ke snižování napadení bílou hnilobou, jako např. moření osiva, rozšiřování řádků, snižování výsevků, solarizace půdy, osevní postup atd. Žádná však není tak efektivní k vyvinutí spolehlivé strategie v regulaci *S. sclerotiorum*. Uprostřed tohoto vědeckého rozvoje se několik parazitických hub jeví jako slibný nástroj pro eliminaci původce bílé hniloby. Houba *Coniothrium minitans* je komerčně prodávána jako přípravek Contans WG (Fernando *et al.*, 2004). Po aplikaci roztoku biologického Contans WG na půdu a jeho následném zapravení do hloubky 5 cm *C. minitans* napadá sklerocia *S. sclerotiorum* a rozrušuje sklerocia do 3 měsíců od aplikace (Luth, 2001). Úspěch biopreparátu však záleží na

vnějších podmínkách, které podporují jeho šíření a úspěšnost infekce (Hannush and Bolland, 1996).

Proti *Sclerotinia sclerotiorum* lze foliárně aplikovat fungicidy. U řepky je nejlepší termín aplikace v plném květu, aby byla zajištěna ochrana v nejrizikovější době – infekce okvětních plátků (Buchwaldt, 2007). Protože žádná z komerčních odrůd řepky nemá plnou rezistenci vůči původci bílé hniloby (Bradley *et al.*, 2006a), je používání fungicidů primární metodou ochrany rostlin před napadením *S. sclerotiorum* (Bradley *et al.*, 2006b).

3.5 FOMOVÁ HNILOBA

3.5.1 Systém a původ

Soustava	<i>Vitae</i>	živé organismy
Doména	<i>Eukaryota</i> Whittaker & Margulis, 1978	jaderní
Nadříše	<i>Unikonta</i>	
	<i>Opisthokonta</i> Cavalier-Smith, 1987 b	
Říše	<i>Fungi</i> Whittaker, 1959	houby
Oddělení	<i>Ascomycota</i> Caval.-Sm.	houby vřeckovýtrusé
Podkmén	<i>Pezizomycotina</i> O. E. Erikss. & Winka	
Třída	<i>Dothideomycetes</i> O. E. Erikss. & Winka	
Podtřída	<i>Pleosporomycetidae</i>	
Řád	<i>Pleosporales</i>	zďovkotvaré
Čeleď	<i>Leptosphaeriaceae</i>	drobničkovité
Rod	<i>Leptosphaeria</i> Ces. & De Not.	drobnička
Druh	<i>Leptosphaeria maculans</i> (Desm.) Ces & De Not.	drobnička skvrnitá

(zdroj: www.biolib.cz)

Podle Naseri (2006), byl panem Todem v roce 1791 objeven v nekrotickém pletivu červeného zelí saprofytní organismus *Sphaeria lingam*. Ta samá houba byla objevena Desmazierem v roce 1849 na žijící rostlině kvěťáku a překlasifikována k rodu *Phoma*. Teleomorfa (pohlavní stádium) *Phoma lingam* byla označena jako *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. & De Not. (Tulasne and Tulasne, 1863).

V minulosti byla popsána řada patogenů rodu *Leptosphaeria*, která se rozvíjela na rostlinách z čeledi brukvovitých a postupně byly popsány jako samostatné druhy (Rouxel and Balesdent, 2005).

Izoláty *Leptosphaeria* spp. z řepky a zelí byly rozděleny na agresivní a slabě virulentní skupiny (Rimmer and van den Berg, 2007). Agresivní skupina bývá také označována jako Tox⁺ nebo jako skupina A. U slabě virulentní je to Tox⁰ a skupina B (Williams and Fitt, 1999). Izoláty z patotypu A byly následně ještě rozděleny na 4 podskupiny PG 1 – 4 (PG =

pathogenicity group = patogenní skupina, pozn. Škeříková), (Mengistu *et al.*, 1991). Patotyp B je také rozdělen na podtypy. Jedná se o skupiny NA 1 – 3 (NA = non-aggressive = neagresivní, pozn. Škeříková), (Koch *et al.*, 1991).

Somda (1997) naznačil hranice rodů, když objevil genetickou inkompatibilitu mezi skupinami A a B. Patotyp B – slabě virulentní byl později pojmenován jako *Leptosphaeria biglobosa* sp. nov (Shoemaker and Brun, 2001). Tento nový druh se od *L. maculans* odlišuje morfologií pseudoperithecií – nápadným zobáčkem na plodničce, který je na vrcholu rozšířený (Howlett *et al.*, 2001). V kultuře roste *L. maculans* mnohem pomaleji než *L. biglobosa*, která navíc v tekutém médiu produkuje žluto-hnědý pigment. Jsou zde odlišnosti v elektroforetických zymogramech některých enzymů, v polymorfismu DNA analyzované metodou RFLP a ve velikosti a počtu chromozomů (Rimmer *et al.*, 2007).

Obvyklé ztráty na výnosu se pohybují 5 – 10 %, ale mohou být až 50 % (Barbetti and Khangura, 1999; Khangura and MacLeod, 2011).

3.5.2 Hostitelské spektrum

Oba druhy, *L. maculans* i *L. biglobosa*, jsou celosvětově rozšířené. Pravděpodobnou příčinou je jejich přenos osivem řepky, řepice, zelí a dalších brukvovitých plodin (West *et al.*, 2001). Ve většině zdrojů se nerozlišuje, zda se jedná o *L. maculans* či o *L. biglobosa*, nebo na jaké plodině byl patogen identifikován. Případy, kdy se rozlišují *L. maculans* a *L. biglobosa*, jsou téměř vždy založené na charakteristikách kultur izolátů z ozimé řepky (Fitt *et al.*, 2006).

Ačkoli jsou oba druhy široce světově rozšířené, jsou náznaky, že *L. maculans* je v současné době druhem expandujícím na území, kde dříve byla jen *L. biglobosa*, jako například Polsko a centrální Kanada (Fitt *et al.*, 2008).

Fomová hniloba je ekonomicky důležitá choroba na řadě brukvovitých plodin jako jsou řepka olejka, tuřín, řepice, vodnice a zelí na semeno i jako zelenina. *Brassica juncea*, *B. nigra* a *B. carinata* jsou odolnější než ostatní z rodu *Brassica*, ale nejsou úplně imunní.

Fomová hniloba se objevuje i na plodinách a plevelích z jiných rodů, jako jsou *Sinapis*, *Raphanus*, *Descurainia*, *Sisymbrium* a *Thlaspi*, ale toto širší hostitelské spektrum není ještě dostatečně prozkoumáno (Rimmer and van den Berg, 2007).

3.5.3 Rozmnožování a šíření

Houba přežívá ve formě pyknid nebo pseudoperithécií na napadených semenech brukvovitých a na rostlinných zbytcích. Konidie jsou šířeny kapkami deště a askospory větrem (Williams, 1992).

Pyknidy *Phoma lingam* obsahují velké množství vodou šířitelných, jednobuněčných, hyalinních, cylindrických pyknidiospor o velikosti $3 - 5 \times 1,5 - 2 \mu\text{m}$, které jsou v hygroskopické želatinovité matrix (Williams, 1992).

Plodničky *L. maculans* rostoucí na rostlinných zbytcích jsou tvořeny pseudothécií s pseudosklerenchymatickou stěnou obklopený zčernalým pletivem hostitelské rostliny. Pseudothécia vyrůstající na rostlinných zbytcích mají pseudosklerenchymatické stěny obklopené zčernalým pletivem hostitelské rostliny. Pseudothécia jsou $300 - 500 \mu\text{m}$ velká, kulovitá a v dospělosti naplněna askosporami (Rimmer and van den Berg, 2007).

Vřečka jsou cylindrická, $15 - 22 \times 80 - 125 \mu\text{m}$ velká a askospory ($35 - 70 \times 5 - 8 \mu\text{m}$) jsou hyalinní, žluto hnědé, s 5 příhradkami a elipsovitého tvaru (Rimmer and van den Berg, 2007; Williams, 1992).

Obrázek č. 6: Vřečka obsahující přehrádkované askospory (převzato podle: www.genoscope.cns.fr)



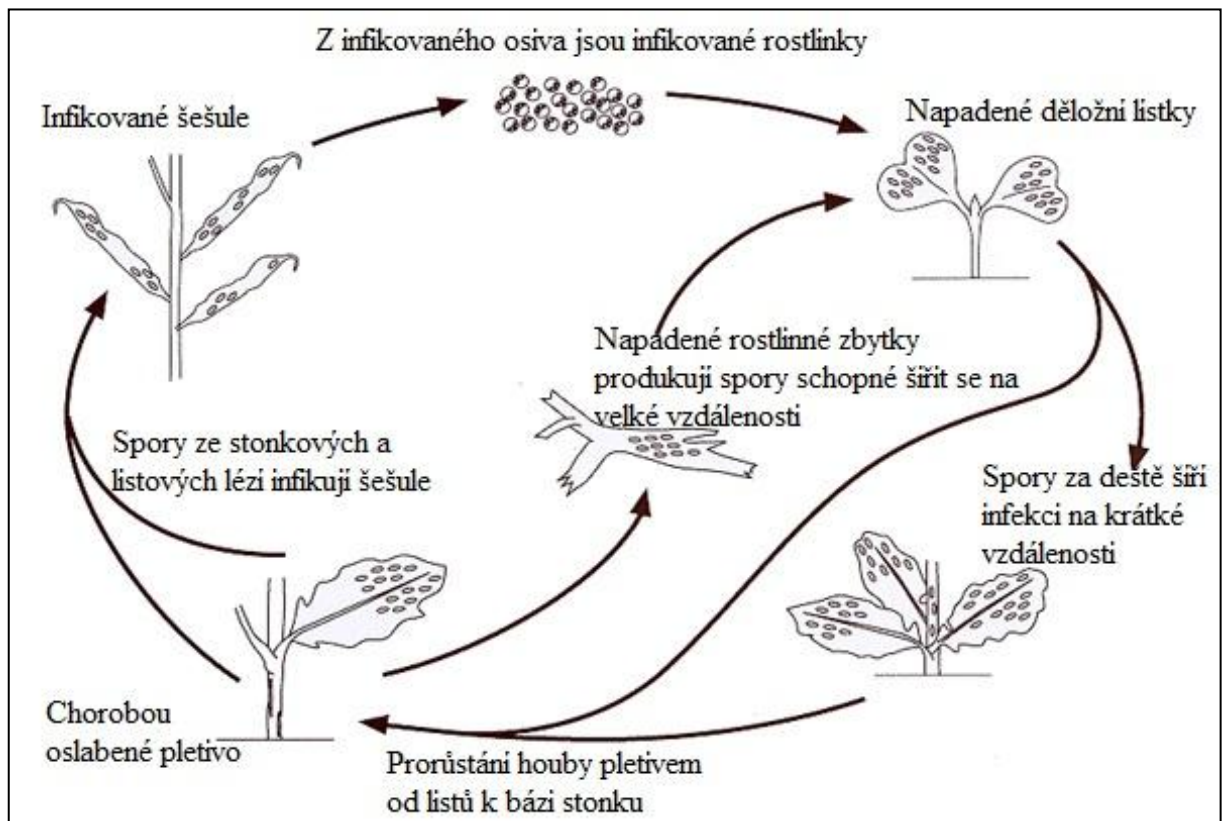
Jsou produkovány 2 typy pyknid – jeden na žijícím hostitelském pletivu a druhý na napadeném pletivu. První typ je $200 - 600 \mu\text{m}$ velký se stěnou až $18 \mu\text{m}$, kulovitý, černý s výrůstkem nebo krčkem. Pyknidy vyrůstající na napadeném pletivu jsou proměnlivého tvaru, $200 - 500 \mu\text{m}$, se stěnou až $50 \mu\text{m}$ tvořenou několika vrstvami tlustostěnných,

pseudosklerenchymatických buněk. Konidie pyknostry jsou hyalinní, většinou rovné, jednobuněčné (1, 2 – 2 x 3 – 5 μm), (Rimmerand van den Berg, 2007).

3.5.4 Životní cyklus

Epidemie fomové hniloby v brukvovitých plodinách jsou obvykle spojeny s infikovaným osivem, než s napadenými rostlinnými zbytky na poli (Rimmer and van den Berg, 2007). U řepky olejky jsou hlavním zdrojem inokula *L. maculans* rostlinné zbytky (Kazda a kol., 2010).

Obrázek č. 7: Životní cyklus fomové hniloby (převzato podle [www. http://www.agriculture.gov.sk.ca](http://www.agriculture.gov.sk.ca))



Leptosphaeria maculans žije saprofytsky na rostlinných zbytcích. Saprofytně může přežít až několik let. V tomto období se také pohlavně rozmnožuje, což vede k produkci askospor – primárního inokula. Tyto spory jsou produkovány v obrovském množství a mohou být větrem šířeny na vzdálenost až několika kilometrů (Rouxel and Balesdent, 2005).

Infekce rostlinek je výsledkem invaze *L. maculans* přes průduchy nebo poranění děložních nebo mladších lístků. Hyfy rostou mezibuněčnými prostory pletiva v biotrofním vztahu s buňkami brukvovitých. Posléze se však patogen stává nekrotrofním a v mrtvém

pletivu produkuje nepohlavní plodničky – pyknidy (Hammond nad Lewis, 1987). Tato fáze je odpovědná za poléhání rostlin a za výnosové ztráty (Rouxel and Balesdent, 2005).

Pyknidiospory, které jsou sekundárním inokulem, jsou deštěm rozstříkovány na okolní rostliny. Po celé vegetační období mohou být z rostlinných zbytků uvolňovány askospory, které způsobují léze na listech a stoncích (Hammond *et al.*, 1985).

Z celkové závažnosti choroby je sekundární infekce dešťovými kapkami méně významná než infekce askosporami. Zejména se to projevuje u jařin, kde je kratší vegetační doba. Pyknidy rostoucí na rostlinných reziduích zvyšují závažnost onemocnění u ozimých plodin (Rimmer and van den Berg, 2007). Ve východní Evropě jsou askospory uvolňovány od srpna do listopadu a jejich hlavní období je na jaře, po studené zimě (Jedryczka *et al.*, 1999). Brukvovité olejniny jsou k infekci nejnáchylnější v době od začátku klíčení po šestý pravý list (Rimmer and van den Berg, 2007).

3.5.5 Příznaky na rostlině

V raných fázích rozvoje choroby příznaky nemusí být vůbec patrné, protože může být napadených jen několik náhodných listů (Domiak-Olson *et al.*, 2009). Patogen napadá kořenový krček, korunu a všechny nadzemní části rostlin (Hall, 1992).

Na listech jsou okrouhlé až nepravidelné léze, které jsou ohraničené listovou žilnatinou. Jak léze stárnou, stávají se z žluto-béžových šedavé nekrotické, často s tmavým okrajem. Mohou se objevit pyknidy, které vypadají jako černé, přesně ohraničené tečky uprostřed lézí. V příznivých teplotních a vlhkostních podmínkách uvolňují růžové pyknidy (Rimmer and van den Berg, 2007).

Léze způsobené *L. maculans* se ze začátku objevují jako 1 – 2 cm velké popelavě zelené skvrny, které později získávají popelavě hnědou barvu. Obsahují také pyknidy. Někdy může dojít k popraskání až vypadnutí středu léze. *L. biglobosa* vytváří na listech menší a tmavší skvrny, které pyknidy buď neobsahují, nebo jich obsahuje jen velmi malé množství (Brun *et al.*, 1997; Ansan-Melayah *et al.*, 1997).

Hnědé až černé skvrny se také tvoří pod hypokotylem klíčících rostlinek a na stoncích starších rostlin během kvetení (West *et al.*, 2001). Často dochází ke zčernání xylému s velmi malým vnějším projevem (Rimmer and van den Berg, 2007).

Semena mohou být infikována původci choroby na šešulích. Infikovaná semena mohou být scvrklá a s barevnými změnami, mohou však také být bez viditelných příznaků (Rimmer and van den Berg, 2007).

Obrázek č. 8 a 9: Příznaky na rostlině (zdroj: archiv SPZO)



3.5.6 Ochrana

V zemích, kde původci fomové hniloby způsobují vážné epidemie, je rezistence proti *Leptosphaeria maculans* standardem při registraci nových odrůd řepky. Hodnocením vnitřních a vnějších kritérií se posuzuje míra rezistence (Fitt *et al.*, 2006). Šlechtění rezistentních odrůd je nejběžnějším a nejefektivnějším způsobem ochrany před napadením *L. maculans* (Delourne *et al.*, 2006).

Ve všech regionech je ke snížení nebezpečí infekce askosporami doporučován 4 letý osevní postup a zapravení posklizňových zbytků (West *et al.*, 2001).

Pro kontrolu fomové hniloby jsou používány různé kombinace fungicidního ošetření semen, půdy a rostlin. Jejich použití se odlišuje v závislosti na regionu, míře napadení a ekonomické návratnosti tohoto opatření (West *et al.*, 2001). Vzhledem k poměrně dlouhé době uvolňování askospor a relativně krátkodobé účinnosti fungicidu je však přínos fungicidního ošetření poměrně nejistý. Efektivní kontroly původce choroby lze dosáhnout při časování fungicidního ošetření dle předpovědí podle lapačů spór (Gladders *et al.*, 2006).

Ošetření semen systémovými fungicidy ničí inokulum patogena. Běžnou alternativou je ošetření semen horkou vodou (50 °C), do které se semena ponoří na 15 – 30 minut (Rimmer and van den Berg, 2007).

3.6 VERTICILIOVÉ VADNUTÍ

3.6.1 Systém a původ

Soustava	<i>Vitae</i>	živé organismy
Doména	<i>Eukaryota</i> Whittaker & Margulis, 1978	jaderní
Nadříše	<i>Unikonta</i>	
	<i>Opisthokonta</i> Cavalier-Smith, 1987 b	
Říše	<i>Fungi</i> Whittaker, 1959	houby
Oddělení	<i>Ascomycota</i> Caval.-Sm.	houby vřeckovýtrusé
Podkmen	<i>Pezizomycotina</i> O. E. Erikss. & Winka	
Třída	<i>Sordariomycetes</i>	
Podtřída	<i>Hypocreomycetidae</i>	
	<i>Hypocreomycetidae</i> incertae sedis	
Čeleď	Plectosphaerellaceae	
Rod	<i>Verticillium</i> Nees	přeslenatka
Druh	<i>Verticillium dahliae</i> Kleb.	

(zdroj: www.biolib.cz)

Zare (2003) uvádí, že rod *Verticillium* zavedl C. G. Nees von Esenbeck v roce 1816 pro saprofytickou houbu, kterou pojmenoval *Verticillium tenerum*. Mezi mnoha synonymy uváděnými pro tento druh je *Sporotrichum luteo-album* Link 1809 to nejstarší schválené dle Friese v roce 1832, což bylo zkombinováno ve *Verticillium luteo-album*.

Houby dříve řazené do rodu *Verticillium* jsou dnes nově klasifikovány jako samostatné rody *Pochonia* (parazité nematod a myxomykot), *Lecanicillium* (cizopasnici hub a hmyzu) a *Haptocillium* (přiživující se na volně žijících háďátkách). V rodu *Verticillium* je stále zařazeno 7 druhů – *V. albo-atrum*, *V. dahliae*, *V. longisporum*, *V. nigrescens*, *V. nubilum*, *V. tricorpus* a *V. theobromae* (Fahleson *et al.*, 2004).

Verticillium dahliae Kleb. (1913) bylo považováno za původce verticiliového vadnutí u brukvovitých. Později se ukázalo, že chorobu způsobuje jen jedna varieta, která byla pojmenována *Verticillium dahliae* var. *longisporum* Stark (1961), (Eastburn and Paul, 2007).

Zjištěné molekulární a morfologické diference mezi diploidním a haploidním kmenem *V. dahliae* byly uznány jako dostatečně velké, aby mohly být izoláty rozděleny na 2 samostatné druhy. Následně byl diploidní kmen popsán jako samostatný druh *V. longisporum* (Stark) Karapapa, Bainbridge & Heale (1997), (Karapapa *et al.*, 1997).

Barevné změny na kořenech komerčně pěstovaného křenu byly pozorovány již v roce 1895 v Německu. V roce 1931 se choroba objevila i ve Spojených státech amerických, kde byla vážným problémem v oblastech Illinois a Wisconsinu – způsobuje totiž průkazné zmenšení kořenu a snižuje jeho kvalitu (Eastburn and Paul, 2007). Verticiliové vadnutí na brukvovitých olejninách je ve Švédsku pozorováno přibližně 50 let. Od roku 1970 tento problém stále vzrůstá (Dixelius *et al.*, 2005).

V některých případech mohou být ztráty na výnosu způsobené verticiliovým vadnutím až 70 % (Koike *et al.*, 1994).

3.6.2 Hostitelské spektrum

Zástupci rodu *Verticillium* spp. jsou půdní patogeny způsobující v mírném a subtropickém pásmu choroby rostlin zvanou verticiliové vadnutí. Společně napadají asi 250 hostitelských druhů včetně ekonomicky důležitých plodin a stromů (Pegg and Brady, 2002). Napadají jak kulturní, tak volně rostoucí rostliny především z čeledi brukvovité, lilkovité, tykvovité, slézovité, růžovité a hvězdicovité (Eastburn and Paul, 2007). Obzvláště *V. dahliae* a *V. albo-atrum* napadají velké množství hostitelských druhů. *V. longisporum* má mnohem užší hostitelské spektrum, ale ve Švédsku je hlavním původcem verticiliového vadnutí olejnin (Dixelius *et al.*, 2005).

Johansson *et al.* (2005) ve svém výzkumu možných hostitelských druhů pro *Verticillium* spp. pozorovali rozvoj choroby na inokulovaném ovsu a citují i několik případů obilnin napadených původci verticiliového vadnutí. To dohromady znamená, že oves a další obilniny dosud nebyly brány v potaz jako možní překlenovací hostitelé patogenů rodu *Verticillium* spp. Je alarmující, že běžné plevely, jako hořčice rolní (*Sinapis arvensis*), heřmánkovec nevonný (*Matricaria inodora*) a další nežádoucí druhy v plodinách, mohou být také infikovány a mikrosklerocia se tvoří na vzdušných částech rostlin.

