

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra ochrany rostlin



**Rezistence k fungicidům v populaci *Venturia inaequalis*
v České republice**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Tereza Schneebergerová, DiS.

Obor studia: Rostlinolékařství AML

Vedoucí práce: Ing. Jana Mazáková, Ph.D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svojí diplomovou práci "Rezistence k fungicidům v populaci *Venturia inaequalis* v České republice" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12.4.2019

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Janě Mazákové, Ph.D. za odborné vedení, připomínky a rady, které mi poskytla během zpracování mé diplomové práce.

Rezistence k fungicidům v populaci *Venturia inaequalis* v České republice

Souhrn

Cílem diplomové práce bylo testování reakce izolátů původce strupovitosti jabloň *Venturia inaequalis* vůči vybraným účinným látkám fungicidů pomocí *in vitro* metody na agaru.

V České republice byl v posledních letech u některých výsadeb jabloň zaznamenán pokles účinnosti fungicidů, což je spojeno s fenoménem vzestupu kmenů v populaci *V. inaequalis* rezistentních k systémovým přípravkům. Vzhledem k tomu, že jabloň je nejpěstovanější druh ovocné plodiny v ČR a náklady na ochranu proti jejím chorobám tvoří hlavní roční výdaje při jejím pěstování, je nutné se této problematice dostatečně věnovat.

Vzorky listů s příznaky napadení byly pro pokusy odebrány ze tří lokalit (Praha-Suchdol, Roztoky u Prahy a Miličín). Nejprve byly z čerstvě nasbíraných listů odebrány konidie, které byly následně rozetřeny na slabé vrstvě vodního agaru. Druhý den byly pomocí inverzního světelného mikroskopu vyhledávány klíčící konidie, které byly jehlou opatrně vypíchnuty a přeneseny na CYGA. Po nárůstu dostatečně velké kolonie *V. inaequalis* na CYGA byly izoláty přeočkovány na PDA, na kterém byly namnoženy pro následné testování. Tímto způsobem izolace bylo získáno celkem 19 izolátů patogena *V. inaequalis*. Testy citlivosti izolátů patogena byly provedeny na PDA s obsahem účinných látek (*pyraclostrobin*, *boscalid*, *tebuconazole* nebo *trifloxystrobin*) o určité koncentraci (0,001; 0,01; 0,1; 1 nebo 10 $\mu\text{g/ml}$). Testy byly provedeny v 9 opakováních.

Reakce izolátů *V. inaequalis* k účinku fungicidních látek byly velmi různorodé. U testovaných izolátů nebyla zaznamenána postupná ani „skoková“ inhibice růstu mycelia vlivem různých koncentrací fungicidní látky, ale naopak u velkého počtu izolátů docházelo vlivem účinných látek fungicidů spíše ke stimulaci jejich růstu. U všech testovaných izolátů se projevila určitá míra snížené citlivosti ke všem účinným látkám. Nejméně snížená citlivost izolátů byla zaznamenána k účinné látce *boscalid*, nejvíce snížená citlivost k účinné látce *trifloxystrobin*.

Klíčová slova: jabloň, strupovitost, rezistence, fungicidy, *Venturia inaequalis*

Fungicide resistance in population of *Venturia inaequalis* in the Czech Republic

Summary

The aim of this diploma thesis is testing reactions of isolates against selected active components of fungicides, which are used against *Venturia inaequalis* (Apple scab).

In last years, have been noticed the decrease of fungicidal efficiency in many Czech orchards. At the same time was found resistance to systemic fungicides. Because of apple trees are the most plant fruit and the main part of year cost is on plant protection. So, is necessary to pay attention to this problem.

The samples were taken from three locations (Prague – Suchdol, Roztoky and Miličín). Firstly, from fresh leaves were washed off conidia. Then, after this, they were spread along thin layer of agar. Next day, germinate conidia were searched by inverted microscope and took on new agar. After this, they were incubated in 20°C, until they grown to enough large colony of *V. inaequalis*. New colony were again re-inoculated on new agar. For every variant were made special agar with active components (*pyraclostrobin*, *boscalid*, *tebuconazole* or *trifloxystrobin*) with different concentration (0.001, 0.01, 0.1, 1 or 10). When agar gelled, it was incubated by testing isolates, three spots in to one Petri's dish. After one month, were measured they grow.

Because of the reaction of *V. inaequalis* on fungicides were various, the results were summed up very detailed. The reactions of testing isolates were stimulation of grow, instead of their inhibition. This is reason why, every result of fungicide contains tabs with % growth, instead of % growth inhibition, because the results would be in negative values.

From these four active components, the sensitivity was the most decrease in *trifloxystrobin* and a little decrease in *boscalid*.

Keywords: apple-tree, apple scab, fungicide, resistance, *Venturia inaequalis*

Obsah

| | |
|---|-----------|
| 1 Úvod | 8 |
| 2 Cíl práce a vědecká hypotéza | 9 |
| 3 Literární rešerše | 10 |
| 3.1 Původce strupovitosti jabloně <i>Venturia inaequalis</i> | 10 |
| 3.1.1 Popis a taxonomické zařazení..... | 10 |
| 3.1.2 Rozšíření a ekologie..... | 11 |
| 3.1.3 Biologie a vývojový cyklus | 12 |
| 3.1.4 Projevy onemocnění | 14 |
| 3.1.5 Fyziologické rasy <i>Venturia inaequalis</i> | 15 |
| 3.2 Metody ochrany | 16 |
| 3.2.1 Agrotechnické metody (nepřímá ochrana) | 16 |
| 3.2.2 Rezistence <i>Malus</i> spp. vůči <i>Venturia inaequalis</i> | 17 |
| 3.2.3 Chemická ochrana (přímá ochrana) | 18 |
| 3.2.4 Biologická ochrana a látky na podporu zdravotní stavu..... | 21 |
| 3.3 Rezistence patogena vůči fungicidům | 21 |
| 3.3.1 Vznik rezistence..... | 22 |
| 3.3.2 Rezistence <i>Venturia inaequalis</i> | 25 |
| 3.3.2.1 Methyl benzimidazol karbamáty | 25 |
| 3.3.2.2 Dodine | 26 |
| 3.3.2.3 DMI fungicidy | 27 |
| 3.3.2.4 QoI fungicidy..... | 27 |
| 3.3.2.5 Anilinopyrimidiny | 28 |
| 3.3.2.6 SDHI fungicidy | 28 |
| 4 Metodika | 29 |
| 4.1 Odběr vzorků | 29 |
| 4.2 Izolace patogena | 30 |
| 4.2.1 Materiál | 30 |
| 4.2.2 Postup..... | 30 |
| 4.3 Příprava monosporických izolátů | 31 |
| 4.3.1 Materiál | 31 |
| 4.3.2 Postup..... | 31 |
| 4.4 Přeočkování kolonií monosporických izolátů | 31 |
| 4.4.1 Materiál | 31 |
| 4.4.2 Postup..... | 32 |
| 4.5 Testy citlivosti izolátů k účinným látkám | 32 |
| 4.5.1 Materiál | 32 |

| | | |
|-------|----------------------------|----|
| 4.5.2 | Postup..... | 32 |
| 4.6 | Vyhodnocení výsledků | 33 |
| 5 | Výsledky | 34 |
| 5.1 | Pyraclostrobin | 34 |
| 5.2 | Boscalid | 35 |
| 5.3 | Tebuconazole | 35 |
| 5.4 | Trifloxystrobin..... | 36 |
| 6 | Diskuze | 39 |
| 7 | Závěr..... | 42 |
| 8 | Literatura..... | 43 |
| 9 | Samostatné přílohy | I |
| 9.1 | Seznam příloh | I |

1 Úvod

Produkce jablek v České republice je v rámci celého ovocnářství nejdůležitější. V roce 2017 byla jejich spotřeba 22 kg na osobu, což z nich činí významnou komoditu. Odhadem v roce 2018 bylo v ČR vypěstováno 128 tis. tun jablek a v celé Evropské unii to bylo kolem 12 mil. tun. Sucho v roce 2018 silně zasáhlo především letní odrůdy, které v mnoha případech nebyly ani nesklizeny. Dále se letní vedra na ovoci projevila popálením slupky, horším vybarvováním plodů (zejména u odrůd skupiny 'Jonagold', 'Šampion') a zhoršením kvality dužiny během dlouhodobějšího skladování. Jediným pozitivem sucha byla nižší potřeba zásahů proti strupovitosti jabloně (Buchtová 2018).