3.6.3 Rozmnožování a šíření

Popis choroby

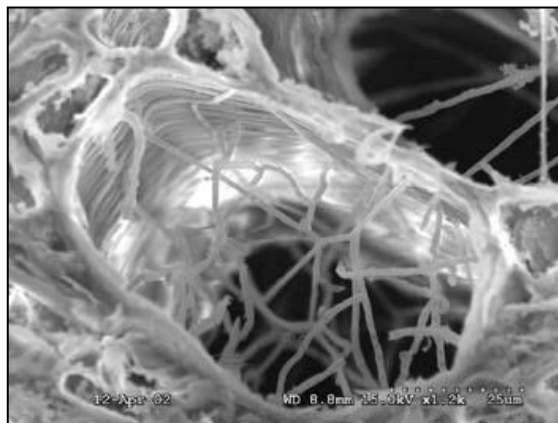
Rodový název *Verticillium* se odvozuje od morfologické struktury konidiofor. Konidiofory jsou rozvětvené a v některých úrovních v přeslenech (verticilliate disposition – přeslenité uspořádání, odtud i český název přeslenatka, poznámka Škeříková), (Johansson, 2006).

Zástupci *Verticillium* spp. vytváří mikrosklerocia, která jsou schopna přežít v půdě po několik let (Goicoechea, 2009). Důkladným skenováním mikrosklerocií pod mikroskopem byly zjištěny morfologické nestrovnalosti mezi *V. dahliae* a *V. longisporum*. Mikrosklerocia *V. longisporum* jsou nepravidelná, často s tmavými hyfami, zatímco mikrosklerocia *V. dahliae* jsou kulovitá až podlouhlá s hladkými okraji a tmavé hyfy obvykle chybí (Johansson *et al.*, 2006). Mikrosklerocia jsou tvořena shluky tmavě hnědých až černých cylindrických až elipsovitých hyfálních buněk ve velikosti od 15 až více než 50 μm v průměru (Eastburn and Paul, 2007). Mikrosklerocia obou druhů mají průměrnou plochu (délka x šířka) méně než 1275 μm^2 (Johansson *et al.*, 2006).

Mikrosklerocium při kontaktu s kořenovými exudáty začne klíčit (Mol and Scholte, 1995). Houba kořenem vnikne do rostliny a napadá hyfami xylém, šíří se a produkuje konidie, které se šíří cévními svazky. Konidie jsou zachytávány ve stěnách cév, kde začínají klíčit, a dochází k barevným změnám pletiva (Beckman, 1987).

Obrázek č 10: Konidiofor *Verticillium dahliae* (převzato podle www.iran-eng.com)

Obrázek č. 11: Konidie prorůstající cévní svazky (převzato podle www.oardc.ohio-state.edu)



Verticillium dahliae má konidie malé, kulovité, velké 3,5 – 6 μm , s obsahem DNA 0,028 – 0,042 pg. *Verticillium longisporum* má konidie podlouhlé, 6,5 – 12 μm velké a obsah

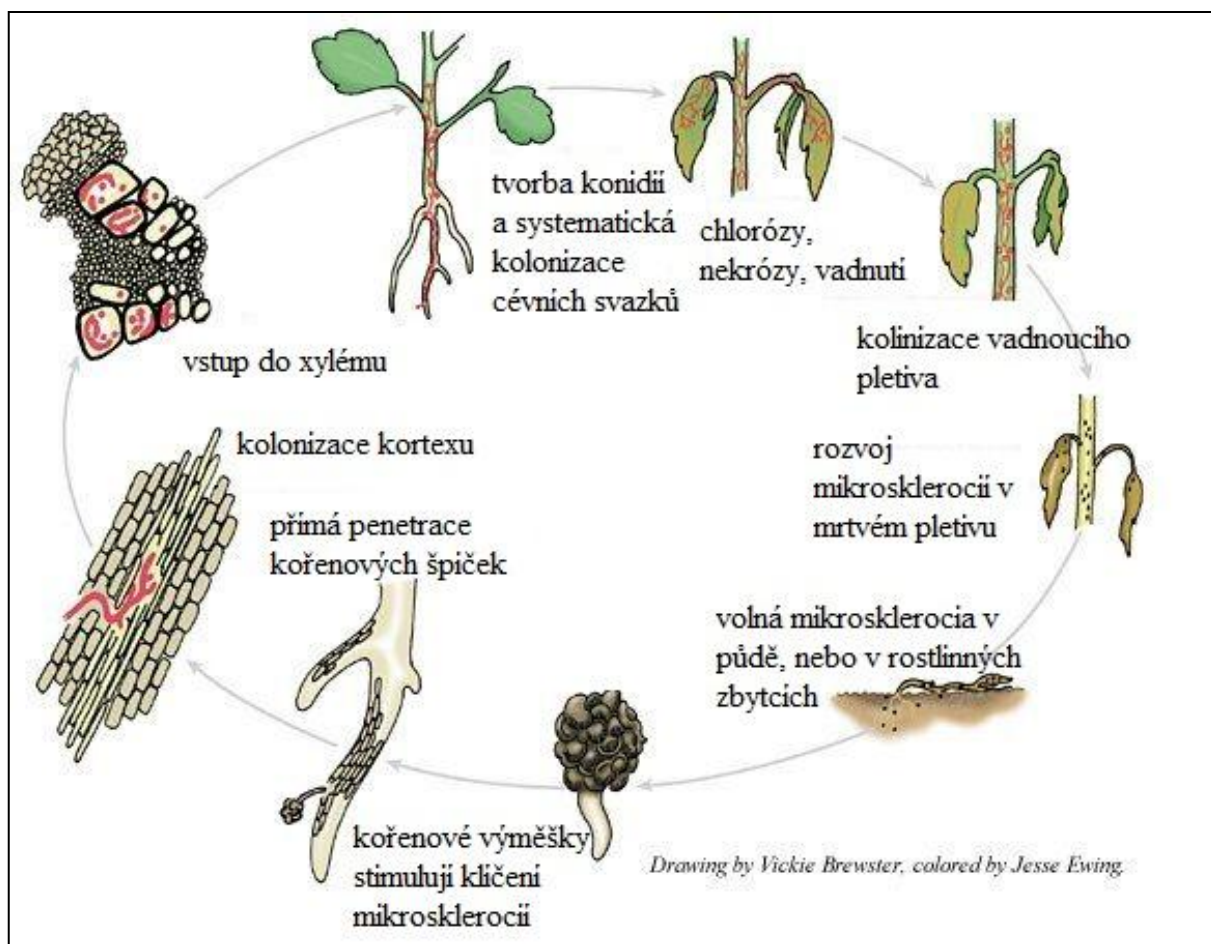
DNA je 0,035 – 0,076 pg (Karapapa *et al.*, 1997). DNA u *V. longisporum* je obvykle ve dvojnásobném množství než u ostatních kmenů (Stevenson *et al.*, 2002).

3.6.4 Životní cyklus původce choroby

Životní cykly *V. dahliae* a *V. longisporum* jsou totožné. Jejich mikrosklerocia jsou v půdě vitální a schopná infekce po několik let. Mycelium z těchto rozmnožovacích částic je hlavním zdrojem infekce kořenů mladých rostlin. Houba napadá kořeny přímo nebo přes poškození hád'átky, aj. a vstupuje do cévních svazků (Eastburn and Paul, 2007).

Proces infekce je rozdělen do dvou částí. Fáze determinace, která zahrnuje klíčení mikrosklerocií a vstup do rostliny (Mol and Scholte, 1995; Beckman, 1987). A v druhé fázi se jedná o prorůstání hyf rostlinou a produkce konidií (Beckman, 1987). Později začnou vadnout listy a patogen začne žít částečně saprofytický a v odumřelém parenchymu vyrůstají nová sklerocia (Schathorst, 1981; Neumann and Dobinson, 2003).

Obrázek č. 12: Životní cyklus verticiliového vadnutí (převzato podle www.apsnet.org)



3.6.5 Příznaky na rostlině

Symptomy verticiliového vadnutí se mohou objevovat na listech, stoncích, kořenech i plodech. Příznaky mohou být ovlivněny hostitelským druhem, stářím rostliny a přírodními podmínkami. Napadené rostliny jsou obvykle rozptýlené, někdy ve skupinách, ale někdy mohou být téměř všechny rostliny na poli více nebo méně infikované (Eastburn and Paul, 2007).

Řepka i řepice jsou napadány bez významných rozdílů mezi jarní a ozimou formou. Společné symptomy jsou chlorózy na postranních větvích nebo na listech (Dixelius *et al.*, 2005; Johansson, 2006). Později se objevují další chlorózy – obvykle na jedné straně a vadnutí rostliny (Johansson, 2006).

U řepky se první symptomy začínají objevovat v době kvetení. Zpočátku se jedná o jednostranné žloutnutí starších listů, které jsou později popelavě hnědé a suché. Charakteristické světle hnědé skvrny na jedné straně stonku poukazují na napadený xylém pod nimi. Později se pokožka odlupuje v malých prouzcích (Eastburn and Paul, 2007). Při provedení příčného řezu napadeným stonkem je možno u mnoha druhů pozorovat tmavě hnědý kruh (Beckman and Talboys, 1981). Báze stonků a kořeny se stanou tmavě šedé až černé, neboť produkují mikrosklerocia (Eastburn and Paul, 2007; Tsrer, 2011).

Obrázky č. 13 a 14: Příznaky na rostlině (zdroj: archiv SPZO)



Viditelné symptomy, objevující se na řepkovém poli, jsou obvykle nejednoznačné, a jsou proto obvykle považovány za normální projevy stárnutí rostlin. Příznaky, jako jsou tvorba mikrosklerocií, jsou v posledních letech hlášeny ze západní Canady i pro *Fusarium oxysporum* a *F. avenaceum* (Bailey *et al.*, 2003). Diagnostika verticiliového vadnutí na brukvovitých olejninách je velmi komplikovaná, obzvláště u ozimů brzy na jaře. Stonky na

sobě mají barevné změny jak kvůli *V. longisporum*, tak kvůli *Leptosphaeria maculans* (fomová hniloba), což ztěžuje jejich rozlišení (Kuusk *et al.*, 2002). Poškození larvami dřepčíka olejkového (*Psylloides chrysocephala*) může v některých letech znemožnit další diagnostikování verticiliového vadnutí (Zhou *et al.*, 2006).

3.6.6 Ochrana

Ochrana proti původcům verticiliovému vadnutí je složitá, neboť mikrosklerocia mohou v půdě přežívat 10 – 15 let (Wilhelm, 1955; Heale and Karapapa, 1999). Rané fáze rozvoje choroby probíhají v cévních svazcích rostlin (Schnathorst, 1981), což znemožňuje využití fungicidů k ochraně rostliny, aniž by došlo k jejímu usmrcení. Hlavním nástrojem kontroly původce verticiliového vadnutí je tedy snižování množství inokula v půdě (Debode *et al.*, 2005), osevní postup a odstraňování hostitelských plevelných druhů (Eastburn and Paul, 2007).

Proti půdním patogenům bylo běžné fumigovat půdu pomocí metyl bromidu a/nebo chloropikrinu. Další chemické sloučeniny, které se používají proti *Verticillium* spp. jsou fungicidní antibiotický aureofungin, z fungicidů benomyl, kaptan, karbendazim, thiram, azoxystrobin a trifloxystrobin a aktivátor rostlinné obranyschopnosti acibenzolar-S-methyl. Avšak potencionální nebezpečí jak pro životní prostředí, tak pro člověka, spojené s jejich používáním v boji proti původci verticiliovému vadnutí, nás nutí hledat alternativy k jejich nahrazení, nebo zlepšení jejich účinnosti (Goicoechea, 2009).

Nejsou známy komerčně prodávané kultivary brukvovitých s rezistencí vůči *Verticillium longisporum*, i přes to jsou známé difference v citlivosti jednotlivých druhů k původcům verticiliového vadnutí (Eastburn and Paul, 2007).

Jsou i některé nechemické alternativy v ochraně rostlin proti verticiliovému vadnutí – využívání rezistentních kultivarů, indukce rezistence, biologické metody a uplatňování správných zásad kontroly. Tyto způsoby mohou být využívány samostatně, nebo mohou být zařazeny v komplexním programu integrované ochrany (Goicoechea, 2009).

3.7 METODY DIAGNÓZY ROSTLINNÝCH POŠKOZENÍ

Kazda a kol. (2010) rozděluje metody diagnózy rostlinných poškození takto:

- **Metoda symptomatická** - určuje příčinu poškození rostliny podle viditelných příznaků. Jedná se o základní metodu, která je vhodná jako první krok téměř ve všech případech. Její předností je okamžité určení v porostu a je dostupná všem pěstitelům.
- **Metoda mikroskopická** – využívá charakteristických morfologických znaků původce poškození, popř. typických změn pletiv. Používá se u původců poškození, kteří nejsou pouhým okem viditelní (hád'átka, roztoči). Používá se buď přímo (řez rostlinným pletivem, přenesení původce z povrchu rostliny do preparátu) nebo v kombinaci s kultivací. V tomto případě je nejprve patogen izolován z rostlinných pletiv, kultura vyčištěna a teprve pak je používána k mikroskopické determinaci. Přímou mikroskopickou metodu lze v omezené míře použít i v polních podmínkách, nepřímou lze použít pouze v laboratoři se základním vybavením. Tato metoda je vhodná k určování drobných škůdců a některých fytopatogenních hub. Samostatnou část tvoří metoda elektronové mikroskopie, která je dostupná pouze v dostatečně vybavené laboratoři, používá se především ve virologii.
- **Metoda chemická a biochemická** - je založena na stanovení specifických vlastností jednotlivých organismů – původců chorob rostlin. Využívá se např. barvitelnosti jejich buněk, schopnosti rozkládat celulózu, produkovat antibiotika, apod. Použitelná je však pouze v laboratorních podmínkách. Používá se nejčastěji k determinaci fytopatogenních bakterií a některých hub.
- **Sérologické metody** – základem je reakce bílkovinných látek (séra, antiséra). Rozvinutou sérologickou metodou je ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Využívá stanovení pouze látek, které jsou specifické pro patogenní organismus nebo jeho metabolity. Tato metoda je vázaná na laboratoř se základním přístrojovým vybavením. ELISA je metoda využitelná pro praxi – je rychlá a spolehlivá. Užívá se pro determinaci virových a některých bakteriálních a houbových chorob.
- **Molekulární metoda** – polymerázová řetězová reakce. Je založena na zmnožení nukleové kyseliny, která nese genetickou informaci a její následné determinaci. Metoda je vysoce přesná, dostupná výhradně v dostatečně vybavené laboratoři. Její využití je pro stanovení virů, bakterií i hub.

3.8 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

Je metoda molekulární biologie pro enzymatickou replikaci DNA *in vitro* bez použití živých organismů. Jako templát se používá malé množství DNA, které je v průběhu cyklické reakce o třech teplotních fázích exponenciálně amplifikováno. Metoda PCR se obvykle používá v lékařských a biologických výzkumných laboratořích a příbuzných oborech pro diagnostiku dědičných a infekčních, určení otcovství, identifikaci genů v kriminalistice, klonování genů a další (Vlášková a Trešlová, 2008).

3.8.1 Izolace DNA

Prvním krokem při práci s nukleonovými kyselinami je jejich izolace v nativním stavu z přirozeného materiálu v dostatečném množství a čistotě. Nukleonové kyseliny je třeba zbavit všech látek, které se po lýze buněk nebo virových částic stávají součástí hrubých lyzátů a jejichž přítomnost by bránila účinnému a specifickému působení enzymů používaných k jejich analýze a úpravám (Rosypal, 2002). Metoda extrakce DNA závisí na typu buňky, ze které izolujeme, na požadované čistotě nukleové kyseliny a na požadovaném množství (Kittner, 2012).

Dle Bártové (2011) obecný postup izolace DNA probíhá v následujících krocích:

1. rozrušení buněk nebo virových kapsidů působením enzymů (lysozym, celulóza) a/nebo detergentů (dodecylsulfát sodný)
2. odstranění kontaminant pomocí enzymů (proteináza, RNAáza)
3. vlastní extrakce DNA - nejčastěji je používána fenol–chloroformová extrakce

Pro rozrušení buněčných stěn je vhodné použít inkubaci v tekutém dusíku a posléze tření v třecí misce nebo skleněném hmoždíčku. Materiál je homogenizován nejčastěji v pufru, který obsahuje chelatační činidlo (např. EDTA – etylendiamintetraoctová kyselina či její dvojsodná sůl) bránící degradaci nukleových kyselin přítomnými nukleázami. Lze také použít některý z komerčně dodávaných homogenizátorů. Pro rozdělení komplexu nukleová kyselina - protein se do reakční směsi přidává nějaký druh tenzidu – např. sodium dodecil sulfát (SDS) (Křemen a kol., 1998).

K oddělení DNA od proteinů se nejčastěji používají metody založené na fenolové extrakci, kdy je lyzát promíchán s roztokem fenolu, popřípadě směsí fenolu a chloroformu. Chloroform denaturuje proteiny, rozpouští tuky a napomáhá oddělení extrakční fáze od vodné fáze obsahující DNA (Rosypal, 2002). Po následné centrifugaci dojde k oddělení spodní

organické fáze tvořené fenolem (popř. směsí fenolu a chloroformu), mezifáze tvořené denaturovanými proteiny a zbytky buněk a horní vodné fáze v níž jsou rozpuštěny nukleové kyseliny (Rosypal, 2002). Posléze se vodní fáze ještě inkubuje s RNázou (Ovesná a Hodek, 2007). Z přečištěného vodného roztoku je možné nukleové kyseliny vysrážet přidáním koncentrovaného etanolu (Vlášková a Trešlová, 2008).

Vedle metod založených na extrakci fenolem se používají rovněž metody založené na vysolování proteinů a přečištění roztoku nukleových kyselin srážením etanolem nebo průchodem přes chromatografické kolony. Posledním krokem je stanovení koncentrace a čistoty nukleových kyselin (Rosypal, 2002).

K izolaci DNA je možné použít komerčně dodávané izolační soupravy (kity), které výrazně zjednodušují a urychlují postup získání DNA (Bártová, 2011). Izolační kity jsou založeny na principu kolonek využívajících silika membrány. DNA nebo RNA se váže k silika membráně, zatímco nečistoty přes ni procházejí při centrifugaci. Kity obsahují veškeré potřebné mikrozkmavky. Chemikálie jsou předpřipraveny a stabilní při pokojové teplotě (Anonym, 2012a).

DNA je možno uchovávat dlouhodobě buď precipitovanou v etanolu nebo zmraženou v dH₂O nebo TE pufru. (Mazáková, 2007, osobní sdělení).

3.8.2 Princip polymerázové řetězové reakce

Tuto metodu PCR (z anglického „polymerase chain reaction“) objevil americký biochemik Kary Mullis v roce 1983, v době, kdy pracoval jako vědec pro společnost Cetus Corporation. Za objevení metody PCR v roce 1993 obdržel Nobelovu cenu za chemii (Anonym, 2012b; Vlášková a Trešlová, 2008).

Pomocí této techniky může být rychle a vysoce efektivně namnožena konkrétní nukleotidová sekvence obsažená v jakékoliv DNA. PCR je založena na využití DNA-polymerázy pro opakované kopírování templátové molekuly DNA. Syntéza DNA je řízena krátkými oligonukleotidy (primery – krátkými úseky DNA komplementárními k vybranému úseku genomu), které se párují s templátovou DNA na počátku a konci amplifikovaného fragmentu, každý s jiným vláknem původní dvouřetězcové molekuly. Protože primery musí být chemicky syntetizovány, musíme znát alespoň začáteční a koncovou nukleotidovou sekvenci. Pomocí těchto primerů nasyntetizuje DNA-polymeráza obvykle několik miliard kopií požadované sekvence. PCR je velice citlivá metoda, která

umožňuje detekci jediné kopie DNA ve vzorku tím, že tuto sekvenci namnoží do té míry, že ji můžeme po separaci gelovou elektroforézou a obarvení snadno detekovat (Alberts a kol., 1998; Ovesná a Hodek, 2007).

Součástí reakční směsi – tzv. MasterMixu je:

- templátová DNA
- nukleotidy – stavební kameny DNA (dATP = deoxyadenosin trifosfát, dGTP = deoxyguanosin trifosfát, dTTP = deoxythimidin trifosfát, dCTP = deoxycytidin trifosfát)
- dva specifické primery (F a R) – oligonukleotidů o délce přibližně 20 bází nesoucí sekvenci komplementární k části DNA
- pracovní pufr s $MgCl_2$
- DNA polymerázy (Ovesná a Hodek, 2007).

Tyto termostabilní polymerázy, které se izolují z termostabilních organismů (např. *Tag*-polymeráza z *Thermus aquaticus*), odolávají teplotám, při nichž DNA denaturuje (Rosypal, 2002).

Reakce se provádějí v přístroji – termocykleru, v němž se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech, a to ve třech krocích:

1. denaturace dvouřetězcových molekul DNA
2. připojení primerů k odděleným DNA-řetězcům (annealing)
3. polymerační reakce (Rosypal, 2002).

PCR začíná s dvouřetězcovou DNA, a proto na začátku každého cyklu je třeba od sebe oddělit oba řetězce krátkým zvýšením teploty (Alberts a kol., 1998) na 94 – 96 °C po dobu 15 sekund až 2 minut (Křemen a kol., 1998). Po denuraci je reakční roztok ochlazen v přítomnosti velkého nadbytku primerů (Alberts a kol., 1998) na 30 – 65 °C na 30 – 60 sekund (Křemen a kol., 1998), a dochází tak k jejich připojení (annealingu) na obě komplementární sekvence DNA. V dalším kroku dochází k polymeraci (prodlužování, elongaci), kdy krátké úseky dvouvláknové DNA, vzniklé přichycením primerů, slouží jako startovací bloky pro enzym *Tag*-polymerázu. Tento enzym přidává nukleotidy

komplementárně ke vzoru při teplotě okolo 72 °C. Začíná vždy na 3' konci primeru. Na konci tohoto cyklu vznikají z originálního dvouvlákna dvě nové dvouvláknové DNA identické s originálem (Rosypal, 2002).

V dalších cyklech slouží i nově nasyntetizované molekuly DNA jako templát a během několika málo cyklů začnou v roztoku převažovat amplifikované molekuly ohraničené z obou stran primery. Obvykle se pro amplifikaci používá 20 – 30 cyklů, přičemž se v každém cyklu množství molekul oproti předcházejícímu cyklu zdvojnásobí (Alberts a kol., 1998).

Přesné hodnoty teploty a dobu trvání jednotlivých kroků je třeba optimalizovat podle délky amplifikovaného úseku DNA a konkrétní sekvence primerů (Rosypal, 2002).

3.8.3 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza patří v molekulární biologii k nejpoužívanějším separačním technikám při izolaci a analýze nukleových kyselin a proteinů. Tato technika byla vyvinuta na počátku 70. let 20. století a jejím principem je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli (Rosypal, 2002).

Elektroforetické gely používané pro separaci nukleových kyselin jsou nejčastěji tvořeny polyakrylamidem nebo agarózou, které vytvářejí složitou síťovitou strukturu polymerních molekul s póry, jejichž velikost lze ovlivnit složením roztoku a koncentrací polymeru (Rosypal, 2002).

Když je gel umístěn do elektrického pole, DNA se díky svému negativnímu náboji pohybuje směrem ke kladné elektrodě, přičemž dlouhé úseky DNA se pohybují pomaleji, protože jsou v hustém gelu více zpomalovány. Fragmenty se v gelu rozdělí za vzniku „žebříku“ z jednotlivých proužků tvořených molekulami DNA o stejné velikosti (Alberts a kol., 1998).

Délka doby elektroforetické separace je závislá na požadované délce migrace, protékajícím proudu, použitém pufru a koncentraci agarózy v gelu (Ovesná a Hodek, 2007).

Průběh a výsledek elektroforézy je sledován podle pohyblivosti přidaných barviv (Zouhar, 2003; Rosypal, 2002). Jako barvivo pro vizualizaci fragmentů nukleových kyselin lze použít ethidiumbromid (EB), který se váže mezi báze nukleových kyselin (Zouhar, 2003). Komplex DNA – ethidiumbromid po osvětlení ultrafialovým světlem červeně fluoreskuje.

Molekuly DNA o stejné velikosti jsou pak patrné jako proužky, jejichž intenzita záření je přímo úměrná koncentraci DNA (Rosypal, 2002).

3.8.4 Měření čistoty DNA

Měření koncentrace a čistoty DNA se provádí spektrofotometricky. DNA v roztoku absorbuje ultrafialové světlo v rozmezí 210 až 500 nm, s absorpčním maximem 260 nm. Změřením absorbance při vlnových délkách 260 a 280 nm se vypočítají poměry a koncentrace DNA. Optická hustota (absorbance) $\lambda_{260\text{nm}} = 1,0$ odpovídá 50 g dvouřetězcové DNA (Ovesná a Hodek, 2007).

Čistota izolované DNA A_{260}/A_{280} je vyhovující, pokud se pohybuje v rozmezí 1,7 – 1,9. Je-li čistota DNA $<1,2$ nebo $>2,1$, DNA se musí izolovat znovu. Její purifikace obvykle nepřináší dobré výsledky (Ovesná a Hodek, 2007).

4. MATERIÁL A METODY

4.1 ODBĚR VZORKŮ

Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin má po celé České republice pokusné poloprovozní porosty řepky olejky. Po sklizni těchto porostů bylo pracovníky Svazu odebíráno několik stonků rostlin i s kořeny. Odebrané vzorky byly posléze odeslány, nebo odvezeny na Katedru ochrany rostlin FAPPZ ČZU k dalším rozborům.

4.2 ZPRACOVÁNÍ ROSTLIN

Každé zpracovávané části rostliny byl přiřazen zjednodušený kód, ve kterém je obsaženo označení lokality, rok odběru, číslo rostliny a část rostliny, např. A₁/09/1/1.

Označení lokality (A₁/09/1/1) písmeno a číselný index. Ten je zde pro případ, že v daném roce byly odebrány vzorky z více lokalit, než je písmen v abecedě, další vzorky mají pak index 2, 3, ...)

Rok odběru vzorku (A₁/09/1/1). Vzorky byly odebírány po sklizních 2009 a 2010.

Číslo rostliny (A₁/09/1/1). Obvykle bylo odebíráno 5 rostlin.

Část rostliny (A₁/09/1/1). Kdy 1 je označení kořene, 2 kořenového krčku, 3 pro prvních cca 5 cm stonku a 4 pro dalších přibližně 5 cm stonku. Délka zpracování stonku závisela na jeho tloušťce. U mocnějších stonků stačilo zpracovat kratší část pro získání stejného množství hmoty.

Pomůcky: filtrační papír, nůžky Fiskars, 2 ks kádinek 0,5 l, malá kádinka, laboratorní lžička, kahan, mikrozkuhavky, popisovač Bel-pen, kulový mlýn s příslušenstvím, ultrazvukový čistič, denaturovaný líh, destilovaná voda.

Rostlinný materiál byl zpracován tak, že jednotlivé části rostliny byly nastříhány na filtrační papíry. Před každou částí bylo nutné omýt nůžky v denaturovaném lihu a poté v destilované vodě (obě látky jsou v 0,5 l kádinkách), aby nedošlo k přenosu patogena z jedné části rostliny na druhou. Nastříhaný rostlinný materiál byl poté přesypán do válečku kulového mlýna a uzavřen. Vzorek byl třepán na kulovém mlýnu Retsch MM 301 po dobu 2 minut při frekvenci 30 vibrací za sekundu. Homogenizovaný rostlinný materiál byl laboratorní lžičkou převeden do mikrozkuhavky a popsán. Lžička byla před každým nabráním sterilizována

v denaturovaném lihu a posléze opálena nad kahanem. Příslušenství kulového mlýna – třepací váleček, kulička a těsnění bylo po každém vzorku potřeba vložit na 5 minut do ultrazvukové lázně a následným opláchnutím v destilované vodě, sterilizovat. Před dalším zpracováním byly mikrozkuhavky ukládány do -20 °C.

4.3 IZOLACE DNA

Izolace DNA byla prováděna pomocí komerčního kitu GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit od společnosti Sigma – Aldrich.

Postup extrakce DNA byl dle pokynů výrobce kitu:

1. Třecí miska s tloučkem byla vymrzena tekutým dusíkem.
2. Cca 50 µg homogenizovaného rostlinného materiálu bylo vloženo do vychlazené třecí misky, zalito tekutým dusíkem a rozetřeno. Tímto by mělo dojít k rozrušení buněčných stěn.
3. K vzorku bylo připipetováno 450 µl Lysis solution Part A a opět byl vzorek homogenizován.
4. Vzorek byl převeden do mikrozkuhavky a bylo k němu připipetováno 50 µl Lysis solution Part B.
5. Mikrozkuhavka byla promíchána 5x obracením v ruce.
6. Vzorek byl inkubován 10 minut v Thermoblocku při 65 °C. Během inkubace je nutno vzorek 2x – 3x promíchat.
7. K vzorku bylo připipetováno 130 µl Precipitation solution a vzorek byl promíchán. Vzorek byl poté vložen na 5 minut do ledové tříště.
8. Vychlazené mikrozkuhavky se vzorky byly odstředovány po dobu 5 minut při 12 000 x g.
9. Supernatant (tekutá frakce) byl přepipetován do filtrační kolonky GenElute Filtration Column a odstředěn 1 minutu při 12 000 x g.
10. Filtrační kolonka byla odstraněna a k filtrátu na dně mikrozkuhavky bylo připipetováno 700 µl Binding solution a obsah mikrozkuhavky byl promíchán.

11. Do kolonky pro izolaci DNA bylo napipetováno 500 μ l Column preparation a dále probíhalo odstředění 1 minutu při 12 000 x g. Tímto krokem došlo ke kladnému nabití kolonky, aby mohla zachytit záporně nabité molekuly DNA. Filtrát byl vylit do výlevky.
12. 700 μ l filtrátu z filtrační kolonky bylo přepipetováno do kolonky pro izolaci DNA a 1 minutu odstředováno při 12 000 x g.
13. Filtrát je možno vylít a do filtrační kolonky v mikrozkuhavce pro izolaci DNA je přepipetován zbytek filtrátu z filtrační kolonky. Vzorek byl odstředěn 1 minutu při 12 000 x g.
14. Filtrační kolonka byla přenesena do nové mikrozkuhavky a bylo do ní napipetováno 500 μ l promývacího roztoku Wash. Vzorek byl odstředěn 1 minutu při 12 000 x g.
15. Filtrát byl vylit z mikrozkuhavky a do kolonky bylo opět napipetováno 500 μ l promývacího roztoku Wash. Vzorek byl opět odstředěn 1 minutu při 12 000 x g.
16. Filtrát byl opět vylit z mikrozkuhavky a vzorek byl odstředován při 12 000 x g po dobu 3 minuty, aby došlo k vysušení filtru.
17. Vysušená kolonka pro izolaci DNA byla přemístěna do nové, sterilní mikrozkuhavky a bylo do ní napipetováno 100 μ l Elution buffer předeřátého na 65 °C.
18. Mikrozkuhavka byla 5 minut při pokojové teplotě inkubována a poté 3 minuty odstředována při 12 000 x g.
19. Filtrační kolonku bylo možné odstranit. DNA z filtru kolonky byla odstředěna na dno mikrozkuhavky.
20. Vzorek byl řádně popsán a umístěn do skladovacího boxu při teplotě – 20 °C.

4.4 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

Polymerázová řetězová reakce využívá exponenciálního zmnožení (amplifikace) fragmentů DNA, které jsou specifické pro daného patogena. Tato reakce byla provedena v mikrozkuhavkách v termocycleru MJ Research PTC – 200. DNA byla amplifikována

v prostředí MasterMixu. V 25 μ l roztoku v mikrozkušavce je 24 μ l MasterMix a 1 μ l vyizolovaná DNA.

Složení MasterMixu:

- 2,5 μ l pufru pro *Tag*-polymerázu (1x)
- 2,5 μ l MgCl₂ (2,5 mM)
- 0,25 μ l dNTP (0,25 mM)
- 0,4 μ l primer mixu (0,4 μ M)
- 0,2 μ l *Tag*-polymerázy (1 U)
- 18,15 μ l destilované H₂O

Sclerotinia sclerotiorum byla detekována podle sady primerů SSREV 5' - TGACATGGACTCAATACCAAGCTG – 3' a SSFWD 5' - GCTGCTCTCGGGGCCTTGTATGC – 3' (Freeman *et al.*, 2002).

Amplifikační program pro termocykler byl následující:

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	10 min	1 x
Denaturace	94 °C	0,5 min	30 x
Anelace	72 °C	0,5 min – 2 cykly	
	65 °C	0,5 min – 2 cykly	
Polymerace	72 °C	1 min	
Konečná polymerace	72 °C	10 min	1 x
Chlazení	4 °C	∞	

Detekce *Verticillium* spp. byla prováděna pomocí primerů DB19 párů bází 5' - CGGTGACATAATACTGAGAG - 3' a DB22 párů bází 5' - GACGATGCGGATTGAACGAA – 3' (Mercado-Blanco *et al.*, 2003, Collins *et al.*, 2005).

Reakce v termocyleru probíhala dle programu:

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	5 min	1 x
Denaturace	94 °C	1 min	30 x
Anelace	58 °C	0,5 min	
Polymerace	72 °C	1 min	
Konečná polymerace	72 °C	4 min	1 x
Chlazení	4 °C	∞	

Mahuku *et al.* (1996) navrhli primery pro amplifikaci úseku ribozomální DNA *Leptosphaeria maculans* i *L. biglobosa*. Pro *L. maculans* se jedná o sekvence HV17S 5'-CCCATTTTCAAAGCACTGCC – 3' a HV26C 5' - GAGTCCCAAGTGGAACAAACA – 3'. A pro *L. biglobosa* se jedná o primery WV17S 5' - CCCTTCTATCAGAGGATTGG – 3' a WV58C 5' - GCTGCGTTCTTCATCGATGC – 3'.

Pro oba tyto patogeny byl použit stejný reakční sled:

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95 °C	2 min	1 x
Denaturace	94 °C	1 min	30 x
Anelace	55 °C	0,5 min	
Polymerace	72 °C	1 min	
Konečná polymerace	72 °C	4 min	1 x
Chlazení	4 °C	∞	

4.5 ELEKTROFORETICKÁ SEPARACE

„PCR produkty“ byly separovány na 1% agarózovém gelu. Tento gel byl připravován vařením agarózy v TBE 1x pufru v Erlenmeyerově baňce. Po ochlazení na přibližně 40 °C bylo nutno tekutinu přelít do výrazně označené Erlenmeyerovy baňky. Výrazné značení odlišuje baňku již kontaminovanou ethidium bromidem. Posléze byl připipetován

ethidium bromid (1 mg/ml) v množství 0,05 objemového procenta gelu (tj. při objemu 100 ml gelu se pipetuje 50 µl ethidiumbromidu). Gel byl vlit do elektroforetické formy a ihned do něj byl vložen hřebínek pro vytvoření jamek. Gel byl ponechán 25 minut tuhnout.

Hřebínek byl vyjmut velmi opatrně, aby nebyly poškozeny jamky v gelu. Elektroforetická forma s gelem byla vložena do elektroforetické cely. Do elektroforetické cely je dolit TBE 1x pufr tak, aby gel byl zcela ponořen.

PCR produkty byly obarveny „Mass loading die“ (Fermentas) v poměru 5 : 1. Do první jamky bylo pipetováno 5 µl markeru „Massruler DNA ladder low range“ (Fermentas). Do dalších jamek bylo pipetováno po 5 µl PCR produktů. Do předposlední jamky v řadě byla pipetována tzv. pozitivní kontrola, která má indikovat bezchybnost postupu v případě, že všechny izolované vzorky jsou zdravé. Do poslední jamky byla pipetována tzv. negativní kontrola, která má prokázat, že v průběhu pracovního postupu nedošlo ke kontaminaci vzorků navzájem a všechny vzorky jsou na zkoumaného patogena pozitivní. Pro pozitivní kontrolu byla použita DNA z čisté kultury původce choroby. Jako negativní kontrola byla použita DNA ze zdravé rostliny řepky olejký.

Elektroforetické separování v agarózovém gelu probíhalo při napětí 60 V po dobu 50 minut. Přítomost úseků DNA bylo možno pozorovat na UV Transiluminátoru při vlnové délce 310 nm. Pomocí dokumentačního a analytického systému Bio – Imaging – Ingenius – Syngene a počítačového programu Genesnap bylo možno gely vyfotografovat.

4.6 MĚŘENÍ ČISTOTY DNA

Měření čistoty DNA bylo prováděno na základě měření absorbance při vlnových délkách 260 nm a 280 nm na spektrofotometrickém přístroji NanoDrop 2000 a výsledky vyhodnoceny jeho počítačovým programem. Označení vzorku bylo zapsáno do programu. Na čidlo bylo napipetováno 2 µl izolované DNA a vzorek byl proměřen. Mezi jednotlivými vzorky bylo třeba čidlo otřít.

4.7 VYHODNOCENÍ

Z elektroforeogramů byla vyhodnocena přítomnost jednotlivých patogenů na zkoumaných lokalitách. Ukázka elektroforeogramu je uvedena jako příloha č. 1. Z četností napadení jednotlivých částí rostlin byla pomocí analýzy rozptylu ve statistickém programu SPSS vypočítána průkaznost napadení částí rostliny jednotlivými patogeny.

5. VÝSLEDKY

Výsledková tabulka je pro svůj velký rozsah uvedena jako příloha č. 2. Vzorky byly dodány z pokusných ploch z 56 lokalit. Na přítomnost patogenů *Sclerotinia sclerotiorum* (v tabulce označeno jako SS) a *Verticillium* spp. (v tabulce označeno jako VD) byl testován rostlinný materiál z 35 odběrných míst. Původci fomové hniloby *Leptosphaeria maculans* (v tabulce označeno jako LM) a *Leptosphaeria biglobosa* (v tabulce označeno jako LB) byli zkoumáni u 52 lokalit. Čistota DNA nebyla zjišťována u všech vzorků, neboť některé vzorky již nebyly k dispozici.

V žádné lokalitě nebyla nalezena přítomnost patogenních organismů *Verticillium* spp. Statistické vyhodnocení nebylo tedy třeba provádět.

Opava – Chvalíkovice (N1/09/1-12/1-4). Z této lokality bylo testováno 12 rostlin. *S. sclerotiorum* byla prokázána v jedné rostlině v kořeni a kořenovém krčku. *L. maculans* byla detekována v jedné rostlině v kořenovém krčku. Napadení *L. biglobosou* bylo prokázáno v 9 rostlinách, a to 1x v kořeni, 9x v kořenovém krčku, 4x v první části stonku a 3x v druhé části stonku. Čistota DNA byla nevyhovující u jednoho vzorku.

Z odběrného místa Opava – předměstí (N2/09/1-4/1-4) byly testovány 4 rostliny. *Leptosphaeria maculans* nebyla prokázána v žádné, oproti tomu však *L. biglobosa* byla detekována ve všech rostlinách v kořenovém krčku a v první části stonku, v druhé části stonku jen ve 3 případech. *Sclerotinia sclerotiorum* byla evidována ve všech rostlinách od kořene po stonk 1.

Kujavy (N3/09/1-4/1-4) – dodány byly 4 rostliny. *L. maculans* byla detekována ve 3 rostlinách – 3x v kořenovém krčku, 2x ve stonku 1 a 3x na druhé části stonku. *L. biglobosa* byla prokázána u všech rostlin (2x kořen, 3x kořenový krček a na všech rostlinách v obou částech stonku).

Z lokality Slatiny (M1/09/1-3/1-4) byly dodány 3 rostliny. Na patogena *L. maculans* byly pozitivní dvě z nich – jedna celá a u druhé pouze kořenový krček a stonk 1. *L. biglobosa* byla nalezena ve všech 3 rostlinách. V kořeni byla detekována 1x, v kořenovém krčku a stonku 1 ve všech případech a ve stonku 2 2x. *Sclerotinia sclerotiorum* byla prokázána ve všech rostlinách 2x v kořeni a kořenovém krčku, 1x ve stonku 1 a 1x ve stonku 2.

Z České Třebové (L1/09/1-5/1-4) bylo dodáno 5 rostlin. Napadení *L. maculans* bylo prokázáno u všech rostlin, a to ve 3 kořenech, všech kořenových krčcích, na 3 stoncích 1 a na 4 stoncích 2. *L. biglobosa* byla detekována také u všech rostlin – 2x kořen, 5x kořenový krček, 2x stoněk 1 a 1x stoněk 2. Přítomnost *S. sclerotiorum* byla potvrzena ve 4 rostlinách (2x kořen, 1x kořenový krček a 2x stoněk 1).

Po 5 rostlinách bylo testováno i u odrůdy Labrador z České Třebové (L2/09/1-5/1-4). *L. biglobosa* byla pozitivní u kořenových krčků všech rostlin. Kořeny a stonky 2 však byly napadeny pouze ve 3 případech, stoněk 1 ve 4 případech. *L. maculans* byla potvrzena u 3 rostlin, a to v jedné celé, a dále v jednom kořeni, dvou kořenových krčcích a jednom stonku 2. U rostliny č. 5 nebyla měřena čistota DNA.

Ze stanice v Zubří (SA1//9/1-10/1-4) bylo dodáno 10 kusů rostlin. U 6 byla prokázána přítomnost *L. maculans* (2x v kořeni, 6x v kořenovém krčku, 1x ve stonku 1 a 1x ve stonku 2). *Sclerotinia sclerotiorum* byla detekována v jednom kořeni.

Z lokality Zubří – Háje (SA2/9/1-7/1-4) bylo od odrůdy Digger testováno 7 rostlin. Přítomnost *Leptosphaeria maculans* byla potvrzena u šesti z nich. Byla detekována na 4 kořenech, 6 kořenových krčcích, 4 stoncích 1 a 2 stoncích 2. *L. biglobosa* byla prokázána v 5 rostlinách u 4 kořenových krčků, 4 stonků 1 a 4 stonků 2. DNA nebyla vyhovující u jednoho vzorku.

V Zubří – Zašové (SA3/9/1-8/1-4) byla odebírána odrůda Ontario. Z osmi analyzovaných rostlin byla *L. maculans* potvrzena u 3 (1x kořen, 3x krček, 1x stoněk 1 a 2x stoněk 2) a *L. biglobosa* u 4 (1x krček, 2x stoněk 1 a 3x stoněk 2) rostlin.

Ze ZAS Koloveč (A1/09/1-5/1-4) bylo odebráno 5 rostlin odrůdy Atlantic. Rostlinné vzorky byly rozborovány pouze na přítomnost *Leptosphaeria maculans* a *L. biglobosa*. Napadení *L. biglobosa* bylo rozpoznáno ve dvou rostlinách na kořenových krčcích, jednou na stonku 1 a jednou ve stonku 2. *Sclerotinia sclerotiorum* a *Verticillium* spp. nebyly testovány (v tabulce jsou označeny jako „N“). Čistota DNA nebyla měřena.

Z lokality Bylany (B1/09/1-5/1-4) bylo testováno 5 rostlin odrůdy Ontario. *L. maculans* byla prokázána u 3 rostlin v četnosti 2 kořenové krčky, 3 stonky 1 a 3 stonky 2. Patogen *L. biglobosa* byl nalezen ve všech rostlinách (1x na kořeni, 4x na kořenovém krčku, 5x na stonku 1 a 3x na stonku 2). *Sclerotinia sclerotiorum* a *Verticillium* spp. nebyly testovány (v tabulce jsou označeny jako „N“). Čistota DNA nebyla měřena.