Jabloně jsou hostiteli více než 70 infekčních chorob, z nichž převážná část je způsobena fytopatogenními houbami. Houbové choroby mohou vyvolat hnilobu kořenů, listovou skvrnitost, spálu listů a květů, hnilobu plodů, skvrnitost plodů, předčasný opad listů a nádorovitost kmene, větví a výhonů. Další jsou choroby způsobené bakteriemi, fytoplasmami a viry. Náklady na ochranu proti chorobám tvoří hlavní roční výdaje při pěstování jabloní. Úspěšná ochrana proti chorobám vychází obvykle z kombinace několika metod, např. užití rezistentních podnoží a odrůd, fungicidů, bioagens a úpravy prostředí (Grovel 2003).

V České republice byl v posledních letech u některých výsadeb, zaznamenán pokles účinnosti fungicidů. Zároveň se objevil nástup rezistence k systémovým přípravkům na bázi triazolových účinných látek (Rostlinolékařský portál 2019). Vzhledem k tomu, že jde o nejpěstovanější druh ovocné plodiny, je důležité se této problematice věnovat.

2 Cíl práce a vědecká hypotéza

Hypotéza práce: V populaci původce strupovitosti jabloně (*Venturia inaequalis*) se nacházejí izoláty, které jsou rezistentní k některým běžně používaným účinným látkám fungicidů.

Cíl práce: U izolátů *Venturia inaequalis* získaných z různých lokalit pěstování jabloně testovat jejich reakci k vybraným účinným látkám fungicidů, které jsou běžně aplikovány při ochraně jabloní proti původci strupovitosti jabloně.

3 Literární rešerše

3.1 Původce strupovitosti jabloně *Venturia inaequalis*

Rod *Venturia* byl pojmenován podle italského botanika a mykologa Carla Antonia Venturiho (1805–1864). Druhový název *inaequalis* pochází z latiny a znamená nestejný nebo nerovnoměrný. Odkazuje tím na typický tvar dvoubuněčných spor pohlavního stadia – askospor (Juroch 2010).

V současnosti se do rodu *Venturia* řadí kolem 200 druhů, většinou jde o původce chorob okrasných a ovocných dřevin, *Venturia pyrina*, *Venturia carpophila*, *Venturia saliciperda* atd. Strupovitost jabloně, jejímž původcem je *Venturia inaequalis* představuje v současnosti hospodářsky nejvýznamnější chorobu jabloní (Juroch 2010). Mezi náchylné odrůdy patří ‘Gloster’, ‘Golden Delicious’, ‘Jonagold’ a jeho mutace, ‘MacIntosh’, ‘Spartan’ nebo ‘Šampion’. K tolerantním odrůdám patří ‘Bláhovo červené’, ‘Boskoopské červené’ a ‘Watervlietské mramorované’. Postupně jsou zaváděny rezistentní odrůdy jako ‘Angold’, ‘Florina’, ‘Julia’, ‘Karmina’, ‘Lipno’, ‘Melodie’, ‘Rozela’, ‘Sirius’ nebo ‘Topaz’ (Ackermann 2014).

3.1.1 Popis a taxonomické zařazení

Oddělení vřeckovýtrusých hub (Ascomycota) zahrnuje něco kolem 33 000 druhů hub, které osidlují široké spektrum stanovišť. Jsou součástí půdní mikroflóry nebo parazitují na povrchu i vně těl rostlin a živočichů (Novák & Skalický 2009). Hlavním určujícím znakem vřeckovýtrusých hub je jejich produkce spor, tzv. askospor, jejich pohlavní rozmnožování, průběh a vznik rozmnožovacích struktur (Petersen 2013).

Charakteristickým znakem třídy Dothideomycetes je tvorba vřecek, v nichž po meióze a mitózách dochází ke vzniku 8 haploidních askospor. Vřecka se tvoří v plodnicích, tzv. pseudoperitheciích. Plodnice je kulovitého tvaru, tmavohnědá až černá, 90–150 µm velká, obsahuje asi 50–100 vřecek. Válcovitá vřecka rodu *Venturia* mají dvouvrstvou stěnu, 55–75 x 6–12 µm velkou. Askospory jsou žlutavě zelené až žlutohnědé, 11–16 x 5–7 µm velké. Jsou dvoubuněčné, horní buňka je kratší a širší než spodní (Juroch 2010).

Nepohlavní rozmnožování se uskutečňuje konidiiemi, vznikajícími konidiogenezí. Konidie jsou jednobuněčné nebo dvoubuněčné, světle až tmavě olivově zeleně zbarvené, opačně kyjovitého, hruškovitého nebo někdy nepravidelného tvaru, na konci zašpičatělé,

20–30 µm dlouhé. Vznikají na konidioforech a tvoří se postupně během období sporulace. Konidiofory jsou krátké, nečláňkované, vyrůstají z hnědého mycelia na povrch listů trhlinami v kutikule (Juroch 2010).

Askospory i konidie klíčí na povrchu rostlinných pletiv ve vodním prostředí, vzniká klíčící vlákno a na jeho konci se tvoří apresorium, které penetračním hrotem naruší kutikulu a proniká do mezibuněčných prostor mezi kutikulou a epidermis (tzv. subkutikulární mycelium). Následně do buněk prorůstají haustoria, která využívají zásobní látky buněk, postupně dochází ke kolonizaci okolních buněk a k jejich nevratnému poškození, což se projevuje i změnou zbarvení napadených pletiv (Juroch 2010).

Tabulka č. 1: Taxonomické zařazení (indexfungorum 2019)

| | |
|----------|--|
| Říše | <i>Fungi</i> |
| Oddělení | <i>Ascomycota</i> |
| Podkmen | <i>Pezizomycotina</i> |
| Třída | <i>Dothideomycetes</i> |
| Podtřída | <i>Pleosporomycetidae</i> |
| Řád | <i>Venturiales</i> |
| Čeleď | <i>Venturiaceae</i> |
| Rod | <i>Venturia</i> |
| Druh | <i>Venturia inaequalis</i> (Cooke) G.Winter (1875) |

3.1.2 Rozšíření a ekologie

Nepohlavní stadium, které představují konidie, poprvé popsal švédský mykolog Elias Magnus Fries (1794–1878) v roce 1819. A už v roce 1834 byl patogen zaznamenán v New Yorku, kam se nejspíše dostal se zbožím z Evropy (Westcott 2008). Pohlavní stadium, které představují plodničky a askospory, však popsal až Mordecai Cubitt Cooke (1825–1914) v roce 1866. Až do roku 1887 se také předpokládalo, že jde o dva různé druhy hub (Sandskär 2003).

Původce choroby má vyhraněné ekologické nároky, ale jeho vývoj probíhá v poměrně širokém rozpětí vnějších podmínek. Objevuje se především v oblastech s oceánským podnebím, v oblastech s kontinentálním charakterem podnebí spíše v chladnějších a humidních podhorských polohách. Šíří se hlavně za deštivého počasí, a to i závlahovou vodou z povrchových zavlažovacích zařízení (Juroch 2010). Pokud je jaro a začátek léta suchý, či s minimálními srážkami, může být výskyt strupovitosti omezen (Korsgaard 2014).

Kromě rodu *Malus spp.* napadá *V. inaequalis* i rody *Crataegus spp.*, *Sorbus spp.* a *Pyracantha spp.* (Jones 1990).

3.1.3 Biologie a vývojový cyklus

V. inaequalis je fakultativní patogen. Během vegetačního období parazituje na orgánech hostitele (hlavně listy a plody), během vegetačního klidu dokončuje svůj životní cyklus a přezimuje v podobě pseudoperithecií na opadaném listí (MacHardy 1996).

Na počátku vegetace ve věckách dozrávají dvoubuněčné spory (askospory), jejich dozrávání je ovlivněno teplotou, ale jejich uvolňování závisí na dešťových srážkách. Při navlhčení věcko nabobtná a ve špičce praskne. Spory jsou vymrštěny do vzduchu a dále větrem roznášeny do okolí. V tomto případě se jedná o primární infekci, jejíž nebezpečí začíná v období rašení pupenů a končí po úplném rozkladu loňských listů, což je u nás na konci června. Toto období trvá přibližně 5–9 týdnů (Blažek 2001; Naqvi 2004). Vrcholem výskytu askospor je období od fáze růžových pupat do plného květu (Naqvi 2004).

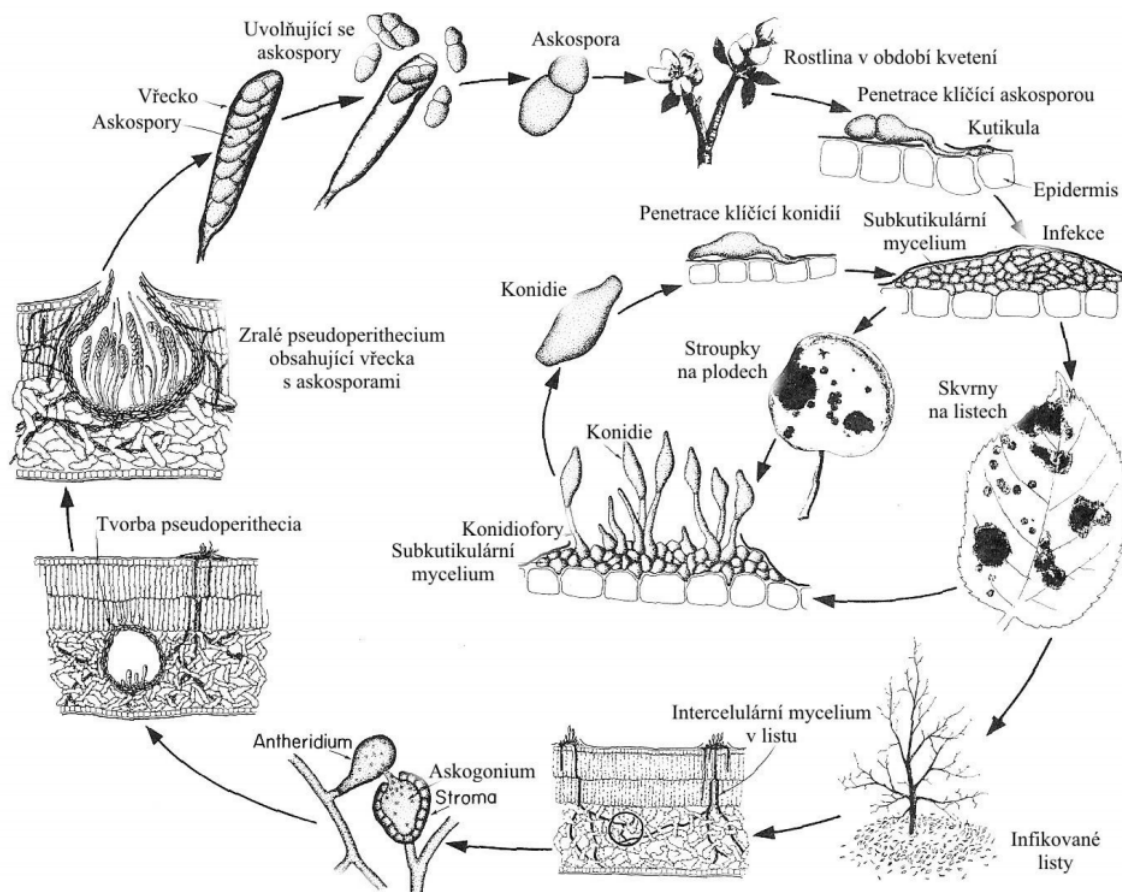
Když spory dopadnou na vlhký list, začnou klíčit a prorůstají listovou pokožkou. Po určité době (tabulka č.2) se objevují na listech nebo plodech skvrny, na kterých se tvoří konidiofory s konidiiemi (Blažek 2001).

Tabulka č. 2: Milsova tabulka pro podmínky infekce jabloně houbou *V. inaequalis* (Blažek 2001)

| Podmínky pro infekci houbou <i>Venturia inaequalis</i> (dle Millse 1951) | | | | | |
|---|---|----------------|--------------|--|---|
| Průměrná teplota během ovlhčení (°C) | Doba ovlhčení povrchu listů (v hod.) nutná pro vznik infekce | | | Inkubační doba | |
| | slabé | střední | silné | | |
| 0,5 - 5,0 | déle než dva dny | | více než 60 | Průměrná denní teplota od vyklíčení spor | Počet dní od vzniku infekce do prvních příznaků choroby |
| 5,1 - 5,4 | 28 | 60 | 60 | | |
| 5,5 - 5,9 | 25 | 35 | 60 | | |
| 6,0 - 6,4 | 22 | 32 | 50 | | |
| 6,5 - 6,9 | 21 | 29 | 45 | | |
| 7,0 - 7,4 | 20 | 26 | 40 | | |
| 7,5 - 7,9 | 19 | 25 | 37 | | |
| 8,0 - 8,4 | 17 | 23 | 34 | | |
| 8,5 - 8,9 | 15 | 21 | 30 | | |
| 9,0 - 9,4 | 15 | 20 | 29 | | |
| 9,5 - 9,9 | 14 | 19 | 28 | | |
| 10,0 - 10,4 | 13 | 18 | 27 | | |
| 10,5 - 10,9 | 13 | 18 | 26 | | |
| 11,0 - 11,4 | 12 | 17 | 25 | 2,2 | 19 |
| 1,5 - 11,9 | 2 | 7 | 24 | 3,9 | 18 |
| 12,0 - 12,4 | 11 | 16 | 24 | 5,5 | 17 |
| 12,5 - 12,9 | 11 | 15 | 23 | 7,2 | 16 |
| 3,0 - 13,4 | 10 | 15 | 22 | 8,6 | 15 |
| 13,5 - 13,9 | 10 | 14 | 21 | 10,8 | 14 |
| 14,0 - 14,4 | 9 | 14 | 21 | 12,7 | 13 |
| 14,5 - 15,4 | 9 | 13 | 20 | 15,6 | 12 |
| 15,5 - 15,9 | 9 | 13 | 19 | 16,1 | 11 |
| 16,0 - 16,9 | 9 | 12 | 19 | 17,8 | 10 |
| 17,0 - 24,0 | 9 | 12 | 18 | 19,5 | 9 |
| 24,5 | 10 | 12 | 19 | 21,4 | 8 |
| 25 | 11 | 14 | 21 | 23,7 | 7 |

V obdobích, kdy rašení pupenů předchází relativně teplé počasí a dostatečná vlhkost, je velká šance, že se vytvoří a uvolní značné množství zralých a životaschopných askospor. Naopak během chladnějšího a suššího jara může být dozrávání pseudoperithecií zpomaleno (Naqvi 2004).

Konidie jsou letní spory, které způsobují sekundární infekci. Jsou splavovány vodou a nešíří se na větší vzdálenost. Doba ovlhčení listů nutná ke splnění podmínek pro infekci je závislá na teplotě během ovlhčení. Příklad: Pokud bude průměrná teplota během ovlhčení 6 °C, tak po 22 hodinách už vzniká slabá infekce. Když ale teplota bude 12 °C, tak slabá infekce vznikne už po 11 hodinách (Blažek 2001).