Další zkoumaný rostlinný materiál z Bylan (C1/09/1-5/1-4) bylo 5 rostlin odrůdy Baldur. Napadení *L. maculans* bylo určeno ve 4 rostlinách, a to v 1 kořeni, 3 kořenových krčcích, 4 stoncích 1 a 2 stoncích 2. *L. biglobosa* byla prokázána ve stoncích 1 u všech rostlin, dále 3x v kořenovém krčku a 3x v stonku 2. *Sclerotinia sclerotiorum* a *Verticillium* spp. nebyly testovány (v tabulce jsou označeny jako „N“). Čistota DNA nebyla měřena.

Slatiny (D1/09/1-5/1-4) - odrůda Ladoga. Z testovaných 5 rostlin byly v *L. maculans* pozitivní 4 (1x kořenový krček, 4x stoněk 1 a 3x stoněk 2). *L. biglobosa* byla detekována ve 2 rostlinách, v 2 kořenových krčcích a 2 stoncích 1 a jedné druhé části stonku. *Sclerotinia sclerotiorum* a *Verticillium* spp. nebyly testovány (v tabulce jsou označeny jako „N“). Čistota DNA nebyla měřena.

Z lokality Slatiny (E1/09/1-5/1-4) bylo dalších 5 testovaných rostlin. Na přítomnost *Leptosphaeria maculans* byly pozitivní 4 rostliny (3x kořenový krček, 4x stoněk 1 a 2x stoněk 2). Napadení patogenem *L. biglobosa* bylo prokázáno u 4 rostlin (2x v kořenovém krčku a 3x ve stonku 1). *Sclerotinia sclerotiorum* a *Verticillium* spp. nebyly testovány (v tabulce jsou označeny jako „N“). Čistota DNA nebyla měřena.

Ze Sychrova (F1/09/1-5/1-4) bylo zkoumáno 5 rostlin odrůdy Californium. Patogenní organismus *L. maculans* byl prokázán u všech analyzovaných stonků a ještě u 2 kořenových krčků. *L. biglobosa* byla určena pouze ve dvou rostlinách – 1x kořenový krček a 1x stoněk 1. *Sclerotinia sclerotiorum* a *Verticillium* spp. nebyly testovány (v tabulce jsou označeny jako „N“). Čistota DNA nebyla měřena.

Z odběrného místa v Dobroníně (G1/09/1-5/1-4) bylo odebráno 5 rostlin odrůdy Baros. Z analyzovaného materiálu byla *L. maculans* určena ve 2 rostlinách (2x kořenový krček a 2x stoněk 1). *L. biglobosa* byla ovšem pozitivní u všech rostlin ve stonku 1 a 3x v kořeni a stonku 2. *Sclerotinia sclerotiorum* a *Verticillium* spp. nebyly testovány (v tabulce jsou označeny jako „N“). Čistota DNA nebyla měřena.

Dalších 5 rostlin z Dobronína (H1/09/1-5/1-4) byla odrůda Baldur. *L. biglobosa* byla prokázána ve všech stoncích 1, 3x ve stonku 2 a 1x v kořeni. *Sclerotinia sclerotiorum* a *Verticillium* spp. nebyly testovány (v tabulce jsou označeny jako „N“). Čistota DNA nebyla měřena.

Vzorky Smilovy Hory (I1/09/1-5/1-4) - Ontario, Břilice (J1/09/1-5/1-4) – Asgard, Břilice (K1/09/1-5/1-4) – Ladoga - byly všechny po 5 zdravých rostlinách. *Sclerotinia*

sclerotiorum a *Verticillium* spp. nebyly testovány (v tabulce jsou označeny jako „N“). Čistota DNA nebyla měřena.

Z 5 rostlin odrůdy Ontario z Moutnice (S1/09/1-5/1-4) bylo na *L. maculans* pozitivní ve 3 případech (3x stonk 1 a 1x stonk 2). *L. biglobosa* byla přítomna ve 4 rostlinách – 2x v kořenovém krčku, 2x ve stonku 1 a 2x ve stonku 2. DNA byla nevyhovující z hlediska čistoty u jednoho vzorku.

Z lokality Moutnice (S2/09/1-5/1-4) bylo odebráno ještě 5 rostlin odrůdy Liprima. V analýze byla zjištěna přítomnost *L. maculans* i *L. biglobosa* ve všech rostlinách. *L. maculans* byla evidována na 3 kořenových krčcích, všech stoncích 1 a 2 stoncích 2. Absence *L. biglobosa* byla na kořenech a jednom kořenovém krčku. DNA měla nevhodnou kvalitu u 2 vzorků.

V Chorušicích (T1/09/1-5/1-4) došlo k odběru 5 rostlin odrůdy Asgard. Pozitivní detekce *L. maculans* byla u 4 rostlin, a to u 4 kořenových krčků a 2 stonků 2. *L. biglobosa* byla určena také ve 4 rostlinách (4x kořenovém krčku, 2x stonku 1 a 2x stonku 2). *Sclerotinia sclerotiorum* byla prokázána u všech kořenů, kořenových krčků a na 3 stoncích 1.

K odběru rostlinného materiálu v této lokalitě došlo ještě o týden později – Chorušice (T2/09/1-5/1-4). U těchto vzorků již bylo napadeno všech 5 rostlin *L. maculans* (2x kořen, 5x krček, 2x stonk 1 a 2x stonk 2) i *L. biglobosa* (1x kořen, 5x kořenový krček a 3x stonk 2). Avšak nebylo zde žádné napadení *S. sclerotiorum*.

Ze ZAS Koloveč (U1/09/1-5/1-4) analyzováno 5 rostlin odrůdy Ontario. Pozitivní nález z hlediska *L. maculans* i *L. biglobosa* byl u všech rostlin. *L. maculans* byla nalezena na 3 kořenových krčcích, 1 stonku 1 a 2 stoncích 2. *L. biglobosa* byla detekována na všech kořenových krčcích, ale jenom na 2 kořenech a 4x na obou částech stonku.

Na pozemku v Řisutech (V1/09/1-5/1-4) bylo při sklizni odebráno a následně analyzováno 5 rostlin. Napadení *L. maculans* bylo prokázáno ve 3 rostlinách, a to v jednom kořeni, 2 kořenových krčcích a jednom stonku 1. *L. biglobosa* byla vizualizována na 4 rostlinách (1x kořen, 4x kořenový krček, 3x obě části stonku). *Sclerotinia sclerotiorum* byla detekována ve 4 rostlinách s četností 3x kořen, 3x kořenový krček a 1x stonk 1. Jeden vzorek nevyhovoval čistotou DNA.

Ze Slověče (W1/09/1-5/1-4) bylo analyzováno 5 rostlin odrůdy Labrador. K pozitivnímu nálezu *L. maculans* došlo u všech rostlin - 1x na kořeni, 5x na kořenovém krčku, 3x na stonku 1 a 1x na stonku 2. *L. biglobosa* byla určena také ve všech rostlinách – shodně 1x v kořeni, 5x v kořenovém krčku a ve stonku 1 1x a stonku 2 3x. Čistota DNA nebyla vyhovující u 2 vzorků.

Z odběrného místa U Sloupu (X1/09/1-5/1-4) byly provedeny odběry 5 rostlin odrůdy Asgard. *L. maculans* byla potvrzena ve 4 rostlinách, a to 1x v kořeni, 3x v kořenovém krčku, 1x v stonku 1 a 2x v další části stonku. Patogenem *L. biglobosa* byly napadeny všechny testované rostliny (1x kořen, 4x kořenový krček, 4x stonok 1 a 3x stonok 2). V této lokalitě byla ve všech rostlinách detekována i *Sclerotinia sclerotiorum* – 1x na kořeni, 5x na kořenovém krčku a 3x na stonku 1. Požadovaná čistota DNA nebyla splněna u 3 vzorků.

Jako další odrůda z této lokality U Sloupu (Y1/09/1-5/1-4) bylo odebráno 5 rostlin řepky olejky odrůdy Asgard. *L. maculans* byla evidována pouze ve 2 rostlinách (2x na kořenovém krčku a 2x na stonku 2). Naproti tomu *L. biglobosa* byla potvrzena ve všech testovaných rostlinách v četnosti 1x kořen, 4x kořenový krček, 4x stonok 1 a 3x stonok 2. *Sclerotinia sclerotiorum* byla také detekována ve všech rostlinách – 1x v kořeni, 5x v kořenovém krčku a 3x na stonku 1. U jednoho vzorku nebyla vyhovující čistota DNA.

Po 5 rostlinách bylo analyzováno i z Dubé (SA1/10/1-5/1-4). Rostlina č. 2 neměla kořen (v tabulce „X“ prošklé políčko). Napadení *L. maculans* bylo zjištěno ve 4 rostlinách, kdy byly napadené 3 kořenové krčky a 3 stonky 1. Patogenní organismus *L. biglobosa* byl potvrzen ve všech zkoumaných rostlinách, mimo kořene a jednoho kořenového krčku byl napaden veškerý rostlinný materiál.

Z místa odběru ve Svěradicích (SA2/10/1-5/1-4) bylo k analýzám odebráno 5 rostlin. Testované rostliny byly bez kořenů (v tabulce „X“ prošklé políčko). *L. maculans* byla prokázána v jedné celé rostlině. Detekce *L. biglobosa* byla pozitivní u 4 rostlin (4x kořenový krček, 4x stonok jedna a 4x stonok 2). *S. sclerotiorum* byla detekována ve všech rostlinách, a to 4x v kořenovém krčku, 3x ve stonku 1 a 3x ve stonku 2. Dva izoláty neměly požadovanou čistotu DNA.

5 rostlin z Kasejovic (SA3/10/1-5/1-4) bylo také bez kořene (v tabulce „X“ prošklé políčko). Původce fomové hniloby *L. biglobosa* bylo možné pozorovat ve všech rostlinách,

a to 2x v kořenovém krčku, 4x ve stonku 1 a 3x ve stonku 2. *S. sclerotiorum* se vyskytovala ve všech analyzovaných rostlinných částech. DNA nebyla zcela vyhovující u jednoho vzorku.

Po 5 rostlinách z Uhlířských Janovic (SA4/10/1-5/1-4) bylo dodáno bez kořene (v tabulce „X“ prošklé políčko). U dvou kořenových krčků byl prokázán výskyt *L. maculans*. Ve 4 rostlinách byla evidována *L. biglobosa* (3x na kořenovém krčku a u jedné rostliny na obou stoncích). *Sclerotinia sclerotiorum* byla přítomna ve všech analyzovaných částech rostlin mimo jeden stonek 1.

Z Miličina (SA5/10/1-5/1-4) byly dodány 4 rostliny bez kořene (v tabulce „X“ prošklé políčko) a jedna celá. U 2 rostlin byla detekována *L. maculans*, 1x v kořenovém krčku a 1x ve stonku 2. Ve všech testovaných rostlinách byla prokázána přítomnost *L. biglobosa* (1x v kořeni, 3x v kořenovém krčku, 5x ve stonku 1 a 3x ve stonku 2). *Sclerotinia sclerotiorum* byla také určena ve všech analyzovaných rostlinách (3x v kořenovém krčku, 5x ve stonku 1 a 4x ve stonku 2).

V lokalitě Poříčí nad Sázavou (SA6/10/1-5-1-4) došlo také k odběru 5 rostlin bez kořene (v tabulce „X“ prošklé políčko). U 4 z nich byla nalezena *L. biglobosa* 2x v kořenovém krčku, 2x ve stonku 1 a 2x ve stonku 2.

Z Ovčín (SA7/10/1-5/1-4) bylo analyzováno 5 rostlin. Při testech byla určena v jedné rostlině v kořenovém krčku a stonku 2 *L. maculans*. Napadení *L. biglobosou* bylo patrné u všech rostlin v četnosti 3x kořenový krček, 4x stonek 1 a 3x stonek 2. Čistota DNA nebyla vyhovující u jednoho vzorku.

Z oblasti Krč (A1 – A20) v okrese Písek bylo dodáno po 5 rostlinách. Ve 2 rostlinách (2x stonek 1 a 1x stonek 2) bylo prokázáno napadení *L. maculans*. Patogen *L. biglobosa* byl evidován ve 4 rostlinách v četnostech 1x kořenový krček, 3x stonek 1 a 4x stonek 2. *Sclerotinia sclerotiorum* a *Verticillium* spp. nebyly testovány (v tabulce jsou označeny jako „N“). Čistota DNA nebyla měřena.

Testovaných rostlin z Kluk (B1 – B20) bylo 5. *L. biglobosa* byla vizualizována ve 4 rostlinách – 3x v kořenových krčcích, 3x v stoncích 1 a 1x v stonku 2. *Sclerotinia sclerotiorum* a *Verticillium* spp. nebyly testovány (v tabulce jsou označeny jako „N“). Čistota DNA nebyla měřena.

Ze Sudkova (C1 – C8) bylo dodáno po 4 zdravých stoncích bez kořene a kořenového krčku (v tabulce „X“ prošklé políčko). *Sclerotinia sclerotiorum* a *Verticillium* spp. nebyly testovány (v tabulce jsou označeny jako „N“). Čistota DNA nebyla měřena.

V Záhoří (D1 – D20) bylo odebráno 5 rostlin. Ve dvou případech byla detekována *L. biglobosa* (2x stonk 1). *Sclerotinia sclerotiorum* a *Verticillium* spp. nebyly testovány (v tabulce jsou označeny jako „N“). Čistota DNA nebyla měřena.

Pouze 3 zdravé rostliny byly dodány k analýzám z Budkova (E1 – E11). Jedna byla bez kořene (v tabulce „X“ prošklé políčko). *Sclerotinia sclerotiorum* a *Verticillium* spp. nebyly testovány (v tabulce jsou označeny jako „N“). Čistota DNA nebyla měřena.

Vzorky z Rapotína (G1 – G8) byly dodány ve formě 4 stonků bez kořene a kořenového krčku (v tabulce „X“ prošklé políčko). Na přítomnost patogena *L. biglobosa* byly pozitivní 2 rostliny (1x stonk 1 a 2x stonk 2). *Sclerotinia sclerotiorum* a *Verticillium* spp. nebyly testovány (v tabulce jsou označeny jako „N“). Čistota DNA nebyla měřena.

Ze Zábřehu (H1 – H8) bylo dodáno po 4 zdravých stoncích bez kořene a kořenového krčku (v tabulce „X“ prošklé políčko). *Sclerotinia sclerotiorum* a *Verticillium* spp. nebyly testovány (v tabulce jsou označeny jako „N“). Čistota DNA nebyla měřena.

Z odběrného místa v Dolních Studénkách (I1 – I10) bylo odebráno 5 stonků bez kořenů a kořenových krčků (v tabulce „X“ prošklé políčko). Ve dvou rostlinách byla nalezena DNA *L. biglobosa* (1x ve stonku 1 a 2x ve stonku 2). *Sclerotinia sclerotiorum* a *Verticillium* spp. nebyly testovány (v tabulce jsou označeny jako „N“). Čistota DNA nebyla měřena.

Vzorky z Pechovy Lhoty (J1 – J20) již byly kompletních 5 rostlin. Jeden stonk 2 byl napaden *L. maculans*. Na *L. biglobosa* byly pozitivní 2 rostliny 2x ve stonku 1 a jedna ve stonku 2. *Sclerotinia sclerotiorum* a *Verticillium* spp. nebyly testovány (v tabulce jsou označeny jako „N“). Čistota DNA nebyla měřena.

Ceta Kobeřice (O2/09/1-4/1-4) - odrůda Californium. Z testovaných 4 rostliny byla jedna v kořeni pozitivní na *L. maculans*. *L. biglobosa* byla detekována v obou částech stonků u 3 rostlin.

Z Kobeřic (O3/09/1/1-4) byl vzorek odrůdy Ladoga označený jako „zdravá rostlina“. V kořeni byla zjištěna *L. maculans*.

Z Kobeřic (O4/09/1-4/1-4) byly ještě další 4 rostliny odrůdy Ladoga. Původce fomové hniloby *L. maculans* byl odhalen u všech 4 rostlin (2x v kořeni, 2x v kořenovém krčku, 1x ve stonku 2). Tyto rostliny byly také napadeny *L. biglobosa* – 2x v kořeni, 2x v kořenovém krčku, 3x v stonku 1 a 2x v stonku 2.

Na lokalitě Smilovy Hory (P1/09/1-5/1-4) bylo odebráno 5 rostlin. *L. biglobosa* byla prokázána ve 4 rostlinách a to 3x ve stonku 1 a 3x ve stonku 2. *Sclerotinia sclerotiorum* byla určena na stejných 4 rostlinách ve 3 kořenech a 3 kořenových krčcích.

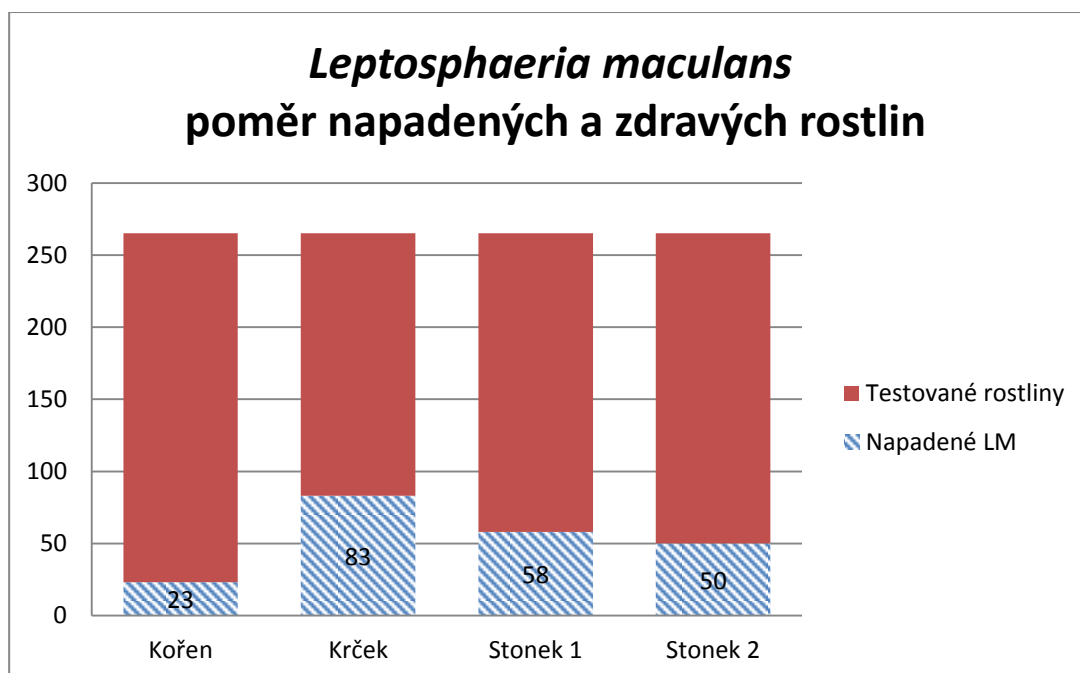
Šípy (Q1/09/1-4/1-4) bylo odběrné místo pro další 4 rostliny. *L. maculans* se projevila u jedné rostliny v kořeni a kořenovém krčku. *L. biglobosa* však byla detekována v 3 rostlinách – 2x v kořeni, 3x v kořenovém krčku a 1x ve stonku 1. DNA nebyla měřena.

5 rostlin odrůdy Liprima bylo odebráno ve Výčapech (R1/09/1-5/1-4). *L. maculans* byla vizualizována v jednom kořenovém krčku. *L. biglobosa* byla evidována ve 4 rostlinách 3x v kořenovém krčku, 3x ve stonku 1 a 4x ve stonku 2.

Další odrůda, která byla odebrána ve Výčapech (R2/09/1-5/1-4), bylo Cadeli. *L. maculans* byla, jako u předchozí odrůdy, zjištěna v jednom kořenovém krčku. Napadení patogenem *L. biglobosa* bylo zjištěno v 4 rostlinách (1x v kořenovém krčku, 3x a stonku 1 a 4x ve stonku 2). Kvalita DNA nebyla vyhovující u 2 vzorků.

Rostlinný materiál s označením SA4/09/1-7/1-4, SA7/09/1-5/1-4, SA6/09/1-2/1-4 a Q1/09/1-5/1-4 byl na KOR dodán bez označení lokality odběru. Vzorky byly testovány pouze na *Sclerotinia sclerotiorum* a na *Verticillium* spp. U SA7/09/1-5/1-4 byly patogenem *Sclerotinia sclerotiorum* napadeny všechny rostliny (4x kořen, 4x krček, 3x stonek 1). U vzorků SA6/09/1-2/1-4 byla *S. sclerotiorum* napadena jedna rostlina v kořeni a krčku. V této skupině vzorků měl jeden nevyhovující čistotu DNA.