Obrázek č. 1: Infekční cyklus *Venturia inaequalis* přeloženo z Agrios (2005)

Během sezóny může dojít k několika infekčním cyklům v závislosti na náchylnosti hostitele a povětrnostních podmínkách. Za příznivých podmínek mohou tyto sekundární cykly způsobit obrovské ztráty a zajistit dostatečné množství inokula pro přezimování (Naqvi 2004).

3.1.4 Projevy onemocnění

Nejprve se objevují světlé, olivově-zelené nepravidelné skvrny na listech nebo na spodní straně kališních lístků (Agrios 2005). Jde o podhoubí s konidii rozrostlými po svrchní pokožce listu (Zacha et al. 1989). Krátce nato léze dostávají šedý nádech, až s jakoby sametovým povrchem. Později může barva přejít do kovově černé s mírným vyvýšením (Agrios 2005).

Léze na starších listech se obecně tvoří na svrchní straně. Na pletivu mohou být pozorovány jednotlivě nebo se mohou spojit do jedné větší skvrny. Pokud je infikován mladý list, zůstává malý, lehce zvlňněný a předčasně opadá (Agrios 2005). Podobné skvrny se mohou vytvořit na květenství, kalichu, okvětních plátcích nebo plůdcích. Mohou se objevit i na větvích, ale to je méně časté (Westcott 2008).

Na plodech jsou skvrny kruhového tvaru, lehce vystouplé a takéž olivově zelené až tmavě hnědé. Jak plody rostou, stávají se více strupovité, pokožka praská a později korkovatí. Po opadu mycelia se může objevit světlejší pokožka plodu. Léze jsou nejčastější v blízkosti kališní jamky, pokud jich je hodně, plody se rozpadají. U plůdků, které byly infikovány časněji, dochází k jejich deformacím a předčasnému opadu (Agrios 2005; Westcott 2008).

Čím dříve se infekce na plodu rozvine, tím jsou škody větší. Na vyvinutých plodech již nedochází k praskání plodů, ale i tak jsou skvrny nežádoucí a zhoršují kvalitu a trvanlivost ovoce (Zacha et al. 1989). *V. inaequalis* může napadnout i nevyzrálé dřevo a v kůře dokáže vydržet až 5 let (Jackson 2003).

3.1.5 Fyziologické rasy *Venturia inaequalis*

Fyziologickou rasou je označována populace *V. inaequalis*, která nese určitý znak virulence nebo avirulence ke specifickým genotypům (odrůdám) rodu *Malus*, které se označují jako diferenciační sada. Šlechtitelé tyto rasy vyčlenili a definovali, kvůli jejich schopnosti vyvolat/nevyvolat tvorbu sporulujících lézí na druzích rodu *Malus* a jejich odrůdách (genotypech) (MacHardy 1996). Jako fyziologická rasa je tedy míněn izolát, který je schopen překonat rezistenci hostitele (Bus et al. 2011), infikovat a sporulovat na konkrétním specifickém hostiteli (Gessler 2006).

Rasa 1 se běžně vyskytuje na území USA a v dalších zemích. Její schopnost spolurace na běžných komerčních odrůdách je dobrá, vyvolává skvrny nebo nekrotické léze. Pouze na odrůdě 'Dolgo', ruské odrůdě R12740-7A druhu *Malus pumila* a odrůdě 'Geneva' nesporeluje (Jamar 2011).

Rasa 2 je schopna infikovat tři odrůdy: 'Dolgo', ruskou odrůdu R12740-7A a odrůdu 'Geneva'. Existují teorie, že tato rasa vznikla z dovozu ruského rostlinného materiálu (Sandskär 2003; Jamar 2011).

Rasa 3 je charakteristická tím, že vytváří značně sportující léze na odrůdě 'Geneva', jinak je stejná jako rasa 1. Objevena byla v Kanadě (Gessler 2006).

Rasa 4 byla detekována u semenáčků odolných vůči škůdcům, šlo o potomky ruské odrůdy R12740-7A (Sandskär 2003; Jamar 2011).

Rasa 5 je charakteristická schopností infikovat rostliny, jejichž rezistence je založena na „pit gene“ typu (gen rezistence *Vm*). Objevena byla u *Malus x micromalus* a *Malus x atrosanguinea* v Anglii (Sandskär 2003; Jamar 2011).

Rasa 6 byla poprvé popsána na odrůdě 'Prima' (gen rezistence *Vf*) v Německu v roce 1984. Izoláty této rasy infikovaly i jiné odrůdy s genem *Vf*, ale *Malus floribunda* 821 zůstala odolná (Parisi et al., 1993). Virulenci této rasy dále zkoumali Parisi et al. (1996) i u jiných odrůd jabloně, přičemž zjistili, že tato rasa je schopná vyvolat příznaky téměř u všech 37 testovaných odrůd s *Vf* genem rezistence, kromě odrůdy 'Granny Smith' a dalších tří odrůd s jinými geny rezistence (*Vbj*, *Vr* a *Va*). Také zjistili, že většina genů způsobujících rezistenci u planých odrůd se s procesem šlechtění ztrácí. A též zdůraznili důležitost polygenních zdrojů rezistence.

Rasa 7 (anglická rasa) se kromě Anglie, vyskytuje i ve Francii, Belgii, Nizozemsku, Itálii nebo Švýcarsku. Izoláty z přirozeně infikovaného druhu *Malus floribunda* způsobily léze na *Malus floribunda* 821 a některých *Vf* kultivarech, zatímco na jiných *Vf* kultivarech se neobjevily (Bus et al. 2005).

Rasa 8 je poměrně nově objevenou rasou, o které se před rokem 1993 nevědělo. Vyskytuje se na Novém Zeelandu, je schopna překonat dosud neznámé nestabilní rezistence kódované genem *Vh8* (Bus et al. 2005).

3.2 Metody ochrany

3.2.1 Agrotechnické metody (nepřímá ochrana)

Do nepřímých metod ochrany patří obecně známé a využívané principy, tzv. správná zemědělská praxe. Dále jde o preventivní opatření, zejména agrotechnická, která je nutné dodržovat při zakládání sadů. Jsou to všechna opatření, která omezují vhodnost podmínek pro šíření patogena, např.: výběr stanoviště, dostatečná izolační vzdálenost, vyrovnaná výživa, doplňková závlaha, certifikovaný sadbový materiál, zásady správného řezu atd. (Kužma 2002).

Mezi základní důležitá opatření spadá výběr dostatečně vzdušných lokalit, kde se dlouho nadržuje mlha. Důležité je i vyhnout se zbytečnému přehnojení, to způsobuje rychlý nárůst listové plochy, která musí být ošetřována v kratších intervalech. K omezení výskytu přispívá i správný řez; nepřehoustlé koruny rychleji osychají, a tím jsou omezeny vhodné podmínky pro rozvoj patogena. Samozřejmostí by měla být likvidace zdroje infekce podzimním postřikem močovinou (5% roztok močoviny, 1000 l vody/ha) nebo sběr a likvidace listů (Kloutvorová 2015).

3.2.2 Rezistence *Malus* spp. vůči *Venturia inaequalis*

V současnosti je průměrná životnost komerčního sadu 12–15 let, proto je výběr správné odrůdy velmi důležitý. Kromě výnosu, kvality plodů a nenáročnosti na pěstování by měly být vybírány i odrůdy rezistentní vůči původcům chorob a škůdcům, zvláště v integrovaném a ekologickém systému pěstování (Jamar 2011).

Ovocné odrůdy jsou klony, které se množí roubováním, díky tomu je možné zachovat znaky, které by se jinak pohlavním rozmnožováním ztratily. Nové odrůdy jsou šlechtěny buď s cílem oligogenní rezistence (jeden majorgen a několik minorogenů) nebo s cílem polygenní rezistence (řízena sadou minorogenů). Při šlechtění je využíváno několik genů rezistence, které jsou monogenní: *Vf*, *Vr*, *Va*, *Vb*, *Vbj*, *Vm*, *Vg*, *Vh*, *Vdg* a *Vd* (Lespinasse 1989; Vávra 2015).

Většina genů rezistence pochází z druhů *M. floribunda* a *M. pumila*, u nichž je rezistence vůči *V. inaequalis* založena oligogenně. Rezistence způsobená genem *Vm*, který vyvolává hypersenzitivní reakci u hostitele byla rychle prolomena. Nejběžnějším genem rezistence, který se využívá pro získání nových odrůd odolných k *V. inaequalis* je gen *Vf* pocházející z *M. floribunda*. Např. z 53 rezistentních odrůd běžně pěstovaných v Itálii a Švýcarsku, má 40 odrůd rezistenci založenou na přítomnosti genu *Vf*, u 6 odrůd je *Vr* rezistence, *Va* rezistenci mají 2 odrůdy, další 2 odrůdy mají *Vm* rezistenci. Pouze 3 odrůdy mají rezistenci založenou na kombinaci *Vf* a *Va* (Geesler et al. 2006).

Výhodou monogenní rezistence je, že 40–50 % potomků získá rezistenci. Nicméně rodiče jsou botanické druhy, které mají malé plody se slabšími organoleptickými kvalitativními charakteristikami. Tento typ rezistence se navíc snadno prolomí novými fyziologickými rasami (Lateur et al. 1999).

Lespinasse (1989) poukazuje na to, že řada *Malus* spp. má polygenní rezistenci, jenž se objevuje u několika starých evropských odrůd.

Pokud jde o kombinování typů rezistence, lze kombinovat monogenní zdroje mezi sebou, polygenní mezi sebou, anebo monogenní s polygenními. Tím se propojí účinnost s dlouhodobějším trváním genetické ochrany v jedné rostlině (Laurens 1999).

V České republice se šlechtěním rezistentních odrůd zabývá ÚEB AV ČR ve Střížovicích a VŠÚO Holovousy. České odrůdy patří mezi ty nejkvalitnější a jsou běžně pěstovány v Evropě, především v systémech ekologického pěstování (Juroch 2010).

V poslední době dochází k rostoucí popularitě českých odrůd (tabulka č. 3), jako jsou 'Rubinola', 'Rajka', 'Goldstar' a 'Topaz'. Chutí, vzhledem a skladovatelností mohou soutěžit i s odrůdou 'Jonagold' (Sosna 2014).

Tabulka č. 3: Příklady českých rezistentních odrůd jableň (Nesrsta 2016)

| Název | Poznámky |
|-------------------|----------|
| Ametyst | Letní |
| Diana | Letní |
| Mínerva | Podzimní |
| Admirál | Zimní |
| Karneval | Zimní |
| Lipno | Zimní |
| Luna | Zimní |
| Redspring | Zimní |
| Red Topaz | Zimní |
| Rozela | Zimní |
| Sirius | Zimní |
| Sonet | Zimní |
| Tábor | Zimní |
| UEB 32642 (Opál®) | Zimní |
| Vltava | Zimní |

3.2.3 Chemická ochrana (přímá ochrana)

Mezi přímé metody ochrany patří aplikace fungicidů, mělo by jít ale o poslední ochranné opatření, pokud jiné přímé a nepřímé metody selžou (Juroch 2010). Aby chemická ochrana byla úspěšná, je důležité zvládnutí primární infekce v období dubna–června, čímž se vyloučí potřeba dalších ošetření proti sekundární infekci, která se objevuje od července do sklizně (Hluchý et al. 1997).

Je potřeba věnovat pozornost v ochraně na začátek vegetace, aby se listy i plody udržely čisté do doby, než dojde k rozkladu loňských listů a houba ukončí výlet askospor, čímž zároveň poklesne i šíření sekundární infekce (Lánský & Kloutvorová 2014). Podle Jonese (1990) pokud se na jaře dostatečně sníží počet askospor, může se upustit od aplikace fungicidů ve fázi BBCH 03 a BBCH 09. Dosáhnout toho lze buď aplikací dusíku na podzim na spadané listy nebo podzimní aplikací fungicidů před či po opadu, které by měly zabránit vývoji pseudoperithecií.

Vzhledem k životnímu cyklu původce choroby je nutné provádět chemickou ochranu preventivně, a to buď paušálně v 5–8denním intervalu nebo před deštěm. Postřik musí na

listech i plodech zaschnout, větší dešťové srážky by fungicid smyly (Lánský & Kloutvorová 2014).

Při preventivní ochraně se ošetřuje průběžně po celou dobu nebezpečí primární infekce. Podle lokality a podmínek se ošetřuje 1 týden od vyrašení až do období 2–3 týdny před sklizní, a to v intervalech 5–10 (14) dní. Interval mezi postřiky by měl zohlednit infekční tlak, intenzitu růstu hostitele a možnosti použitého fungicidu. Maximální intenzita ochrany by měla být prováděna od fenofáze růžového poupěte (BBCH 57). Rozhodujícím faktorem by však měl být průběh počasí. Ošetřovat by se mělo před dešťovými srážkami. Pokud nastane neočekávaný déšť, je nutné stromy ošetřovat kurativně (Jones 1990; Juroch 2010).

Kontaktní fungicidy

Účinná látka těchto přípravků neproniká do rostliny, ale zůstává na povrchu na místech, kam dopadla. Proto je důležité dokonalé a rovnoměrné pokrytí ošetřované plochy. Některé kontaktní přípravky, např. Mythos 30 SC, mají hloubkový nebo translaminární účinek, to znamená, že pronikají do pletiv rostlin na spodní stranu listu nebo i na stonek. Nejsou však rozváděny cévními svazky a nechrání nové přírůstky rostliny po aplikaci (Lánský & Kloutvorová 2014). Kontaktní fungicidy se využívají v systémech ošetřování k preventivním ochranným zásahům, protože nevykazují kurativní účinnost, např. Dithane, Thiram Granuflo. Některé přípravky mají kurativní účinek omezený, např. Mythos 30 SC (Lánský & Kloutvorová 2014).

Výhodou je, že účinkují už od nízkých teplot a nejsou ohroženy vznikem rezistence, či je toto riziko velmi nízké. Hodí se proto k přerušení sledu ošetřování systémovými přípravky (včetně strobilurinů). Jsou dobře využitelné v raných fázích vegetace, kdy ještě není dostatečně vyvinutá listová plocha (Lánský & Kloutvorová 2014).

Jejich nevýhodou je, že v době intenzivního růstu stromu a rychlého narůstání listové plochy dochází ke snížení pokryvu, protože nově narůstající listy již nejsou chráněny postřikem (Lánský & Kloutvorová 2014).

Systémové fungicidy

Účinné látky těchto fungicidů působí nejen na povrchu rostlin, ale pronikají i do pletiv, kde jsou pomocí cévních svazků rozváděny do dalších částí rostlin. Jejich specifikem je jednobodový mechanismus účinku. Většina účinných látek systémových přípravků používaných proti strupovitosti se šíří akropetálně a případně translaminárně. To zaručuje ochranu i nových přírůstků. Kromě preventivního působení mají i různou délkou kurativní účinnosti, to znamená, že inhibují růst mycelia uvnitř listu (Lánský & Kloutvorová 2014). Systémové fungicidy jsou účinné až 96 hodin od vzniku infekce (Jackson 2003).

Nicméně je lepší tyto kurativní přípravky využívat spíše preventivně, protože je s nimi spojeno riziko vzniku rezistence. U některých výsadeb v České republice byl v minulých letech zaznamenán pokles účinnosti a nástup rezistence v populacích *V. inaequalis* k fungicidům obsahujícím účinné látky *myclobutanil* nebo *flusilazole* (Lánský & Kloutvorová 2014).