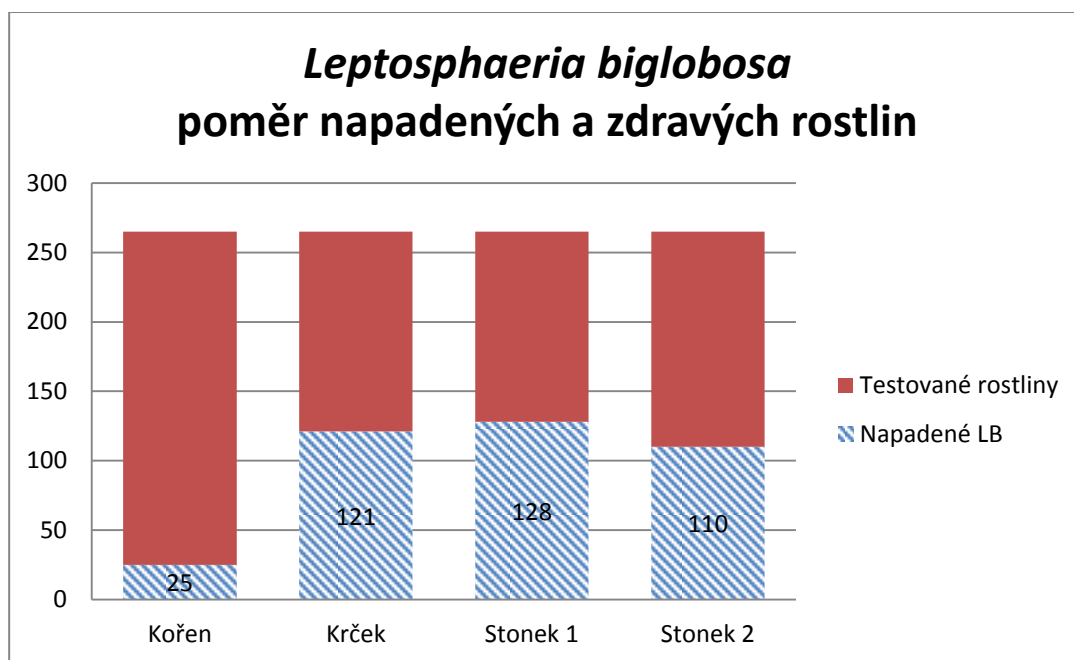
Graf 1: *Leptosphaeria maculans*, poměr napadených a zdravých rostlin



Na přítomnost patogenního organismu *Leptosphaeria maculans* bylo celkem testováno 265 rostlin z 52 lokalit. Napadení kořene rostlin bylo zjištěno ve 23 rostlinách. Infekce kořenového krčku byla zjištěna u 83 vzorků. Napadení jednotlivých částí stonků nebylo příliš rozdílné. Přítomnost patogena na první části stonku byla evidována v 58 případech a v druhé části stonku v 50 případech.

Ze statistického hodnocení s pravděpodobností na hladině významnosti α 95 % (viz příloha 3) vyplývá, že napadení kořene je statisticky průkazně nižší než napadení kořenového krčku a obou částí stonku. Míra napadení kořenového krčku je statisticky průkazně vyšší než u kořene a stonku. Rozdíly v napadení jednotlivých částí stonku mezi sebou se statisticky neliší, jsou zde však významné rozdíly od četnosti napadení kořene a kořenového krčku.

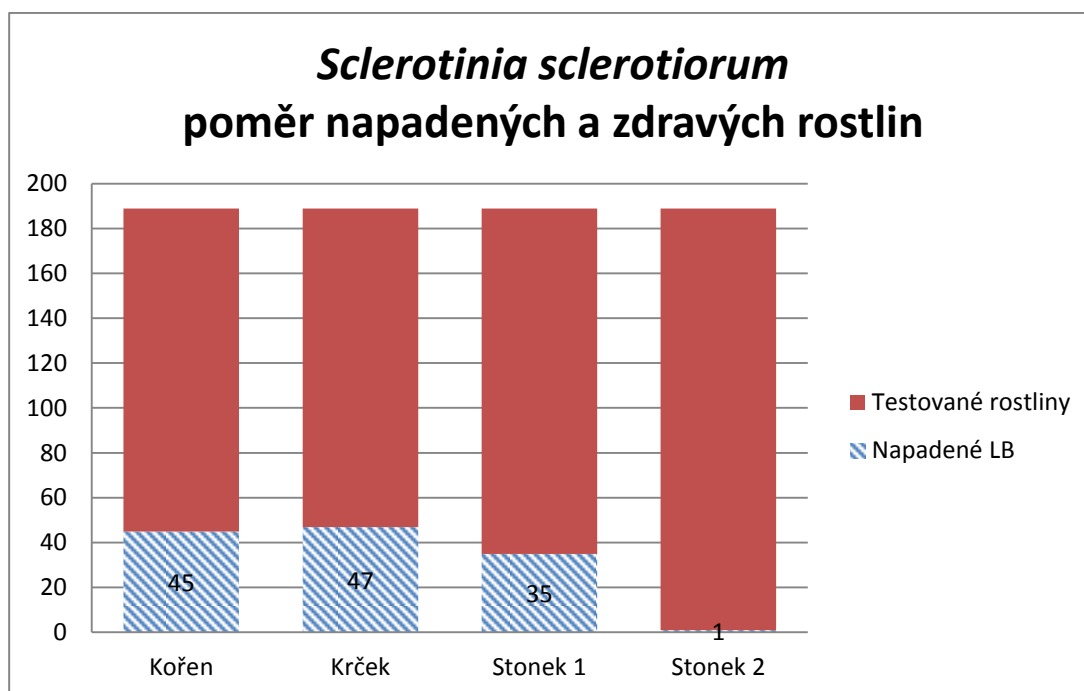
Graf 2: *Leptosphaeria biglobosa*, poměr napadených a zdravých rostlin



Na přítomnost původce fomové hniloby *Leptosphaeria biglobosa* bylo analyzováno také 265 rostlin. Přítomnost tohoto patogena byla ověřena u 25 kořenů, což je srovnatelné s *L. maculans*. Avšak oproti *L. maculans* došlo k obrovskému nárůstu pozitivních nálezů u kořenového krčku a obou částí stonků. *L. biglobosa* tak byla zjištěna ve 121 kořenových krčcích a velmi podobném počtu stonků 1 – u 128 vzorků. Ve stoncích 2 byla detekována o něco méně – u 110 vzorků.

Vyhodnocení programem SPSS s pravděpodobností na hladině významnosti α 95 % (příloha 3) prokázalo, že *L. biglobosa* napadá statisticky průkazně méně kořen, než ostatní části rostliny. Mezi intenzitou napadení kořenového krčku a 2 částmi stonku nejsou signifikantní rozdíly.

Graf 3: *Sclerotinia sclerotiorum*, poměr napadených a zdravých rostlin



Při analýzách napadení *Sclerotinia sclerotiorum* bylo zpracováno 184 rostlin. Kořen byl infikován ve 45 případech. Téměř stejné množství bylo infikovaných kořenových krčků – 47. V jednotlivých částech stonku byl patogenní organismus *S. sclerotiorum* detekován velmi rozdílně. V bázi stonku 35x a v dalších pěti cm pletiva již jenom jednou.

Statistické vyhodnocení (příloha 3) u tohoto patogena je s pravděpodobností na hladině významnosti α 95 % poměrně komplikované. Diference v intenzitě napadení kořene je statisticky průkazná v porovnání s kořenovým krčkem, avšak při porovnání se stonky je napadení sice vyšší, ale statisticky neprůkazné. Kořenový krček byl sice napaden nejčastěji, ale statisticky průkazný rozdíl je pouze mezi ním a stonkem 2. Bylo prokázáno statisticky průkazně vyšší napadení stonku 1 oproti stonku 2.

6. DISKUSE

U vzorků rostlin řepky olejky, odebraných pracovníky Svazu pěstitelů a zpracovatelů olejnin na 56 lokalitách, byla provedena analýza na přítomnost fytopatogenních organismů *Leptosphaeria maculans*, *Leptosphaeria biglobosa* (původci fomové hniloby), *Sclerotinia sclerotiorum* (původce bílé hniloby) a *Verticillium* spp. (původce verticiliového vadnutí).

Metodou PCR byla detekována přítomnost jednotlivých patogenů v pletivu kořene, kořenového krčku, cca 5 cm stonku u kořenového krčku (= stonek 1) a dalších cca 5 cm stonku (= stonek 2). Determinace patogenů na základě *in vitro* charakteristik není vždy spolehlivá. Využitím polymerázové řetězové reakce jsou nepřesnosti maximálně eliminovány.

6.1 FOMOVÁ HNILOBA

Původci fomové hniloby *Leptosphaeria maculans* a *L. biglobosa* byli dříve rozlišováni kultivací na agaru, avšak na pevném živném médiu se nedají spolehlivě rozlišit (Delwiche, 1980). Sippel and Hall (1995) uvádějí, že ani způsob kultivace na tekutém médiu, kdy by měla *L. biglobosa* tvořit hnědavý pigment, není 100% spolehlivý. A při zpracování většího množství vzorků nastane problém i náročnost na prostor a čas.

Pro diferenciaci *L. maculans* a *L. biglobosa* je tedy využití PCR obzvláště vhodné. K indikaci *L. maculans* byla použita sada primerů HV17S a HV17C (Mahuku *et al.*, 1996). Pomocí těchto primerů byla amplifikována, pro tohoto patogena specifická, oblast DNA o délce cca 400 bp (bp - base paar = párů bází, pozn. Škeříková). Napadení *L. biglobosa* bylo testováno sadou primerů WV17S a WV58C (Mahuku *et al.*, 1996). Díky nim proběhla amplifikace úseku ribozomální DNA o délce cca 230 bp.

Zjištěné četnosti napadení jednotlivých částí rostliny patogeny *L. maculans* i *L. biglobosa* korelují se způsobem rozmnožování a šíření tohoto organismu. Oba druhy saprofytně žijí na rostlinných zbytcích, kde produkují primární inokulum - větrem šířené askosporý. Sekundární inokulum jsou pyknidiosporý vznikající v pyknidách na nekrotických skvrnách listů. Pyknidiosporý jsou deštěm rozstřikovány na okolní rostliny (Hammond *et al.*, 1985; West *et al.*, 2001; Rouxel and Balesdent, 2005).

Skutečnosti, že houba neprodukuje v půdě mycelium, které by napadalo kořeny, odpovídají výsledky u obou organismů, kdy přítomnost *L. maculans* byla prokázána ve 23 případech a *L. biglobosa* ve 25 případech z 265 rostlin. Vyhodnocením analýzy rozptylu, bylo

potvrzeno, že tato četnost je s pravděpodobností na hladině významnosti α 95 % statisticky průkazně nižší než u ostatních analyzovaných částí rostlin. Infekce kořene je, dle mého názoru, způsobena infikovaným osivem.

U *L. biglobosa* dochází k rovnoměrnému napadení nadzemních částí rostliny, neboť mezi četnostmi napadení kořenového krčku, stonku 1 a stonku 2 nejsou statisticky průkazné rozdíly. Pro *L. maculans* rovněž platí statisticky nevýznamné rozdíly v napadení částí stonku, ale oproti *L. biglobosa* je zde diference ve statistické prokazatelnosti nejčetnějšího napadení kořenového krčku. Vzhledem k větší agresivitě patogena a statisticky průkazně častější infekci kořenového krčku, je přítomnost *L. maculans* v porostu závažnější.

Tabulka č. 1: West *et al.* (2001) charakterizuje rozšíření *L. maculans* a *L. biglobosa* ve světě:

Oblast	Patotyp	Metoda detekce	Počet vzorků
Austrálie	<i>L. maculans</i>	izolace z listových a stonkových lézí, následná identifikace pomocí PCR metody	
Západní Kanada	dříve <i>L. biglobosa</i> , 70. a 80. léta první zprávy o <i>L. maculans</i> , ta je dnes rozšířena ve většině oblasti	kultivace na živném médiu	
Kanada Ontario	70 % populace <i>L. maculans</i> , stonkové léze - pouze <i>L. maculans</i>	zkoumání stonků, listů, posklizňových zbytků, následná identifikace pomocí PCR metody	200
Západní Evropa	smíšená populace <i>L. maculans</i> a <i>L. biglobosa</i> , <i>L. maculans</i> je převládající druh, v průběhu vegetace stoupá procentické zastoupení <i>L. biglobosa</i>	izolace z listových a stonkových lézí, dále z posklizňových zbytků, následná identifikace pomocí PCR metody nebo kultivací	několik tisíc
Východní Evropa	<i>L. biglobosa</i> je více rozšířena, populace v Polsku je téměř jen <i>L. biglobosa</i>	izolace stonkových lézí a z posklizňových zbytků, identifikace kultivací, nebo PCR metodou	několik stovek
Čína	pouze <i>L. biglobosa</i>	izolace askospor z posklizňových zbytků	18

West *et al.* (2001) popisují rozšíření patogenních organismů *L. maculans* a *L. biglobosa* ve světě. Českou republiku bych porovnávala spíše s východní Evropou, kamžto West *et al.* (2001) zařadili i s námi sousedící Polsko. V celkovém součtu bylo z

analyzovaných 265 rostlin napadeno *L. maculans* 109 rostlin a *L. biglobosa* 180 rostlin. Což odpovídá tvrzení o větším rozšíření *L. biglobosa* na tomto území.

6.2 VERTICILIOVÉ VADNUTÍ

K detekci původců verticiliového vadnutí (*Verticillium* spp.) byla použita sada primerů DB19 a DB22 navržená Collinsem *et al.* (2005). Při jejich výzkumu byly použity ještě další specifické primery k rozlišení defoliantních a nedefoliantních patotypů. Pro účely této diplomové práce však bylo důležité pouze zjistit přítomnost patogena v rostlinném materiálu. V thermocycleru došlo k amplifikaci úseku DNA o délce přibližně 530 bp.

V České republice není verticiliové vadnutí ještě příliš rozšířeno (Kazda a Škeřík, 2008; Kazda a kol., 2010). Tomuto odpovídá i výsledek analýz, kdy přítomnost patogena *Verticillium* spp. nebyla nalezena v žádném zkoumaném rostlinném pletivu. Vzhledem k tomu, že plocha, na které se v České republice pěstuje řepka olejka, je velmi vysoká, a dochází tak k jejímu nevhodnému zařazování do osevního postupu, a že proti verticiliovému vadnutí stále není fungicid, který by s původcem choroby neusmrtil i hostitelskou rostlinu, je potřeba dbát na preventivní opatření a pravidelné monitorování *Verticillium* spp.

6.3 BÍLÁ HNILOBA

Detekce původce bílé hniloby *Sclerotinia sclerotiorum* kultivací na živném médiu je velmi jednoduchá, neboť po čase dojde, podobně jako na rostlinném pletivu, k vytvoření černých sklerocií. Časová náročnost, kdy na výsledky se může čekat až 14 dní, je dnes nevhodností tohoto postupu pro běžnou praxi.

Pro relativně rychlé zpracování, kdy již během jednoho pracovního dne je možné získat výsledky, je metoda PCR pro detekci *S. sclerotiorum* velmi vhodná. K amplifikaci specifické oblasti DNA byla použita sada primerů SSFWD a SSREV (Freeman *et al.*, 2002). S touto sadou je možno detekovat i velmi blízké druhy *Sclerotinia trifoliorum*, *S. minor* a *S. glacialis*. Tyto primery jiné další patogeny nedetekují. Při reakci byla namnožena sekvence DNA o délce cca 300 bp.

Před 30 lety Zvára (1981) o, tehdy ještě sklerotiniové hnilobě, napsal: „Vzhledem k malému významu choroby se ochrana neprovádí“. Dnes je bílá hniloba prakticky nejrozšířenější chorobou řepky olejky v České republice. Při celkovém hodnocení z testovaných 184 rostlin jich bylo na *S. sclerotiorum* pozitivních 59. Z tabulky č. 1 je však

evidentní, že až na 2 výjimky byly všechny odebrané rostliny z lokality buď zdravé, nebo byly minimálně 4 z 5 napadené alespoň ve dvou místech, což naznačuje určité zamoření pozemku.

Pokud ze sklerocia vyrostе v půdě mycelium, *Sclerotinia sclerotiorum* napadá kořeny a kořenový krček. Infekce nadzemních částí bývá pomocí askospor uvolňovaných apothecii vyrůstajícími ze sklerocií (Willems and Wong, 1980). V porovnání celkového počtu testovaných rostlin a napadených částí vyplývá nejčastější napadení kořene (45x) a kořenového krčku (47x), což by odpovídalo napadení myceliem. Analýza rozptylu však prokázala, že mezi těmito 2 částmi rostliny jsou statisticky průkazné rozdíly. Stonek 1 byl napaden 35x. Napadení stonku 2 bylo evidováno právě jednou. *S. sclerotiorum* zřejmě myceliem ze sklerocií napadla kořeny a kořenové krčky a prorostla ještě do stonku 1. Prakticky 100% absence patogena ve stonku 2 by se dala tedy vysvětlit tak, že na všech sledovaných lokalitách nebyly vhodné podmínky pro tvorbu apothecií, uvolňování askospor a následnou infekci nadzemní části rostliny.

7. ZÁVĚR

K detekci a determinaci nejdůležitějších fytopatogenních organismů řepky olejky byla použita metoda polymerázové řetězové reakce – PCR. Na základě vědecké literatury byly použity sady primerů, které amplifikovaly úseky DNA specifické pro patogeny *Leptosphaeria maculans*, *Leptosphaeria biglobosa*, *Sclerotinia sclerotiorum* a *Verticillium* spp.

Na přítomnost původců fomové hniloby *Leptosphaeria maculans* a *L. biglobosa* bylo testováno 265 rostlin z 52 lokalit.

Bylo prokázáno:

- Četnější napadení *L. biglobosa* než *L. maculans*. *L. biglobosa* byla evidována na 180 rostlinách a *L. maculans* na 109. rostlinách.
- Velmi podobné množství případů napadení kořene patogenem - *L. maculans* u 23 vzorků a *L. biglobosa* u 25 vzorků. V obou případech se jedná o statisticky průkazný rozdíl oproti ostatním, častěji napadaným částem rostliny.
- *L. maculans* statisticky průkazně infikovala častěji kořenový krček než kořen a stonky. Při porovnání míry napadení stonku 1 a stonku 2 nebyly statisticky průkazné rozdíly.
- Diference v počtu pozitivních nálezů *L. biglobosa* na kořenovém krčku a oběma částmi stonku není statisticky průkazná.

Na přítomnost *Sclerotinia sclerotiorum* a *Verticillium* spp. bylo analyzováno 184 rostlin z 35 lokalit.

Bylo prokázáno:

- 100% absence patogenních organismů *Verticillium* spp.
- Napadení *Sclerotinia sclerotiorum* u 59 rostlin.
- Statisticky významné rozdíly jsou mezi kořenem, který byl napaden 45x, a kořenovým krčkem, kde byla přítomnost *S. sclerotiorum* prokázána 47x.
- Druhá statisticky významně se lišící dvojice je stoněk 1, kde byl počet pozitivních nálezů 35, a stoněk 2, který byl infikován 1x.

- Dle programu SPSS nejsou ve skupinách kořen/stonek 2, kořen/stonek 1 a kořenový krček/stonek 1 signifikantní rozdíly.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- bp pár bází
- dH₂O destilovaná voda
- DNA kyselina deoxyribonukleová
- d-NTP deoxynukleotid – 5' - trifosfát
- EDTA kyselina etylendiamintetraoctová
- PCR polymerázová řetězová reakce
- rDNA ribozomální DNA
- *Tag* *Thermus Aquaticus*
- TBE pufr tris-borátový pufr s EDTA
- UV ultrafialové záření
- TE pufr TRIS/EDTA pufr

9. SEZNAM LITERATURY

- Abawi, G. S., Grogan, R. G. 1975. Sources of primary inoculum and effects of temperature and moisture on infection of beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. *Phytopathology*. 65. 300 – 309.
- Adams, P. B., Ayers, W. A. 1979. Ecology of *Sclerotinia* species. *Phytopathology*. 69. 896 – 898.
- Aghajani, M. A., Safaei, N. 2008. New hosts for sclerotinia stem rot of canola. *Journal of plant pathology*. 90. 143 – 149.
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. *Základy buněčné biologie – Úvod do molekulární biologie buňky*. Library of Congress Cataloging. Publication Data. Espero Publishing s. r. o. Ústí nad Labem. 630 s.
- Anonym, 2012a. Izolace na kolonkách MoBio. Elizabeth pharmacon. (cit. 22. 3. 2012). <<http://laboratore.elisabeth.cz/izolace-dna-a-rna-mobio.html>>.
- Anonym, 2012b. Polymerázová řetězová reakce. [www.wikipedia.cz](http://cs.wikipedia.org/wiki/Polymer%C3%A1zov%C3%A1_%C5%99et%C4%9Bzov%C3%A1_reakce). (cit. 22. 3. 2012) <http://cs.wikipedia.org/wiki/Polymer%C3%A1zov%C3%A1_%C5%99et%C4%9Bzov%C3%A1_reakce>.
- Ansan-Melyah, D., Rouxel, T., Bertrand, J., Letarnec, B., Mendes-Pereira, E., Balesdent, M. H. 1997. Field efficiency of *Brassica napus* specific resistance correlates with *Leptosphaeria maculans* population structure. *European journal of plant pathology*. 103. 835 – 841.
- Bailey, K., Gossen, B., Gurgel, R., Morral, R. 2003. *Diseases of field crops in Canada*. University extension press. University of Saskatoon. Canada.
- Baranyk, P. (ed.) 2010. *Olejniny*. Profi press. Praha. ISBN 978-80-86726-38-0. 205 s.
- Baranyk, P., Ehrenbergrová, M. 2005. Možnosti využití řepky. Sborník - 22. vyhodnocovací seminář Systém výroby řepky a Systém výroby slunečnice. Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin. Praha. 87 – 90.

- Baranyk, P., Kazda, J., Škeřík, J., Volf, M. (eds.). 2005. Řepka olejka v českém zemědělství: Komplexní pěstitelská technologie. Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin. Praha. 161 s.
- Barbetti, M. J., Khangura, R. K. 1999. Management of blackleg in disease-prone environments of western Australia. Proceedings of the 10th international rapeseed congress. Canberra. Australia, (cit. 13. 3. 2012). <<http://regional.org.au/au/gcirc/3/8.htm>>.
- Bardin, S. D., Huang, H. C. 2001. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. Canadian journal of plant pathology. 23. 88 – 98.
- Bártová, E. 2011. Izolace DNA. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. Fakulta veterinární hygieny a ekologie. Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, (cit. 22. 3. 2012). <http://opvk2011.ptacisvet.cz/?title=popis_metod-izolace_dna&lang=cz>.
- Beckman, C. H. 1987. The nature of diseases of plants. American phytopathological society. ISBN 978-0890540749. 175 s.
- Beckman, C. H., Talboys, P. W. 1981. Anatomy of resistance. In Mace, M. E., Bell, A. A., Beckman, C. H. 1981. Fungal wilt diseases of plants New York. Academic press. ISBN 978-0124644502. 640 p.
- Boland, G. J., Hall, R. 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. Canadian journal of plant pathology. 16. 93 – 108.
- Bolton, M. D., Thomma, B. P. H. J., Nelson, B. D. 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of cosmopolitan pathogen. Molecular plant pathology. 2006. 7 (1). 1 – 16.
- Bradley, C. A., Henson, R. A., Porter, P. M., LeGare, D. G., del Río, L. E., Khot, S. D. 2006a. Response of canola cultivars to *Sclerotinia sclerotiorum* in controlled and field environments. Plant disease. 90. 215 – 219.
- Bradley, C. A., Lamey, H. A., Endres, G. J., Henson, R. A., Hanson, B. K., McKay, K. R., Halvorson, M., LeGare, D. G., Porter, P. M., 2006b. Efficacy of fungicides for control of *sclerotinia* stem rot of canola. Plant disease. 90. 1129 – 1134.

- Brun, H., Levivier, S., Eber, F., Renard, M., Chèvre, A. M. 1997. Electrophoretic analysis of natural populations of *Leptosphaeria maculans* directly from leaf lesions. *Plant pathology*. 46. 147 – 154.
- Buchwaldt, E. 2007. Sclerotinia white mold (cabbage drop, stem rot, watery soft rot). In Rimmer, R. S., Shattuck, V. I., Buchwaldt, L. 2007. *Compendium of Brassica Diseases*. The American Phytopathological Society. 117 s.
- Clarkson, J. P., Phelps, K., Whipps, J. M., Young, C. S., Smith, J. A., Walting, M. 2004. Forecasting Sclerotinia disease on lettuce: toward developing a prediction model for carpogenic germination of sclerotia. *Phytopathology*. 94. 268 – 279.
- Collins, A., Mercado-Blanco, J., Jiménez-Díaz, R. M., Olivares, C., Clewes, E., Barbara, D. J. 2005. Correlation of the molecular markers and biological properties in *Verticillium dahliae* and the possible origins of some isolates. *Plant Pathology* 54. 549 – 557.
- Český statistický úřad. 2012. Sklizeň zemědělských plodin v roce 2011 celkem. (cit. 1. 4. 2012). < <http://www.czso.cz/csu/2012edicniplan.nsf/p/2102-12>>.
- Debode, J., Clewes, E., De Backer, G., Hofte, M. 2005. Lignin is involved in the reduction of *Verticillium dahliae* var. *longisporum* inoculum in the soil by crop residue incorporation. *Soil biology & biochemistry*. 37. 301 – 309.
- Delourne, R., Chevre, A. M., Brun, H., Rouxel, T., Balesdent, M. H., Dias, J. S., Salisbury, P., Renard, M., Rimmer, R. S. 2006. Major gene and polygenic resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*). *European journal of plant pathology*. 114. 41 – 52.
- Delwiche, P. A. 1980. Aspects of blackleg (*Leptosphaeria maculans*) resistance to rapeseed (*Brassica napus*). Ph.D. Thesis. University of Wisconsin-Madison. 144 p. In Williams, P. H. 1992. *Biology of Leptosphaeria maculans*. *Canadian journal of plant pathology*. 14. 30 – 35.
- Dixelius, C., Happstadius, I., Berg, G. 2005. Verticillium wilt on *Brassica* oil crops – Swedish perspective. *Journal of the Swedish seed association*. 115. 36 – 48.

- Dixelius, C., Happstadius, I., Berg, G. 2005. Verticillium wilt on *Brassica* oil crops – Swedish perspective. Journal of the Swedish seed association. 115. 36 – 48.
- Eastburn, D. M., Paul, V. H. 2007. Verticillium wilt. In Rimmer, R. S., Shattuck, V. I., Buchwaldt, L. 2007. Compendium of Brassica Diseases. The American Phytopathological Society. 117 s.
- Fábry, A. (ed.). 1992. Olejniny. Ministerstvo zemědělství ČR. 419 s.
- Fábry, A. 2007. Biologická charakteristika. In Baranyk, P., Fábry, A. (eds.) 2007. Řepka - využití, pěstování, ekonomika. Profi Press. Praha. 208 s.
- Fahleson, J., Hu, Q., Dixelius, C. 2004. Phylogenetic analysis of Verticillium species based on nuclear and mitochondrial sequences. Archive of microbiology. 181. 435 – 442.
- Fernando, D. W. G., Nakkeeran, S., Zhang, Y. 2004. Ecofriendly methods in combating *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Recent research developmental and environmental biology. 1. ISBN 81-7736-217-8. 329 – 347.
- Fitt, B. D. L., Brun, H., Barbetti, M. J., Rimmer, R. S. 2006. World-wide importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*). European journal of plant pathology. 114. 3 – 15.
- Fitt, B. D. L., Hu, B. C., Li, Z. Q., Liu, S. Y., Lange, R. M., Kharbanda, P. D., Butterworth, M. H., White, R. P. 2008. Strategies to prevent spread of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) onto oilseed rape crops in China; costs and benefits. Plant pathology. 57. 652 – 664.
- Freeman, J., Ward, E., Caleron, C., McCartney, A. 2002. A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum*, European Journal of Plant Pathology. 108. 877 – 886.
- Garibaldi, A., Minuto, A., Gullino, M. L. 2007. First report of white mold caused by *Sclerotinia sclerotiorum* on *Oreganum vulgare* and *Taraxacum officinale* in Italy. Plant disease. 91 (10). 1360. 3. Ref.

- Gladders, P., Evans, N., Marcroft, S., Pinochet, X. 2006. Dissemination of information about management strategies and changes in farming practices for the exploitation of resistance to *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in oilseed rape cultivars. *European plant pathology*. 114. 117 – 126.
- Goicoechea, N. 2009. To what extent are soil amendments useful to control *Verticillium* wilt? *Pest management science*. 65. 831 – 839.
- Gulya, T., Raschid, K. Y., Masirevic, S. M. 1997. Sunflower diseases. In Schneiter, A. A., 1997. *Sunflower technology and production*. American society of agronomy. Crop science society of American. Soil science society of America. Madison. Wisconsin. 263 – 379.
- Hall, R. 1992. Epidemiology of blackleg of oilseed rape. *Canadian journal of plant pathology*. 14. 46 – 55.
- Hammond, K. M., Lewis, B. G. 1987. The establishment of systemic infection in oilseed rape by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology*. 36. 135 – 147.
- Hammond, K. M., Lewis, B. G., Musa, T. M. 1985. A systemic pathway in the infection of oilseed rape plants by *Leptosphaeria maculans*. *Plant pathology*. 34. 557 – 565.
- Hannush, D. J., Bolland, G. J. 1996. Influence of air temperature and relative humidity on biological control of white mold of bean (*Sclerotinia sclerotiorum*). *Phytopathology*. 86. 156 – 162.
- Heale, J. B., Karapapa V. K. 1999. The verticillium threat to Canada's major oilseed crop: canola. *Canadian journal of plant pathology*. 21. 1 – 7.
- Hoffman, G. M., Schmutterer, H. 1999. *Parasitäre Krankheiten und Schädlinge an landwirtschaftlichen Kulturpflanzen*. 2. Erweiterte und ergänzte Auflage. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart. ISBN 3-8001-3207-9. 675 s. In Plachká, E. 2010. Bílá hniloba řepky (*Sclerotinia sclerotiorum*) – výskyt a fungicidní ošetření maloparcelkových pokusů ozimé řepky na Opavsku v roce 2010. Sborník – 27. vyhodnocovací seminář Systém výroby řepky a Systém výroby slunečnice. Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin. Praha. ISBN 978-80-87065-25-9. 229 – 234.

- Howlett, B. J., Idnurm, A., Soledade, M., Pedras, C. 2001. *Leptosphaeria maculans*, the causal agent of blackleg disease of brassicas. *Fungal genetics and biology*. 33. 1 – 14.
- Huang, H. C., Kozub, G. C. 1989. A simple method for production of apothecia from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant protection bulletin*. 31. 333 – 345.
- Hýsek, J., Vach., M., Javůrek., M. 2008. Biologická ochrana obilnin proti houbovým fytopatogenům. Metodika pro praxi. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i. ISBN 978-80-87011-56-0. 24 s.
- Jedryczka, M., Dakowska, S., West, J. S., Fitt, B. D. L. 1999. The influence of wetness and temperature on the release of ascospores of *Leptosphaeria maculans* (blackleg) from oilseed rape debris. *Materialy z Sympozjum Naukowego Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego „Bioroznorodnosc w fitopatologii europejskiej na przelomie wiekow“*. Poznan. 7. – 9. Wrzesien. 1999. 75.
- Jensen, B. D., Finckh, M. R., Munk, L., Hauser, T. P. 2008. Susceptibility of wild capot (*Daucus carota* spp. *carota*) to *Sclerotinia sclerotiorum*. *European journal of plant pathology*. 122. 359 – 367.
- Jevič, P. 2009. Nepotravinářské využití řepky olejnė. In kolektiv autorů. 2009. Řepka - plodina s budoucností. BASF spol. s. r. o. 180 s.
- Johansson, A. 2006. *Verticillium longisporum* , Infection, Host range, Prevalence and Plant Defence Responses. Licentiate thesis. Swedish university of agricultural sciences. Uppsala. 2006. 27 s.
- Johansson, A., Goud, J., K., C., Dixelius, C. 2005. Plant hosts range of *Verticillium longisporum* and microsclerotia density in Swedish soils, *European journal of plant pathology*, 114, 139 – 149.
- Karapapa, V. K., Bainbridge, B. W., Heale, J. B. 1997. Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape. *Mycological research*. 101. 1281 – 1294.
- Kazda, J., Mikulka, J., Prokinová, E. 2010. Encyklopedie ochrany rostlin. Profi press. Praha. 399 s. ISBN 978-80-86726-34-2.

- Kazda, J., Škeřík J., (eds.). 2008. Metodika integrované ochrany řepky. SPZO s.r.o. 2008. 80 str. ISBN 978-80-87065-08-2.
- Khangura, R. K., MacLeod, W. J. 2011. Yield losses from blackleg (*Leptosphaeria maculans*) in canola varieties under moderate disease pressure. 17th Australian research assembly on brassicas. Wagga Wagga. New South Wales. Australia. (cit. 13. 3. 2012) <http://www.australianoilseeds.com/__data/assets/pdf_file/0015/8331/S4-P1-Khangura.pdf>.
- [Kittner, M. 2012. Molekulární markery využívané při studiu variability rostlin. Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů. CZ.1.07/1.1.00/14.0016. 30. ledna 2012. \(cit. 22. 3. 2012\). < http://www.priroda21.upol.cz/docs/2012-01-3030 - Kitner - Zakladni metody molekularni biologie v botanice.pdf>.](#)
- Kohn, L. M. 1979. A monographic revision of the genus *Sclerotinia*. Mycotaxon. 9. 365 – 444.
- Koch, E., Song, K., Osborn, T. C., Williams, P. H. 1991. Relationship between pathogenicity based on restriction fragment length polymorphism in *Leptosphaeria maculans*. Molecular plant microbe interaction. 4. 341 – 349.
- Koike, S., Subbarao, K., Davis, R., Gordon, T., Hubbard, J. 1994. Verticillium wilt of cauliflower in California. Plant disease. 78. 1116 – 1121.
- Křemen, J., Pohlreich, P., Stříbrná, J. 1998. Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně. Karolinum Praha. 117 s.
- Kuusk, S., Sohlberg, J. J., Long, J. A., Fridborg, I., Sundberg, E. 2002. STY1 and STY2 promote the formation of apical tissues during Arabidopsis gynoecium development. Development. 129. 4707 – 4717.
- Le Turneau, D. 1979. Morphology, cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture. Phytopathology. 69. 887 – 890.
- Luth, P. 2001. The biological fungicide Contans WG – a preparation on the basis of the fungus *Coniothrium minutans*. International sclerotinia workshop. Central science laboratory. York. UK. 127 p.

- Mahuku, G. S., Hall, R., Goodwin, P. H. 1996. Co-infection and induction of systemic acquired resistance by weakly and highly virulent isolates of *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 49. 61 – 72.
- Martens, J. W., Seaman, W. L., Atkinson, T. G. 1994. Diseases of canola rapeseed and mustard. *Diseases of field crops in Canada: An illustrated compedium*. The Canadian phytopathological society. 116 – 121.
- Maylandt, M., Bothe, H. 2009. Houbové choroby - biologie, diagnóza, ochrana. In kolektiv autorů. 2009: Řepka – plodina s budoucností. BASF, spol. s. r. o. 180 s.
- Mazáková, J. 2007. Osobní sdělení.
- Mengistu, A., Rimmer, R. S., Koch, E., Williams, P. H. 1991. Pathogenicity grouping of isolates *Leptosphaeria maculans* on *Brassica napus* cultivars and their disease reaction profiles on rapid-cycling brassicas. *Plant disease*. 75. 1279 – 1282.
- Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Parrilla-Araujo, S., Jiménez-Díaz, R. M. 2003. Simultaneous detection of the defoliating and nondefoliating *Verticillium dahliae* pathotypes in infected olive plants by duplex nested PCR chain reaction. *Plant Disease* 87. 1487 – 1494.
- Mol, L., Scholte, K. 1995. Formation of microsclerotia of *Verticillium dahliae* Kleb. on various plant of two potato cultivars. *Potato research*. 38. 143 – 150.
- Morall, R. A. A. 1977. A preliminary study of influence of water potential on sclerotium germination in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Botany*. 55. 8 – 11.
- Mueller., D. S., Hartman. G. L., Pedersen, W. L. 2002. Effect of crop rotation and tillage systems on sclerotinia stem rot on soybean. *Canadian journal of plant pathology*. 24. 450 – 456.
- Naseri, B. 2006. Epidemiology of blackleg disease of canola, caused by *Leptosphaeria maculans*.. Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy in University of Adelaide. School of agriculture, food & wine. Australia. 199 p.

- Nerad, D. 2007. Význam pěstování řepky. In Baranyk, P., Fábry, A. (eds.). 2007. Řepka - využití, pěstování, ekonomika. Profi Press. Praha. 208 s.
- Neumann, M. J., Dobinson, K. F. 2003. Sequence tag analysis of gene expression during pathogenic growth and microsclerotia development in the vascular wilt pathogen *Verticillium dahliae*. Fungal genetics and biology. 38. 54 – 62.
- Ovesná, J., Hodek, J. 2007. Využití AFLP pro genotypizaci rostlin. Metodika pro praxi. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i. 21 s. ISBN 978-80-87011-36-2.
- Pegg, G. F., Brady, B. L. 2002. Hosts. In Pegg, G. F., Brady, B. L. 2002. Verticillium wilt. Wallingford. UK. CAB Publishing. ISBN 0-85199-529-2. 552 p.
- Plachká, E. 2010. Bílá hniloba řepky (*Sclerotinia sclerotiorum*) – výskyt a fungicidní ošetření maloparcelkových pokusů ozimé řepky na Opavsku v roce 2010. Sborník – 27. Vyhodnocovací seminář Systém výroby řepky a Systém výroby slunečnice. Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin. Praha. ISBN 978-80-87065-25-9. 229 – 234.
- Purdy, L. H. 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution and impact. Phytopathology. 69. 875 – 880.
- Rimmer, R. S., van den Berg, C. G. J. 2007. Black leg (phoma stem canker). In In Rimmer, R. S., Shattuck, V. I., Buchwaldt, L. 2007. Compendium of Brassica Diseases. The American Phytopathological Society. 117 p.
- Riou, C., Freyssinet, G., Fevre, M. 1991. Production of cell wall degrading enzymes by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. Applied and environmental microbiology. 57. 1478 – 1484.
- Rosypal, S. 2002. Úvod do molekulární biologie. 4. díl. Brno. 1200 s. ISBN 80-902562-4-4.
- Rouxel, T., Balesdent, M. H. 2005. The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era. Molecular plant pathology. 6. 225 – 241.
- Shirzadegan, M., Robbelen, G. 1985. Influence of seed colour and hull proportion on quality properties of seed in *Brassica napus* L. - Fetre. Seifen. Anstrichmittel. 6. 235-237.

- Shoemaker, R. A., Brun, H. 2001. The teleomorph of the weakly aggressive segregate of *Leptosphaeria maculans*. Canadian journal of botany. 79. 412 – 419.
- Schathorst, W. C. 1981. Life cycle and epidemiology of *Verticillium*. In Mace M. E., Bell., A. A., Beckman, C. H. 1981. Fungal wilt diseases of plants. New York. Academic press. ISBN 978-0124644502. 640 p.
- Singh, M., Singh Rathore, S., Shekhawat, K., Singh Chauhan, J. 2011. Evaluation of high water use efficient *Brassica juncea* L. germplasm for gas exchange parameters and seed yield. Proceedings 13th International rapeseed congress. International Consultative Research Group on Rapeseed. 5. – 9. 6. 2011. Czech republic.
- Sippell, D. W., Hall, R. 1995. Glucose phosphate isomerase polymorphism distinguish weakly from highly virulent strains of *Leptosphaeria maculans*. Canadian Journal of Plant Pathology. 17. 1 – 6.
- Somda, I., Harkous, S., Brun, H. 1997. Bipolar heterothallism in B-group isolates of *Leptosphaeria maculans*. Plant pathology. 46. 890 – 896.
- Stevenson, L. A., Fahleson, J., Hu, Q., Dixelius, C. 2002. An investigation of the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to isolate of two species of *Verticillium*. Journal of phytopathology. 149. 395 – 401.
- Tsrer, L. 2011. Epidemiology and control of *Verticillium* wilt on olive. Israel journal of plant sciences. 59. 59 – 69.
- Tulasne, L. R., Tulasne, C. 1863. *Selecta Fungorum Carpologia*, 2. Paris: La Presse Impériale. In Rouxel, T., Balesdent, M. H. 2005. The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era. Molecular plant pathology. 6. 225 – 241.
- Vlášková, H., Trešlová, H. 2008. PCR. Sborník textů Vybrané vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetice. Projekt Metabolické vzdělávací centrum CZ.04.3.07/3.2.01.2./2048. Ústav dědičných a metabolických poruch. Všeobecná fakultní nemocnice v Praze. Praha. 50 s.
- Weißen, E. 2009. Řepkový stolní olej – z outsidera hvězdou. In kolektiv autorů. 2009. Řepka - plodina s budoucností. BASF spol. s r. o. 180 s.

- West, J. S., Kharbanda, P. D., Barbetti, M. J., Fitt, B. D. L. 2001. Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. *Plant pathology*. 50. 10 – 27.
- Wilhelm, S. 1955. Longevity of the *Verticillium* wilt fungus in the laboratory and in the field. *Phytopathology*. 45. 180 – 181.
- Willets, H. J., Wong, J. A. L. 1980. The biology of *S. sclerotiorum*, *S. triforium* and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. *The botanical review*. 46. 101 – 165.
- Williams, P. H. 1992. Biology of *Leptosphaeria maculans*. *Canadian journal of plant pathology*. 14. 30 – 35.
- Williams, R. H., Fitt., B. D. L. 1999. Differentiating A and B groups of *Leptosphaeria maculans* the blackleg pathogen of *Brassica napus*. *Molecular plant pathology*. 3. 487 – 493.
- Youn-sung, C., Sae-rom, K., Yu-jeong, J., Hye-joon, J., Ji-hie, H., Yoon-hi, C., L., J., Dong-Hee, L. 2012 Comparative transcriptome analysis of *Arabidopsis* and rapeseeds under extreme temperature stress. *Proceedings 13th International rapeseed congress. International Consultative Research Group on Rapeseed*. 5. – 9. 6. 2011. Czech republic.
- Zare, R. 2003. A revision of plant – associated *Verticillium* species. *Rostaniha*. 4. 29 – 54.
- Zhou, L., Hu, Q., Johansson, A., Dixelius, C. 2006. *Verticillium longisporum* and *V. dahliae*: infection and disease in *Brassica napus*. *Plant pathology*. 55. 137 – 144.
- Zouhar, M., Gaar, V. 2003. Základní metody diagnostiky a determinace karanténních druhů háďátek z rodu *Globodera* (*G. rostochiensis* a *G. pallida*) pro potřebu praxe. *Rada vědeckých společností ČR*. 71 s.
- Zvára, J. 1981. Choroby řepky. In Čača, Z., Kollár, V., Novák, J. B., Zvára, J. 1981. *Zemědělská fytopatologie. Státní zemědělské nakladatelství*. 1981. 344 s.

10. SEZNAM PŘÍLOH

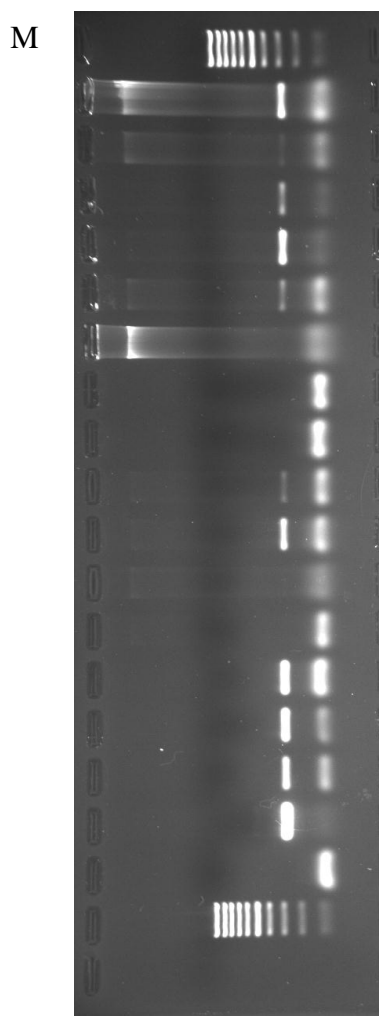
11.1 PŘÍLOHA Č. 1: UKÁZKA ELEKTROFOREOGRAMU

11.2 PŘÍLOHA Č. 2: TABULKA VÝSLEDKŮ

11.3 PŘÍLOHA Č. 3: ANALÝZA ROZPTYLU

11. PŘÍLOHY

11.1 PŘÍLOHA Č. 1: UKÁZKA ELEKTROFOREOGRAMU



Tento elektroforeogram byl vytvořen pro *S. sclerotiorum*. V první jamce je zřetelně vidět zářící proužky „Mass ruler DNA low range“. Ve druhé jamce je jasně viditelný amplifikovaný fragment o délce cca 300 bp, kde byla nalezena *S. Sclerotiorum*. V místech, kde tyto fragmenty viditelné nejsou, nebyl vzorek na přítomnost DNA patogena pozitivní.