Aby mohl být fungicid používán kurativně, je nutné nejdříve prokázat infekci. A to lze jen se spolehlivou signalizační technikou, která na základě měření teploty a délky ovlhčení listů přesně určí dobu splnění podmínek pro rozvoj houby. Další nezbytnou podmínkou je výkonná aplikační technika, která umožňuje ošetření sadů za jeden den. Poslední podmínkou je dostatek fungicidů s dlouhou kurativní dobou. To se v současnosti jeví jako velký problém, protože na českém trhu neexistuje fungicid, který by tuto podmínku splňoval. Dostatečně dlouhou kurativní účinnost měly fungicidy ze skupiny triazolů, např. Punch 10 EW, Score 250 EC, Systane 12 EC, Rubigan 12 EC. U těchto látek byl však v minulých letech zaznamenán pokles účinnosti, který je spojován se vznikem rezistentních kmenů, a proto se od kurativních zásahů těmito přípravky upustilo (Lánský & Kloutvorová 2014).

Velkým přínosem v ochraně proti strupovitosti jabloně bylo zavedení strobilurinů, např. přípravků Discus nebo Zato 50 WG. Avšak také vůči těmto látkám byla velice rychle zaznamenán u původce choroby rezistence (Lánský & Kloutvorová 2014).

Pro snížení nebezpečí vzniku rezistence k strobilurinovým a triazolovým fungicidům je nutné dodržovat několik zásad: nepoužívat fungicidy, které obsahují pouze strobilurin nebo triazol, kombinovat je s kontaktními fungicidy (Captan, Dithianon, Mancozeb atd.), neaplikovat stejné přípravky následně po sobě. V případě podezření na snížení účinku

fungicidů, je vhodné jej aplikovat spíše mimo období nejsilnějšího tlaku houby (Lánský & Kloutvorová 2014).

Kromě výše uvedených fungicidů, lze k ochraně jabloní proti strupovitosti též použít přípravky, které působí částečně fungicidně a částečně jako induktory obranných mechanismů rostliny. Prvním přípravkem je VitiSan®, hydrogenuhličitan draselný, který je používán kurativně na klíčící spory 1–2 dny po začátku infekce. A druhým přípravkem je Delan Pro, obsahující *dithianon*, který účinkuje jako kontaktní látka s preventivním účinkem a který působí na sulfanylovou skupinu. Druhou účinnou látkou tohoto přípravku je fosfonát draselný, který působí systemicky, a to primárně přímou inhibicí patogena (Bagar 2011; Registr přípravků na ochranu rostlin 2019).

3.2.4 Biologická ochrana a látky na podporu zdravotní stavu

Jednou z metod biologické ochrany proti původci strupovitosti je využití antagonistického vztahu s houbou *Microsphaeropsis* sp. (kmen P130A). Tato houba proniká hyfami přímo do buněčné stěny patogena, oslabuje jeho růst a vyvolává buněčnou smrt *V. inaequalis*. Podle Carisse et al. (2000) tato houba snížila produkci askospor v kontrolovaných podmínkách o 85–98 % a v polních podmínkách o 75–85 %. V praxi se však nepoužívá (Juroch 2011).

Z pomocných přípravků je možné využít *Equisetum arvense*, vrbovou kůru, ale i výluhy z mořských řas, esenciální oleje nebo hydrogenuhličitan draselný a sodný (Kloutvorová 2015; Registr přípravků na ochranu rostlin 2019).

3.3 Rezistence patogena vůči fungicidům

Moderní fungicidy významně přispěly k ochraně rostlin před původci chorob. Avšak rozvoj rezistentních kmenů hub, způsobil prolomení ochrany u mnohých z nich. Od 70. let 20. století se rezistence stává závažným problémem v mnoha zemích světa. Proto byl zřízen FRAC (Fungicide Resistance Action Committee), aby uživatelé byli informováni o problémech s rezistencí a byly jim poskytnuty odborné rady (Hollomon 2015). Genom hub je velmi plastický a může obsahovat mnoho tisíců polymorfismů, což poskytuje této rozsáhlé skupině organismů mnoho příležitostí ke vzniku rezistence (Cuomo et al 2007).

Rezistence se vyskytuje především v polních podmínkách. V zemědělské praxi se tento fenomén projevuje poklesem fungicidního účinku a pěstitelé jej řeší zvýšením dávky nebo zvýšením počtů aplikací. Avšak neúčinnost aplikovaného přípravku může být způsobená

celou řadou faktorů, včetně špatné aplikace a načasování, nesprávnou dávkou nebo výjimečně infekčním tlakem choroby. Vznik rezistence je výsledkem působení fungicidního ošetření cílové populace a závisí na biologických a chemických faktorech (Hollomon 2015).

Nejrychleji se objevila rezistence k fungicidům u takových plodin, které byly náchylné k chorobám, např. obiloviny nebo réva vinná, a u kterých se pěstitelé opakovaně spoléhali na používání fungicidů se stejným mechanismem účinku (Hollomon 2015).

Výběr méně náchylných odrůd a hospodaření v systému integrované ochrany, kde se využívají fungicidy s různými mechanismy účinku či se střídají nebo kombinují, se stalo základem pro antirezistentní strategii (Hollomon 2015).

Rozhodujícím faktorem ovlivňujícím vznik rezistence by mohlo být i množství použitého fungicidu. V ideálních případech by dávky měly být takové, aby usmrtily dostatečné množství patogenní populace, čímž by se dosáhlo přijatelné hladiny patogena. V praxi jsou kvůli odpařování, metabolické degradaci v rostlině nebo v patogenovi a smyvu deštěm používány mnohem vyšší dávky, než by bylo potřeba (van den Bosch et al. 2011).

Jedním ze způsobů, jak snížit počáteční dávku by bylo použití formulací s řízeným uvolňováním, které sice udržuje nižší, ale stabilní dávku po delší časové období. Pozornost by měla být věnována formulacím přípravků a tomu, jak by mohly být používány k dosažení postupného uvolňování aktivní složky na povrchu listu (Ishii 2015).

3.3.1 Vznik rezistence

O jakou formu rezistence půjde, závisí na mechanismu účinku konkrétního fungicidu. Pokud bude cílem určitý biochemický proces, a jednobodová mutace způsobí jednu změnu aminokyseliny, může tato mutace rychle a účinně blokovat vazbu fungicidu na cílové místo (inhibitory jednoho místa, tz. single-site inhibitory). To bude mít za následek vysokou úroveň rezistence. Když se ale fungicid zaměřuje na více biochemických procesů (tzv. multi-site inhibitory), vyžadující kombinaci mnoha mutací, tak rezistence vzniká poměrně pomalu (Milvia De Miccolis Angelini 2015).

U křížové rezistence dochází při použití jedné účinné látky, zároveň ke vzniku rezistence k dalším účinným látkám se stejným mechanismem účinku. Skupiny fungicidů s křížovou rezistencí jsou definovány, mají svůj kód a jejich znalost je základním předpokladem uplatnění antirezistentních strategií (Ackermann 2013).

Přírozená nebo vrozená rezistence se týká vnitřních vlastností, např. absence specifického molekulárního místa a/ nebo metabolické cesty, které chrání organismus před účinky antimikrobiálních látek. Příkladem jsou některé basidiomycety produkující strobilurin;

oni sami mají vrozenou rezistenci vůči vlastním strobilurinům, ale na oomycety působí strobiluriny inhibičně (Milvia De Miccolis Angelini 2015).

Získaná rezistence se týká organismů, kteří jsou zpočátku vůči antimikrobiální látce citlivé, ale po dlouhodobějším vystavení této látce se mohou objevit genetické mutace. Tyto mutace zajistí rezistenci, která se může dále přenášet na potomstvo, takže populace úplně ztratí citlivost vůči látce (Milvia De Miccolis Angelini 2015).