11.2 PŘÍLOHA Č. 2: TABULKA VÝSLEDKŮ

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
N1/09/1	Chvalíkovice Opava	Neuvedena	25.6.2007	Kořen				1	1,79
				Krček		1		1	1,86
				Stonek 1					1,92
				Stonek 2					1,91
N1/09/2				Kořen		1			1,53
				Krček					1,66
				Stonek 1					1,95
				Stonek 2					1,59
N1/09/3				Kořen					0,84
				Krček		1			1,69
				Stonek 1		1			1,81
				Stonek 2					1,73
N1/09/4				Kořen					1,74
				Krček		1			1,68
				Stonek 1		1			1,8
				Stonek 2		1			1,82
N1/09/5				Kořen					1,82
				Krček		1			1,93
				Stonek 1		1			1,92
				Stonek 2		1			1,97
N1/09/6				Kořen		1			1,72
				Krček		1			1,57
				Stonek 1		1			1,62
				Stonek 2		1			1,77
N1/09/7				Kořen					1,93
				Krček		1			1,86
				Stonek 1					1,81
				Stonek 2					1,98

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
N1/09/8				Kořen					1,63
				Krček		1			1,79
				Stonek 1					2,07
				Stonek 2					1,97
N1/09/9				Kořen					1,69
				Krček					1,8
				Stonek 1					2,01
				Stonek 2					1,76
N1/09/10				Kořen					1,84
				Krček					1,77
				Stonek 1					1,98
				Stonek 2					1,98
N1/09/11				Kořen					1,79
				Krček		1			1,99
				Stonek 1					1,83
				Stonek 2					1,88
N1/09/12				Kořen					1,78
				Krček	1				1,91
				Stonek 1					1,79
				Stonek 2					1,68
N2/09/1	Opava - předměstí	Neuvedena	Neznámé	Kořen				1	1,77
				Krček		1		1	1,74
				Stonek 1		1		1	1,95
				Stonek 2		1			1,94
N2/09/2				Kořen					1,67
				Krček		1		1	1,78
				Stonek 1		1		1	1,85
				Stonek 2		1		1	1,99
N2/09/3				Kořen				1	1,68
				Krček		1		1	1,67
				Stonek 1		1		1	1,66
				Stonek 2					1,84

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
N2/09/4				Kořen				1	1,55
				Krček		1		1	1,76
				Stonek 1		1		1	2,01
				Stonek 2		1			1,94
N3/09/1	ZS Kujavy (Fulnek)	Neuvedena	20.7.2007	Kořen					2
				Krček	1	1			1,86
				Stonek 1	1	1			1,79
				Stonek 2	1	1			1,83
N3/09/2				Kořen					1,87
				Krček	1	1			1,89
				Stonek 1		1			1,62
				Stonek 2	1	1			1,97
N3/09/3				Kořen		1			2,04
				Krček					1,95
				Stonek 1		1			1,98
				Stonek 2		1			1,78
N3/09/4				Kořen		1			2
				Krček	1	1			2,02
				Stonek 1	1	1			1,68
				Stonek 2	1	1			1,87
M1/09/1	Slatiny	Neuvedena	7.7.2008	Kořen	1	1		1	1,97
				Krček	1	1		1	1,75
				Stonek 1	1	1			1,69
				Stonek 2	1			1	1,79
M1/9/2				Kořen				1	1,84
				Krček		1		1	1,78
				Stonek 1		1			1,59
				Stonek 2		1			1,47
M1/9/3				Kořen					1,87
				Krček	1	1			1,96
				Stonek 1	1	1		1	1,75
				Stonek 2		1			1,69

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
L1/09/1	Česká Třebová	Neuvedena	3.7.2008	Kořen	1	1			1,96
				Krček	1	1			1,75
				Stonek 1	1	1			1,88
				Stonek 2	1				1,92
L1/09/2				Kořen				1	1,53
				Krček	1	1			1,8
				Stonek 1		1			1,76
				Stonek 2					1,87
L1/09/3				Kořen	1	1		1	1,75
				Krček	1	1		1	1,97
				Stonek 1					1,71
				Stonek 2	1				1,53
L1/09/4				Kořen	1				1,81
				Krček	1	1			1,48
				Stonek 1	1			1	1,77
				Stonek 2	1	1			2,06
L1/09/5				Kořen					1,7
				Krček	1	1			1,7
				Stonek 1	1			1	1,86
				Stonek 2	1				1,6
L2/09/1	Česká Třebová	Labrador	3.7.2008	Kořen	1	1			1,62
				Krček	1	1			1,9
				Stonek 1	1	1			1,8
				Stonek 2	1				1,85
L2/09/2				Kořen					1,61
				Krček	1	1			1,72
				Stonek 1		1			1,78
				Stonek 2	1	1			1,67
L2/09/3				Kořen	1	1			1,61
				Krček	1	1			1,66
				Stonek 1					1,76
				Stonek 2					1,76

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
L2/09/4				Kořen					1,73
				Krček		1			1,57
				Stonek 1		1			1,76
				Stonek 2		1			1,81
L2/09/5				Kořen		1			
				Krček		1			
				Stonek 1		1			
				Stonek 2		1			
SA1/9/1	Zubří - stanice	Neuvedena	16.7.2009	Kořen					1,98
				Krček	1				1,88
				Stonek 1	1				1,84
				Stonek 2					1,9
SA1/9/2				Kořen					1,99
				Krček	1				1,94
				Stonek 1					1,94
				Stonek 2					1,96
SA1/9/3				Kořen	1				1,98
				Krček	1				1,95
				Stonek 1					1,63
				Stonek 2	1				1,84
SA1/9/4				Kořen	1				1,73
				Krček	1				1,49
				Stonek 1					1,73
				Stonek 2					1,27
SA1/9/5				Kořen					1,51
				Krček	1				1,64
				Stonek 1					1,61
				Stonek 2					1,35
SA1/9/6				Kořen					1,54
				Krček	1				1,72
				Stonek 1					1,85
				Stonek 2					1,74

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
SA1/9/7				Kořen				1	1,74
				Krček					1,7
				Stonek 1					1,85
				Stonek 2					1,74
SA1/9/8				Kořen					1,57
				Krček					1,56
				Stonek 1					1,73
				Stonek 2					1,74
SA1/9/9				Kořen					1,74
				Krček					1,71
				Stonek 1					1,82
				Stonek 2					1,66
SA1/9/10				Kořen					1,56
				Krček					1,77
				Stonek 1					1,7
				Stonek 2					1,61
SA2/9/1	Zubří - Háje	Digger	16.7.2009	Kořen					1,5
				Krček	1	1			1,78
				Stonek 1	1	1			1,8
				Stonek 2		1			1,78
SA2/9/2				Kořen					1,89
				Krček	1				1,84
				Stonek 1		1			1,75
				Stonek 2		1			1,6
SA2/9/3				Kořen	1				1,99
				Krček	1	1			7,19
				Stonek 1					1,72
				Stonek 2					1,86
SA2/9/4				Kořen	1				1,7
				Krček	1	1			1,8
				Stonek 1	1	1			1,88
				Stonek 2	1	1			1,74

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
SA2/9/5				Kořen	1				1,9
				Krček	1				1,89
				Stonek 1	1				1,87
				Stonek 2					1,83
SA2/9/6				Kořen	1				1,7
				Krček	1	1			1,7
				Stonek 1	1	1			1,75
				Stonek 2	1	1			1,96
SA2/9/7				Kořen					1,83
				Krček					1,93
				Stonek 1					1,67
				Stonek 2					1,74
SA3/9/1	Zubří - Zášová	Ontario	16.7.2009	Kořen					1,84
				Krček	1				1,83
				Stonek 1	1	1			1,86
				Stonek 2	1	1			1,87
SA3/9/2				Kořen					1,86
				Krček	1				1,8
				Stonek 1					1,79
				Stonek 2					1,74
SA3/9/3				Kořen	1				1,81
				Krček	1	1			1,87
				Stonek 1					1,66
				Stonek 2	1				1,72
SA3/9/4				Kořen					1,84
				Krček					1,91
				Stonek 1					1,85
				Stonek 2		1			1,65
SA3/9/5				Kořen					1,89
				Krček					1,82
				Stonek 1		1			1,76
				Stonek 2		1			1,71

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
SA3/9/6				Kořen					1,67
				Krček					1,93
				Stonek 1					1,69
				Stonek 2					1,71
SA3/9/7				Kořen					1,95
				Krček					1,92
				Stonek 1					1,8
				Stonek 2					1,8
SA3/9/8				Kořen					1,75
				Krček					1,73
				Stonek 1					1,77
				Stonek 2					1,84
A1/09/1	ZAS - Koloveč	Atlantic	30.7.2009	Kořen			N	N	
				Krček		1	N	N	
				Stonek 1		1	N	N	
				Stonek 2			N	N	
A1/09/2				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
A1/09/3				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
A1/09/4				Kořen			N	N	
				Krček		1	N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2		1	N	N	
A1/09/5				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
B1/09/1	Bylany	Ontario	Neznámé	Kořen			N	N	
				Krček	1	1	N	N	
				Stonek 1	1	1	N	N	
				Stonek 2	1	1	N	N	
B1/09/2				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1		1	N	N	
				Stonek 2			N	N	
B1/09/3				Kořen		1	N	N	
				Krček	1	1	N	N	
				Stonek 1	1	1	N	N	
				Stonek 2	1	1	N	N	
B1/09/4				Kořen			N	N	
				Krček		1	N	N	
				Stonek 1	1	1	N	N	
				Stonek 2	1	1	N	N	
B1/09/5				Kořen			N	N	
				Krček		1	N	N	
				Stonek 1		1	N	N	
				Stonek 2			N	N	
C1/09/1	Bylany	Baldur	Neznámé	Kořen			N	N	
				Krček	1	1	N	N	
				Stonek 1	1	1	N	N	
				Stonek 2	1	1	N	N	
C1/09/2				Kořen	1		N	N	
				Krček	1	1	N	N	
				Stonek 1	1	1	N	N	
				Stonek 2		1	N	N	
C1/09/3				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1		1	N	N	
				Stonek 2			N	N	

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
C1/09/4				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1	1	1	N	N	
				Stonek 2			N	N	
C1/09/5				Kořen			N	N	
				Krček	1	1	N	N	
				Stonek 1	1	1	N	N	
				Stonek 2	1	1	N	N	
D1/09/1	Slatiny	Lagoda	29.7.2009	Kořen			N	N	
				Krček		1	N	N	
				Stonek 1		1	N	N	
				Stonek 2			N	N	
D1/09/2				Kořen			N	N	
				Krček		1	N	N	
				Stonek 1	1	1	N	N	
				Stonek 2	1	1	N	N	
D1/09/3				Kořen			N	N	
				Krček	1		N	N	
				Stonek 1	1		N	N	
				Stonek 2	1		N	N	
D1/09/4				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1	1		N	N	
				Stonek 2	1		N	N	
D1/09/5				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1	1		N	N	
				Stonek 2			N	N	
E1/09/1	Slatiny	Neuvedena	27.7.2009	Kořen			N	N	
				Krček	1	1	N	N	
				Stonek 1	1	1	N	N	
				Stonek 2	1		N	N	

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
E1/09/2				Kořen			N	N	
				Krček	1		N	N	
				Stonek 1	1		N	N	
				Stonek 2			N	N	
E1/09/3				Kořen			N	N	
				Krček		1	N	N	
				Stonek 1	1		N	N	
				Stonek 2	1		N	N	
E1/09/4				Kořen			N	N	
				Krček	1		N	N	
				Stonek 1	1	1	N	N	
				Stonek 2			N	N	
E1/09/5				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1		1	N	N	
				Stonek 2			N	N	
F1/09/1	Sychrov	Californium	31.7.2009	Kořen			N	N	
				Krček	1		N	N	
				Stonek 1	1		N	N	
				Stonek 2	1		N	N	
F1/09/2				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1	1		N	N	
				Stonek 2	1		N	N	
F1/09/3				Kořen			N	N	
				Krček		1	N	N	
				Stonek 1	1		N	N	
				Stonek 2	1		N	N	
F1/09/4				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1	1	1	N	N	
				Stonek 2	1		N	N	

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
F1/09/5				Kořen			N	N	
				Krček	1		N	N	
				Stonek 1	1		N	N	
				Stonek 2	1		N	N	
G1/09/1	Dobrotín	Baros	Neznámé	Kořen			N	N	
				Krček		1	N	N	
				Stonek 1		1	N	N	
				Stonek 2		1	N	N	
G1/09/2				Kořen			N	N	
				Krček	1	1	N	N	
				Stonek 1	1	1	N	N	
				Stonek 2		1	N	N	
G1/09/3				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1		1	N	N	
				Stonek 2			N	N	
G1/09/4				Kořen			N	N	
				Krček	1	1	N	N	
				Stonek 1	1	1	N	N	
				Stonek 2		1	N	N	
G1/09/5				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1		1	N	N	
				Stonek 2			N	N	
H1/09/1	Dobrotín	Baldur	Neznámé	Kořen		1	N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1		1	N	N	
				Stonek 2			N	N	
H1/09/2				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1		1	N	N	
				Stonek 2			N	N	

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
H1/09/3				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1		1	N	N	
				Stonek 2		1	N	N	
H1/09/4				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1		1	N	N	
				Stonek 2		1	N	N	
H1/09/5				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1		1	N	N	
				Stonek 2		1	N	N	
I1/09/1	Smilovy hory	Ontario	Neznámé	Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
I1/09/2				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
I1/09/3				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
I1/09/4				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
I1/09/5				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
J1/09/1	Břilice	Asgard	Neznámé	Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
J1/09/2				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
J1/09/3				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
J1/09/4				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
J1/09/5				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
K1/09/1	Břilice	Lagoda	Neznámé	Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
K1/09/2				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
K1/09/3				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
K1/09/4				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
K1/09/5				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
S1/09/1	Moutnice	Ontario	27.8.2009	Kořen					1,65
				Krček					1,65
				Stonek 1					1,78
				Stonek 2					1,66
S1/09/2				Kořen					1,76
				Krček		1			1,75
				Stonek 1		1			1,75
				Stonek 2		1			1,63
S1/09/3				Kořen					1,84
				Krček					1,91
				Stonek 1	1	1			1,73
				Stonek 2					1,55
S1/09/4				Kořen					1,63
				Krček					1,66
				Stonek 1	1				1,79
				Stonek 2	1	1			1,62
S1/09/5				Kořen					1,6
				Krček		1			1,68
				Stonek 1	1				0,72
				Stonek 2					1,64
S2/09/1	Moutnice	Liprima	Neznámé	Kořen					1,69
				Krček	1	1			1,73
				Stonek 1	1	1			1,62
				Stonek 2		1			1,61

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
S2/09/2				Kořen					1,7
				Krček	1	1			1,75
				Stonek 1	1	1			1,75
				Stonek 2	1	1			15,45
S2/09/3				Kořen					1,88
				Krček		1			1,9
				Stonek 1	1	1			1,58
				Stonek 2		1			1,41
S2/09/4				Kořen					1,77
				Krček	1	1			1,79
				Stonek 1	1	1			2,2
				Stonek 2	1	1			1,52
S2/09/5				Kořen					1,71
				Krček					1,87
				Stonek 1	1	1			1,83
				Stonek 2		1			1,5
T1/09/1	Chorušice	Sion-Asgard	22.7.2009	Kořen				1	1,92
				Krček	1	1		1	1,81
				Stonek 1		1			1,92
				Stonek 2		1			1,89
T1/09/2				Kořen				1	1,59
				Krček	1	1		1	1,8
				Stonek 1		1		1	1,69
				Stonek 2		1			1,95
T1/09/3				Kořen				1	1,79
				Krček	1	1		1	1,63
				Stonek 1				1	1,68
				Stonek 2	1				1,88
T1/09/4				Kořen				1	2,08
				Krček	1	1		1	1,85
				Stonek 1				1	2,03
				Stonek 2	1				1,93

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
T1/09/5				Kořen				1	1,77
				Krček				1	1,77
				Stonek 1					1,81
				Stonek 2					1,78
T2/09/1	Chorušice	Sion-Asgard	30.7.2009	Kořen	1				1,89
				Krček	1	1			1,67
				Stonek 1					1,75
				Stonek 2					1,67
T2/09/2				Kořen					1,62
				Krček	1	1			1,52
				Stonek 1	1				1,77
				Stonek 2	1	1			1,67
T2/09/3				Kořen	1	1			1,55
				Krček	1	1			1,62
				Stonek 1	1				1,84
				Stonek 2		1			1,73
T2/09/4				Kořen					1,76
				Krček	1	1			1,74
				Stonek 1					1,73
				Stonek 2	1	1			1,88
T2/09/5				Kořen					1,58
				Krček	1	1			1,54
				Stonek 1					1,53
				Stonek 2					1,75
U1/09/1	ZAS - Koloveč	Ontario	30.7.2009	Kořen					1,34
				Krček	1	1			1,32
				Stonek 1					1,82
				Stonek 2					1,6
U1/09/2				Kořen					1,62
				Krček		1			1,74
				Stonek 1		1			1,62
				Stonek 2	1	1			1,93

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
U1/09/3				Kořen					1,7
				Krček		1			1,33
				Stonek 1	1	1			1,79
				Stonek 2	1	1			1,58
U1/09/4				Kořen		1			1,55
				Krček	1	1			1,61
				Stonek 1		1			1,33
				Stonek 2		1			1,73
U1/09/5				Kořen		1			1,58
				Krček	1	1			1,62
				Stonek 1		1			1,64
				Stonek 2		1			1,76
V1/09/1	Řisuty	Neuvedena	Neznámé	Kořen				1	1,98
				Krček	1	1			1,72
				Stonek 1		1			1,29
				Stonek 2		1			1,85
V1/09/2				Kořen				1	1,96
				Krček		1		1	1,97
				Stonek 1		1			1,67
				Stonek 2		1			1,65
V1/09/3				Kořen	1	1			1,79
				Krček		1		1	1,67
				Stonek 1	1	1			1,91
				Stonek 2		1			1,94
V1/09/4				Kořen				1	2,12
				Krček	1	1		1	2,02
				Stonek 1				1	1,96
				Stonek 2					1,86
V1/09/5				Kořen					1,78
				Krček					1,83
				Stonek 1					1,74
				Stonek 2					1,87

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
W1/09/1	ZS Sloveč	Labrador	23.7.2009	Kořen					1,89
				Krček	1				2
				Stonek 1		1			1,85
				Stonek 2		1			1,73
W1/09/2				Kořen					1,81
				Krček	1	1			1,74
				Stonek 1					1,91
				Stonek 2		1			1,79
W1/09/3				Kořen					1,98
				Krček	1	1			1,99
				Stonek 1	1				1,95
				Stonek 2	1	1			1,84
W1/09/4				Kořen	1	1			1,88
				Krček	1	1			2,15
				Stonek 1	1				1,87
				Stonek 2					1,81
W1/09/5				Kořen					1,73
				Krček	1	1			1,91
				Stonek 1	1				2,22
				Stonek 2		1			1,71
X1/09/1	U Sloupu	Lagoda	27.7.2009	Kořen	1	1			1,53
				Krček				1	1,58
				Stonek 1				1	1,72
				Stonek 2	1				1,94
X1/09/2				Kořen					2,12
				Krček	1	1			1,47
				Stonek 1	1				1,98
				Stonek 2					1,96
X1/09/3				Kořen		1		1	2
				Krček	1	1			2,07
				Stonek 1					1,95
				Stonek 2					1,92

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
X1/09/4				Kořen		1			1,51
				Krček	1	1			1,52
				Stonek 1					1,96
				Stonek 2	1	1			1,9
X1/09/5				Kořen					2,38
				Krček					2,28
				Stonek 1					1,76
				Stonek 2					1,92
Y1/09/1	U Sloupu	Asgard	27.7.2009	Kořen		1			1,67
				Krček		1		1	1,58
				Stonek 1		1		1	1,85
				Stonek 2					1,94
Y1/09/2				Kořen					1,73
				Krček				1	1,69
				Stonek 1		1			1,75
				Stonek 2		1			1,88
Y1/09/3				Kořen					1,61
				Krček	1	1		1	1,71
				Stonek 1		1			1,72
				Stonek 2	1	1			1,83
Y1/09/4				Kořen				1	1,87
				Krček	1	1		1	1,63
				Stonek 1		1		1	1,8
				Stonek 2	1	1			1,7
Y1/09/5				Kořen					1,47
				Krček		1		1	1,53
				Stonek 1				1	3,58
				Stonek 2					1,46
SA1/10/1	Dubé - Č. budějovice	Neuvedena	13.7.2010	Kořen					1,89
				Krček	1	1			1,7
				Stonek 1	1	1			1,55
				Stonek 2		1			1,73

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
SA1/10/2				Kořen	X	X	X	X	
				Krček	1	1			1,85
				Stonek 1		1			1,81
				Stonek 2		1			1,56
SA1/10/3				Kořen					1,67
				Krček		1			1,98
				Stonek 1		1			1,84
				Stonek 2		1			1,67
SA1/10/4				Kořen					1,83
				Krček					1,87
				Stonek 1	1	1			1,54
				Stonek 2		1			1,76
SA1/10/4				Kořen					1,5
				Krček	1	1			1,81
				Stonek 1	1	1			2,07
				Stonek 2		1			1,81
SA2/10/1	Svéradice - Klatovy	Neuvedena	13.7.2010	Kořen	X	X	X	X	
				Krček	1	1		1	1,92
				Stonek 1	1	1		1	1,29
				Stonek 2	1	1		1	1,59
SA2/10/2				Kořen	X	X	X	X	
				Krček		1		1	1,9
				Stonek 1		1		1	2,15
				Stonek 2					1,86
SA2/10/3				Kořen	X	X	X	X	
				Krček					1,76
				Stonek 1					1,78
				Stonek 2		1		1	1,71
SA2/10/4				Kořen	X	X	X	X	
				Krček		1		1	0,52
				Stonek 1		1			1,98
				Stonek 2		1			1,89

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
SA2/10/5				Kořen	X	X	X	X	
				Krček		1		1	1,78
				Stonek 1		1		1	1,74
				Stonek 2		1		1	1,67
SA3/10/1	Kasejovice-Plzeň jih	Neuvedena	13.7.2010	Kořen	X	X	X	X	
				Krček				1	1,81
				Stonek 1		1		1	1,78
				Stonek 2				1	1,71
SA3/10/2				Kořen	X	X	X	X	
				Krček		1		1	1,54
				Stonek 1				1	1,63
				Stonek 2				1	1,71
SA3/10/3				Kořen	X	X	X	X	
				Krček				1	1,9
				Stonek 1		1		1	2,11
				Stonek 2		1		1	1,96
SA3/10/4				Kořen	X	X	X	X	
				Krček		1		1	1,79
				Stonek 1		1		1	1,74
				Stonek 2		1		1	1,79
SA3/10/5				Kořen	X	X	X	X	
				Krček				1	1,62
				Stonek 1		1		1	1,57
				Stonek 2		1		1	1,63
SA4/10/1	Uhlířské Janovice K.H	Neuvedena	12.7.2010	Kořen	X	X	X	X	
				Krček				1	1,71
				Stonek 1				1	1,97
				Stonek 2				1	1,83
SA4/10/2				Kořen	X	X	X	X	
				Krček				1	1,47
				Stonek 1		1			1,64
				Stonek 2		1		1	1,69

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
SA4/10/3				Kořen	X	X	X	X	
				Krček	1	1		1	1,34
				Stonek 1				1	1,9
				Stonek 2				1	1,7
SA4/10/4				Kořen	X	X	X	X	
				Krček	1	1		1	1,66
				Stonek 1				1	1,53
				Stonek 2				1	1,69
SA4/10/5				Kořen	X	X	X	X	
				Krček		1		1	1,92
				Stonek 1				1	1,93
				Stonek 2				1	1,66
SA5/10/1	Miličín - Benešov	Neuvedena	12.7.2010	Kořen	X	X	X	X	
				Krček				1	1,65
				Stonek 1		1		1	1,68
				Stonek 2				1	1,69
SA5/10/2				Kořen	X	X	X	X	
				Krček		1		1	1,69
				Stonek 1		1		1	1,76
				Stonek 2		1		1	1,9
SA5/10/3				Kořen		1			1,71
				Krček	1	1			1,68
				Stonek 1		1		1	1,89
				Stonek 2				1	1,89
SA5/10/4				Kořen	X	X	X	X	
				Krček				1	1,61
				Stonek 1		1		1	1,65
				Stonek 2		1		1	1,78
SA5/10/5				Kořen	X	X	X	X	
				Krček		1			1,93
				Stonek 1		1		1	1,21
				Stonek 2	1	1			1,95

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
SA6/10/1	Poříčí nad Sázavou	Neuvedena	12.7.2010	Kořen	X	X	X	X	
				Krček		1			1,87
				Stonek 1					1,63
				Stonek 2					1,88
SA6/10/2				Kořen	X	X	X	X	
				Krček					1,73
				Stonek 1					1,81
				Stonek 2					1,85
SA6/10/3				Kořen	X	X	X	X	
				Krček		1			1,73
				Stonek 1					1,84
				Stonek 2		1			1,76
SA6/10/4				Kořen	X	X	X	X	
				Krček					1,99
				Stonek 1		1			1,87
				Stonek 2					1,74
SA6/10/5				Kořen	X	X	X	X	
				Krček					1,66
				Stonek 1		1			1,68
				Stonek 2		1			1,74
SA7/10/1	Ovčiny - Benešov	Neuvedena	12.7.2010	Kořen	X	X	X	X	
				Krček					1,59
				Stonek 1		1			1,55
				Stonek 2		1			1,72
SA7/10/2				Kořen	X	X	X	X	
				Krček		1			1,82
				Stonek 1					1,71
				Stonek 2					1,63
SA7/10/3				Kořen					1,88
				Krček	1	1			1,86
				Stonek 1		1			1,73
				Stonek 2	1	1			2,12

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
SA7/10/4				Kořen	X	X	X	X	
				Krček		1			1,7
				Stonek 1		1			1,32
				Stonek 2		1			1,79
SA7/10/5				Kořen	X	X	X	X	
				Krček					1,78
				Stonek 1		1			1,71
				Stonek 2					1,94
A1 - A4	Krč (Písek)	Neuvedena	12.7.2010	Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1	1		N	N	
				Stonek 2	1	1	N	N	
A5 - A8				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1	1	1	N	N	
				Stonek 2		1	N	N	
A9 - A 12				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1		1	N	N	
				Stonek 2		1	N	N	
A 13 - A 16				Kořen			N	N	
				Krček		1	N	N	
				Stonek 1		1	N	N	
				Stonek 2		1	N	N	
A17- A20				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
B1 - B4	Kluky	Neuvedena	13.7.2010	Kořen			N	N	
				Krček		1	N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
B5 - B8				Kořen			N	N	
				Krček		1	N	N	
				Stonek 1		1	N	N	
				Stonek 2			N	N	
B9- B12				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
B13 - B16				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1		1	N	N	
				Stonek 2			N	N	
B17 - B20				Kořen			N	N	
				Krček		1	N	N	
				Stonek 1		1	N	N	
				Stonek 2		1	N	N	
C1 - C2	Sudkov	Neuvedena	Neznámé	Kořen	X	X	N	N	
				Krček	X	X	N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
C3 - C4				Kořen	X	X	N	N	
				Krček	X	X	N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
C5- C6				Kořen	X	X	N	N	
				Krček	X	X	N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
C7 - C8				Kořen	X	X	N	N	
				Krček	X	X	N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
D1 - D4	Záhoří	Neuvedena	12.7.2010	Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1		1	N	N	
				Stonek 2			N	N	
D5 - D8				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
D9 - D12				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
D13 - D16				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1		1	N	N	
				Stonek 2			N	N	
D17 - D20				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
E1 - E4	Budkov	Neuvedena	Neznámé	Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
E5 - E7				Kořen	X	X	N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
E8 - E11				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
G1 - G2	Rapotín	Neuvedena	Neznámé	Kořen	X	X	N	N	
				Krček	X	X	N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2		1	N	N	
G3 -G4				Kořen	X	X	N	N	
				Krček	X	X	N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
G5 - G6				Kořen	X	X	N	N	
				Krček	X	X	N	N	
				Stonek 1		1	N	N	
				Stonek 2		1	N	N	
G7 - G8				Kořen	X	X	N	N	
				Krček	X	X	N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
H1 - H2	Zábřeh	Neuvedena	Neznámé	Kořen	X	X	N	N	
				Krček	X	X	N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
H3 - H4				Kořen	X	X	N	N	
				Krček	X	X	N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
H5 - H6				Kořen	X	X	N	N	
				Krček	X	X	N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
H7 - H8				Kořen	X	X	N	N	
				Krček	X	X	N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
I 1 - I 2	Dolní Studénky	Neuvedena	Neznámé	Kořen	X	X	N	N	
				Krček	X	X	N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2		1	N	N	
I 3 - I 4				Kořen	X	X	N	N	
				Krček	X	X	N	N	
				Stonek 1		1	N	N	
				Stonek 2		1	N	N	
I 5 - I 6				Kořen	X	X	N	N	
				Krček	X	X	N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
I 7 - I 8				Kořen	X	X	N	N	
				Krček	X	X	N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
I 9 - I 10				Kořen	X	X	N	N	
				Krček	X	X	N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
J 1 - J 4	Pechova lhota	Neuvedena	Neznámé	Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1		1	N	N	
				Stonek 2		1	N	N	
J 5 - J 8				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	
J 9 - J 12				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2			N	N	

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
J13- J16				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1		1	N	N	
				Stonek 2			N	N	
J17 - J20				Kořen			N	N	
				Krček			N	N	
				Stonek 1			N	N	
				Stonek 2	1				
O2/09/1	CETA Koberice	Californium	Neznámé	Kořen					1,46
				Krček					1,53
				Stonek 1					1,72
				Stonek 2					1,61
O2/09/2				Kořen	1				2,08
				Krček					1,76
				Stonek 1		1			1,89
				Stonek 2		1			1,83
O2/09/3				Kořen					1,65
				Krček					1,56
				Stonek 1		1			1,87
				Stonek 2		1			1,73
O2/09/4				Kořen					1,78
				Krček					1,84
				Stonek 1		1			1,86
				Stonek 2		1			1,75
O3/09/1	CETA Koberice	Ladoga	Neznámé	Kořen					1,87
				Krček	1				1,89
				Stonek 1					1,9
				Stonek 2					1,68
O4/09/1				Kořen	1	1			1,68
				Krček					1,73
				Stonek 1		1			1,71
				Stonek 2					1,86

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
O4/09/2				Kořen					1,68
				Krček	1	1			1,69
				Stonek 1					1,93
				Stonek 2		1			1,54
O4/09/3				Kořen					1,63
				Krček	1	1			1,68
				Stonek 1		1			1,62
				Stonek 2	1	1			1,76
O4/09/4				Kořen	1	1			1,62
				Krček					1,68
				Stonek 1		1			1,63
				Stonek 2					1,84
P1/09/1	Smilovy Hory	Ladoga	Neznámé	Kořen					1,71
				Krček					1,71
				Stonek 1					1,86
				Stonek 2					1,38
P1/09/2				Kořen				1	1,77
				Krček				1	1,8
				Stonek 1					1,74
				Stonek 2		1			1,81
P1/09/3				Kořen				1	1,7
				Krček					1,62
				Stonek 1		1			1,7
				Stonek 2		1			1,62
P1/09/4				Kořen				1	1,79
				Krček				1	1,83
				Stonek 1		1			1,82
				Stonek 2		1			1,79
P1/09/5				Kořen					1,4
				Krček				1	1,93
				Stonek 1		1			1,94
				Stonek 2					1,86

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
Q1/09/1	Šípy - pokus	Neuvedena	Neznámé	Kořen		1			
				Krček		1			
				Stonek 1					
				Stonek 2					
Q1/09/2				Kořen					
				Krček		1			
				Stonek 1					
				Stonek 2					
Q1/09/3				Kořen	1	1			
				Krček	1	1			
				Stonek 1		1			
				Stonek 2					
Q1/09/4				Kořen					
				Krček					
				Stonek 1					
				Stonek 2					
R1/09/1	Výčapy	Liprima	Neznámé	Kořen					1,99
				Krček		1			1,95
				Stonek 1		1			2,82
				Stonek 2		1			1,69
R1/09/2				Kořen					1,96
				Krček		1			1,96
				Stonek 1		1			1,83
				Stonek 2		1			1,65
R1/09/3				Kořen					1,86
				Krček					1,94
				Stonek 1		1			1,94
				Stonek 2		1			1,68
R1/09/4				Kořen					1,82
				Krček	1	1			1,93
				Stonek 1					1,63
				Stonek 2		1			1,81

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
R1/09/5				Kořen					1,55
				Krček					1,71
				Stonek 1					1,7
				Stonek 2					1,64
R2/09/1	Výčapy	Cadeli	Neznámé	Kořen					1,83
				Krček					1,83
				Stonek 1					1,88
				Stonek 2					1,98
R2/09/2				Kořen					1,86
				Krček					1,92
				Stonek 1		1			1,82
				Stonek 2		1			1,93
R2/09/3				Kořen					1,76
				Krček	1				1,84
				Stonek 1					1,77
				Stonek 2		1			1,98
R2/09/4				Kořen					3,01
				Krček					1,94
				Stonek 1		1			1,7
				Stonek 2		1			1,75
R2/09/5				Kořen					2,24
				Krček		1			1,57
				Stonek 1		1			1,71
				Stonek 2		1			1,49
SA4/09/1	Neoznačeno	Neuvedena	Neznámé	Kořen	N	N			1,7
				Krček	N	N			1,83
				Stonek 1	N	N			1,92
				Stonek 2	N	N			1,89
SA4/09/2				Kořen	N	N			1,55
				Krček	N	N			1,47
				Stonek 1	N	N			1,77
				Stonek 2	N	N			1,59

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
SA4/09/3				Kořen	N	N			1,72
				Krček	N	N			1,59
				Stonek 1	N	N			1,81
				Stonek 2	N	N			1,3
SA4/09/4				Kořen	N	N			1,48
				Krček	N	N			1,63
				Stonek 1	N	N			1,97
				Stonek 2	N	N			1,98
SA4/09/5				Kořen	N	N			1,85
				Krček	N	N			1,8
				Stonek 1	N	N			1,74
				Stonek 2	N	N			1,94
SA4/09/6				Kořen	N	N			1,93
				Krček	N	N			1,97
				Stonek 1	N	N			1,95
				Stonek 2	N	N			1,84
SA4/09/7				Kořen	N	N			1,67
				Krček	N	N			1,85
				Stonek 1	N	N			2,15
				Stonek 2	N	N			1,87
SA7/09/1	Neoznačeno	Neuvedena	Neznámé	Kořen	N	N			1,69
				Krček	N	N		1	1,61
				Stonek 1	N	N			1,6
				Stonek 2	N	N			1,67
SA7/09/2				Kořen	N	N		1	1,66
				Krček	N	N		1	1,66
				Stonek 1	N	N			1,89
				Stonek 2	N	N			1,84
SA7/09/3				Kořen	N	N		1	1,52
				Krček	N	N		1	1,68
				Stonek 1	N	N		1	1,8
				Stonek 2	N	N			1,65

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
SA7/09/4				Kořen	N	N		1	1,65
				Krček	N	N			1,7
				Stonek 1	N	N		1	1,74
				Stonek 2	N	N			1,81
SA7/09/5				Kořen	N	N		1	1,72
				Krček	N	N		1	1,56
				Stonek 1	N	N		1	1,48
				Stonek 2	N	N			1,62
SA6/09/1	Neoznačeno	Neuvedena	Neznámé	Kořen	N	N		1	1,81
				Krček	N	N		1	1,6
				Stonek 1	N	N			1,8
				Stonek 2	N	N			1,65
SA6/09/2				Kořen	N	N			1,72
				Krček	N	N			1,82
				Stonek 1	N	N			1,88
				Stonek 2	N	N			1,81
Q1/09/1	Neoznačeno	Neuvedena	Neznámé	Kořen	N	N			1,62
				Krček	N	N			1,56
				Stonek 1	N	N			1,8
				Stonek 2	N	N			1,83
Q1/09/2				Kořen	N	N			1,77
				Krček	N	N			1,63
				Stonek 1	N	N			1,64
				Stonek 2	N	N			1,86
Q1/09/3				Kořen	N	N			1,6
				Krček	N	N			1,64
				Stonek 1	N	N			1,67
				Stonek 2	N	N			1,64
Q1/09/4				Kořen	N	N			1,61
				Krček	N	N			1,62
				Stonek 1	N	N			1,86
				Stonek 2	N	N			1,91

Označení	Lokalita	Odrůda	Datum odběru	Část rostliny	LM	LB	VD	SS	Čistota DNA (A 260/280)
Q1/09/5				Kořen	N	N			1,59
				Krček	N	N			1,71
				Stonek 1	N	N			1,74
				Stonek 2	N	N			1,61

11.3 PŘÍLOHA Č. 3: ANALÝZA ROZPTYLU

V počítačovém programu byla provedena analýza rozptylu, kde bylo vloženo i číslo rostliny. Podstatná je zde tabulka „Homogenous Subsets“, která obsahuje vždy ve sloupcích ty části rostlin (číslované 1 – kořen, 2 – kořenový krček, 3 – stonek 1, 4 stonek 2), které se neliší a další subset se opět uvnitř neliší, ale od ostatní subsetů se liší. Např. u *L. maculans* je první množinou část 1, druhá signifikantně se lišící množina je tvořena částí 4 a 3, třetí významná množina je tvořena částí 2. Proměnné části jsou občas v jiném pořadí.

11.3.1 Analýza rozptylu *Leptosphaeria maculans*

Univariate Analysis of Variance

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable LM					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	92,657 ^a	282	,329	3,418	,000
Intercept	40,889	1	40,889	425,392	,000
ROSTLINA	86,111	279	,309	3,211	,000
CAST	6,546	3	2,182	22,702	,000
Error	80,454	837	,096		
Total	214,000	1 120			
Corrected Total	173,111	1 119			
a. R Squared = ,535 (Adjusted R Squared = ,379)					

Post Hoc Tests

CAST

Multiple Comparisons						
Dependent Variable LM Tukey HSD						
(I) CAST	(J) CAST	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-,21 [*]	,026	,000	-,28	-,15
	3	-,13 [*]	,026	,000	-,19	-,06
	4	-,10 [*]	,026	,001	-,16	-,03
2	1	,21 [*]	,026	,000	,15	,28
	3	,09 [*]	,026	,004	,02	,16
	4	,12 [*]	,026	,000	,05	,19
3	1	,13 [*]	,026	,000	,06	,19
	2	-,09 [*]	,026	,004	-,16	-,02
	4	,03	,026	,696	-,04	,10
4	1	,10 [*]	,026	,001	,03	,16
	2	-,12 [*]	,026	,000	-,19	-,05
	3	-,03	,026	,696	-,10	,04
Based on observed means.						
The error term is Mean Square(Error) = ,096.						
*. The mean difference is significant at the 0,05 level.						

Homogeneous Subsets

LM				
Tukey HSD				
CAST	N	Subset		
		1	2	3
1	280	,08		
4	280		,18	
3	280		,21	
2	280			,30
Sig.	1,000	,696	1,000	
<p>Means for groups in homogeneous subsets are displayed.</p> <p>Based on observed means.</p> <p>The error term is Mean Square(Error) = ,096.</p> <p>a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 280,000.</p> <p>b. Alpha = 0,05.</p>				

UNIANOVA LB BY ROSTLINA CAST

/METHOD=SSTYPE(3)

/INTERCEPT=INCLUDE

/POSTHOC=CAST(TUKEY)

/CRITERIA=ALPHA(0.05)

/DESIGN=ROSTLINA CAST.

11.3.2 Analýza rozptylu *Leptosphaeria biglobosa*

Univariate Analysis of Variance

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable LB					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	131,693 ^a	282	,467	3,240	,000
Intercept	131,657	1	131,657	913,361	,000
ROSTLINA	107,843	279	,387	2,682	,000
CAST	23,850	3	7,950	55,153	,000
Error	120,650	837	,144		
Total	384,000	1 120			
Corrected Total	252,343	1 119			
a. R Squared = ,522 (Adjusted R Squared = ,361)					

Post Hoc Tests

CAST

Multiple Comparisons						
Dependent Variable LB Tukey HSD						
(I) CAST	(J) CAST	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-,33 [*]	,032	,000	-,41	-,25
	3	-,36 [*]	,032	,000	-,45	-,28
	4	-,30 [*]	,032	,000	-,39	-,22
2	1	,33 [*]	,032	,000	,25	,41
	3	-,03	,032	,748	-,11	,05
	4	,03	,032	,810	-,05	,11
3	1	,36 [*]	,032	,000	,28	,45
	2	,03	,032	,748	-,05	,11
	4	,06	,032	,232	-,02	,14
4	1	,30 [*]	,032	,000	,22	,39
	2	-,03	,032	,810	-,11	,05
	3	-,06	,032	,232	-,14	,02
Based on observed means. The error term is Mean Square(Error) = ,144.						
*. The mean difference is significant at the 0,05 level.						

Homogeneous Subsets

LB			
Tukey HSD			
CAST	N	Subset	
		1	2
1	280	,09	
4	280		,40
2	280		,43
3	280		,46
Sig.	1,000	,232	
<p>Means for groups in homogeneous subsets are displayed.</p> <p>Based on observed means.</p> <p>The error term is Mean Square(Error) = ,144.</p>			
<p>a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 280,000.</p>			
<p>b. Alpha = 0,05.</p>			

UNIANOVA SS BY ROSTLINA CAST

```

/METHOD=SSTYPE(3)
/INTERCEPT=INCLUDE
/POSTHOC=CAST(TUKEY)
/CRITERIA=ALPHA(0.05)
/DESIGN=ROSTLINA CAST.

```

11.3.3 Analýza rozptylu Sclerotinia sclerotiorum

Univariate Analysis of Variance

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable SS					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	66,400 ^a	282	,235	4,196	,000
Intercept	14,629	1	14,629	260,672	,000
ROSTLINA	64,871	279	,233	4,143	,000
CAST	1,529	3	,510	9,079	,000
Error	46,971	837	,056		
Total	128,000	1 120			
Corrected Total	113,371	1 119			

a. R Squared = ,586 (Adjusted R Squared = ,446)

Post Hoc Tests

CAST

Multiple Comparisons						
Dependent Variable SS Tukey HSD						
(I) CAST	(J) CAST	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-,07*	,020	,002	-,12	-,02
	3	-,03	,020	,483	-,08	,02
	4	,03	,020	,483	-,02	,08
2	1	,07*	,020	,002	,02	,12
	3	,04	,020	,141	-,01	,09
	4	,10*	,020	,000	,05	,15
3	1	,03	,020	,483	-,02	,08
	2	-,04	,020	,141	-,09	,01
	4	,06*	,020	,023	,01	,11
4	1	-,03	,020	,483	-,08	,02
	2	-,10*	,020	,000	-,15	-,05
	3	-,06*	,020	,023	-,11	-,01

Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = ,056.

*. The mean difference is significant at the 0,05 level.

Homogeneous Subsets

SS				
Tukey HSD				
CAST	N	Subset		
		1	2	3
4	280	,07		
1	280	,10	,10	
3	280		,13	,13
2	280			,17
Sig.	,483	,483	,141	
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
Based on observed means.				
The error term is Mean Square(Error) = ,056.				
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 280,000.				
b. Alpha = 0,05.				