Až do konce 60. let 20. století byly fungicidy (síra, deriváty mědi, dithiokarbamáty) používané v ochraně rostlin vícečetnými inhibitory, které se vázaly na více cílových míst, a tím i interferovaly s mnoha metabolickými procesy. I přes jejich dlouhotrvající a poměrně rozšířené používání je rezistence vůči těmto látkám poměrně vzácností. Je to dáno tím, že by muselo naráz vzniknout několik různých mutací, a pokud by se tak stalo, musel by být organizmus zároveň životaschopný (Brent a Hollomon 2007).

Rezistence je tedy výsledkem adaptace houby na fungicid, díky stabilní a dědičné genetické změně (Delp a Dekker 1985).

Klíčovými genetickými faktory rezistence je počet lokusů, počet alelických variant v každém lokusu, existence a relevance dominantního nebo recesivního vztahu mezi rezistentními (mutovanými) a přirozeně se (Wild-type) vyskytujícími alelami (Borck & Braymer 1974).

Geny zodpovědné za rezistenci proti fungicidům mohou být lokalizovány na chromozomech uvnitř jádra nebo na extrachromozomálních genetických determinantech. Jaderné a cytoplazmatické geny lze rozlišit podle jejich dědičných vzorců. Jaderné geny typicky vykazují klasickou biparentální (disomickou) dědičnost v pohlavních křížích, tj. zygota obdrží jednu alelu genu od každého z jejích rodičů. Naproti tomu genetický materiál v cytoplazmě má nemendelovské dědění a je charakterizován uniparentálním (obvykle mateřským) přenosem (Griffiths 1996).

Většina genů fungicidní rezistence se nachází na nukleárních chromozomech. V genomu zpravidla existuje pouze jedna kopie genu rezistence a mutace se nacházejí v genových sekvencích kódujících enzymatické nebo strukturní proteiny (Milvia De Miccolis Angelini 2015).

Rezistence k fungicidům může vyplývat z mutací v jednotlivých hlavních genech, a rovněž z aditivních nebo synergických interakcí mezi několika mutovanými geny. Monogenní a oligogenní rezistence jsou způsobeny jedním nebo několika hlavními geny. Majorgeny mají značný vliv na fenotyp a jejich mutace způsobují kvalitativní změnu v odezvě na fungicid. Většina případů rezistence proti fungicidům je způsobena mutacemi

majorgenů, které poskytují rezistenci vůči fungicidům s různými mechanismy účinku. U oligogenní rezistence se jedná o několik různých majorgenů, z nichž každý může mutovat, aby způsobil zvýšení rezistence vůči stejnému fungicidu (Milvia De Miccolis Angelini 2015).

Různé mutace na stejném genu mohou způsobovat různé úrovně rezistence vůči fungicidu, tomuto jevu se říká multi-alelická rezistence. Dříve byla hodnocena pouze podle fenotypových rozdílů v úrovni rezistence, anebo podle pleotropních účinků mutací. S rozvojem molekulární diagnostiky se dnes již ví, že je poměrně častá. Každá mutovaná alela může být buď částečně nebo úplně dominantní či recesivní vůči přirozeně se vyskytující (Wild-type) alele. Pokud jsou alely stejného genu kombinovány ve stejných houbových buňkách nebo hyfách, může být výsledný jedinec rezistentní nebo citlivý (Wild-type) vůči fungicidům. Kombinace genů mohou spolu interagovat, pokud se nacházejí na stejných místech, takže fenotyp dvojitého mutanta se může lišit od fenotypu mutanta s jedním genem (Molnar et al. 1985). Zvýšení fitness rezistentních izolátů (populací) bude mít za následek lepší přežití a jejich selekci v polních podmínkách (Milvia De Miccolis Angelini 2015).

Polygenní rezistence je způsobena mutacemi minorgenů. Jejich vliv na fenotyp je individuální a spíše menší, takže jejich vliv na snížení citlivosti vůči fungicidu je zanedbatelný. Ale i přesto existuje mnoho minorgenů, které svým účinkem mohou přispět ke vzniku rezistence, přičemž dojde k pomalému a postupnému kvantitativnímu snížení citlivosti k fungicidu. Polygenetická rezistence se obtížněji určuje v polních podmínkách (Milvia De Miccolis Angelini 2015).

Cytoplazmatické geny jsou přítomny v mitochondriích a plasmidech. Mitochondriální genom, který obsahuje mitochondriální rRNA a některé proteiny respiračního řetězce, patří mezi nejdůležitější extrachromozomální genetické prvky ovlivňující odolnost vůči chemikáliím (Milvia De Miccolis Angelini 2015).

Přirozená nebo indukovaná rezistence k QoI fungicidům, inhibitorům mitochondriální respirace komplexu cytochromu bc1 (komplex III) v místě Qo, je obvykle poskytována bodovými mutacemi v mitochondriálním genu *cytb*, což způsobuje substituci aminokyselin v cílovém proteinu. Nejméně tři možné změny kodonů jsou spojeny s mírnou (F129L nebo G137R) nebo častěji vysokou (G143A) hladinou rezistence k QoI u několika druhů hub (Milvia De Miccolis Angelini 2015).

Analýza meiotických potomků progenií mezi citlivými a rezistentními kmeny potvrdila cytoplazmatickou (mateřskou) dědičnost rezistence k QoI fungicidům mimo jiné i u *V. inaequalis* (Steinfeld et al. 2002).

Nemutovaná (Wild-type) a mutovaná mitochondriální DNA nesoucí mutaci G143A v genu *cytb* může koexistovat v heteroplazmatickém stavu v jediném izolátu, jak bylo prokázáno u několika druhů, včetně *V. inaequalis* (Zheng et al. 2000). Rovnováha mezi rezistentními a citlivými mitochondriemi závisí na síle selekčního tlaku (Ishii 2010).

Stabilita rezistence vůči fungicidům je definována jako schopnost patogena udržet si stejnou míru necitlivosti vůči fungicidům po několik po sobě jdoucích generací, a to buď s aplikací, nebo bez aplikace cílového fungicidu (Vega and Dewdney 2014).

Není pochyb o tom, že rezistence proti fungicidům může způsobit problém, protože rezistentní kmeny hub mají vyšší schopnost přežití v životním prostředí. Kdyby tomu bylo naopak, nemohly by se objevit a zvyšovat jejich populaci pod selekčním tlakem fungicidů. Nicméně rozdílná kondice (fitness) mezi rezistentními a citlivými populacemi, pokud existuje, se zdá být úzce spojena se stabilitou rezistence na poli. Pokud mají rezistentní populace značně oslabenou fitness ve srovnání s citlivými, dříve nebo později se kvůli absenci selekčního tlaku fungicidu rezistence sníží. Potom bychom mohli znovu použít fungicid (Ishii 2015).

3.3.2 Rezistence *Venturia inaequalis*

Strupovitost jabloně je z ekonomického hlediska nejdůležitější houbovou chorobou na světě, respektive v zemích, kde se jabloně pěstují (Cox 2015).

Jelikož starší širokospektrální fungicidy s post-infekčním účinkem byly ze zdravotních důvodů staženy z trhu, od 60. let jsou zaváděny tzv. single-site fungicidy, ale jejich nadúživní vyústilo až ke vzniku rezistence (Cox 2015).

Zatím byla u *V. inaequalis* zaznamenána rezistence k *dodine*, methyl benzimidazol karbamátům (MBC), inhibitorům biosyntézy sterolů (SBI) a inhibitorům ubichinol oxydázy (QoI). Dosud nebyla zjištěna rezistence k anilinopyrimidinům (AP) a inhibitorům sukcinátdehydrogenázy (SDHI). Účinnost těchto skupin je podstatně nižší než účinnost SBI, QoI, *dodine* a MBC. Z tohoto důvodu se pěstitelé raději spoléhají na mix různých fungicidů s aplikací v kratších intervalech, aby se zabránilo neúspěšné ochraně (Cox 2015).

3.3.2.1 Methyl benzimidazol karbamáty

Fungicidy ze skupiny MBC byly poprvé zaregistrovány ve Spojených státech amerických v 70. letech 20. století, ale už po 5 letech k nim byla zaznamenána rezistence (Jones and Walker 1976). Během krátké doby přibyly další zprávy o snížené účinnosti této

látky po celých Spojených státech, načež se přestaly používat. V současnosti pro komerční sady není žádný fungicid ze skupiny MBC registrován (Cox 2015).

Rezistence proti MBC fungicidům je přičítána bodové mutaci v kódujících oblastech cílového genu pro β -tubulin v místě vazby benzimidazolu (Ma a Michailides 2005).

Při zkoumání jabloní Quello et al. (2010) pozorovali populace *V. inaequalis* na okrasných jabloních, které byly poměrně citlivé k MBC fungicidům, zatímco populace na jabloních v produkčních sadech stále vykazovaly rezistenci.

Je možné, že pomocí screeningu rezistence by časem mohly být MBC fungicidy znovu používány v produkčních sadech (Cox 2015).

3.3.2.2 *Dodine*

Dodine náleží do chemické skupiny guanidinů, jeho účinek spočívá v narušení buněčných membrán, pravděpodobným místem jeho působení jsou fosfolipidy (Kloutvorová et al. 2018).

Na východě Spojených států amerických se používal od konce 50. let 20. století, o desetiletí později se již objevila u patogena rezistence a přestal se používat (Olaya et al. 1998).

Pokusy na přelomu století v Michiganu a New Yorku ukázaly, že frekvence izolátů rezistentních k *dodine* se v produkčních sadech snížila, když se na nějakou dobu přestal používat (Köller & Wilcox 2000). Avšak frekvence izolátů rezistentních vůči *dodine* v těchto sadech rychle narostla, když se obnovilo jeho používání (Köller & Wilcox 2000).

Carisse a Jobin (2010) si to vysvětlují následovně: Zaprvé, by mohlo jít o to, že pokles rezistence k *dodine* v populacích *V. inaequalis* během dvou desetiletí není způsoben izoláty, které ztrácejí získanou odolnost vůči *dodine*, ale je důsledkem zředění izolátů rezistentních vůči *dodine* v populacích. Takovýto jev by mohl být důsledkem kontinuální selekce izolátů s odolností vůči chemickým látkám, které byly zavedeny po přerušení použití *dodine*. Například selektivní tlaky způsobené nadměrnými aplikacemi fungicidů DMI a QoI aplikovaných během posledních dvou desetiletí mohou přispět k zředění izolátů rezistentních vůči *dodine* v populacích.

Druhá hypotéza je, že staré ovocné stromy infikované izoláty *V. inaequalis* vyznačující se rezistencí k *dodine* byly vykáceny a nové ovocné sady byly založeny v oblastech, kde nebyly přítomné populace *V. inaequalis* odolné vůči *dodine*.

Mechanismus rezistence vůči *dodine* u *V. inaequalis* je neznámý. Ale zdá se, že vývoj rezistence je postupný nebo kvantitativní, rezistence se u populace zvyšuje, protože se zvyšuje

i expozice k fungicidu nebo se projevu rezistence účastní geny rezistence, které jsou součástí tzv. genové rodiny. Nicméně sekvence těchto genů a počet genů podílejících se na rezistenci k *dodine* u *V. inaequalis* pravděpodobně zůstanou neznámé, dokud nebudou prováděny pokusy s použitím sekvenačních metod na úrovni genomu a transkriptomu (Cox 2015).

3.3.2.3 DMI fungicidy

DMI (inhibitory demetilace při biosyntéze ergosterolu) fungicidy se prvně začaly používat od 80. let 20. století. Na rozdíl od ostatních fungicidů, u těchto trvalo 20 let, než se na východě Spojených států objevily populace fytopatogenních hub k nim rezistentní (Cox 2015).

Jde o rezistenci s kvantitativním charakterem, jejíž vznik je řízen akumulací několika nezávislých mutací, a rozvíjí se jako postupné snižování citlivosti k fungicidům. Pokud se selekční tlak vyloučí, v populaci patogena opět převáží citlivé kmeny. Je prokázána křížová rezistence mezi různými účinnými látkami DMI fungicidů (Kloutvorová et al. 2018).

Molekulární mechanismus rezistence k DMI fungicidům spočívá v mutaci cílového místa účinku, která má za následek nadměrnou expresi cílového genu, mutaci vedoucí k modifikaci cílového místa fungicidu a rovněž mutaci vedoucí k aktivnímu vyčerpání fungicidu z buňky (Nikou et al. 2009).

3.3.2.4 QoI fungicidy

V Evropě se poprvé začaly fungicidy této skupiny používat v roce 1996, ale už po velmi krátké době se k nim ve Švýcarsku, Francii a severním Německu začala objevovat rezistence (Gisi et al. 2002). Chemické skupiny patřící do třídy QoI inhibitorů a využívané v ochraně proti strupovitosti v České republice jsou převážně oximino-acetáty, mezi které patří přípravek s účinnou látkou *kresoxim-methyl*: Discus a další přípravky patřící do stejné chemické skupiny, ale s účinnou látkou *trifloxystrobin*. Do jiné chemické skupiny methoxykarbamátů náleží kombinované přípravky s účinnou látkou *pyraclostrobin*: Tercel (+ *dithianon*), Bellis (+ *boscalid*) a Flint Plus (+ *captan*). Tyto přípravky působí preventivně a kurativně, účinkují kontaktně, lokálně systémově a některé i systémově (Kloutvorová et al. 2018).

Jedním z mechanismů rezistence je mutace aminokyselinových sekvencí cílového místa, respektive tři substituce aminokyselin v genu cytochromu b, změna z glycinu na alanin v pozici 143 (G143A), změna z fenylalaninu na leucin v pozici 129 (F129L) a změna

z glycinu na arginin v pozici 137 (G137R). Dále může být citlivost snížena iniciací alternativního dýchání, což je reakce na působení QoI fungicidů jako inhibitorů dýchání. Nebo dochází k metabolizaci strobilurinů enzymy esterázami a cytochrom P450 monooxygenázou, kdy dochází k úpravě fungicidu na netoxickou formu (Kloutvorová et al. 2018).

3.3.2.5 Anilinopyrimidiny

Anilinopyrimidiny (AP) byly poprvé použity ve Spojených státech amerických na konci 20. století (Köller 1999). Jde o fungicidy, které jsou účinné na široké spektrum houbových patogenů (Kloutvorová et al. 2018).

V České republice jsou proti *V. inaequalis* využívány účinné látky *pyrimethanil* a *cyprodinil*. Cílovým místem účinku těchto fungicidů je syntéza aminokyselin a proteinů. Mechanismus účinku spočívá v inhibici biosyntézy methioninu a inhibici sekrece hydrolytických enzymů patogena. AP vykazují v rámci své chemické skupiny křížovou rezistenci, ale nevykazují křížovou rezistenci s jinými skupinami fungicidů, jako jsou triazoly a strobiluriny (Kloutvorová et al. 2018).

3.3.2.6 SDHI fungicidy

SDHI (inhibitory sukcinát dehydrogenázy) fungicidy byly zaregistrovány v roce 2005 pro použití na jabloních ve Spojených státech amerických. První z registrovaných: *Pristine* je směs SDHI fungicidní látky *boscalid* (*pyridincarboxamid*) s QoI fungicidní látkou *pyraclostrobin* (Cox 2015).

Fungicidy z této skupiny inhibují mitochondriální dýchání a ovlivňují tak tvorbu energie potřebnou pro buňku patogena. Cílový enzym inhibitorů SDH je sukcinát dehydrogenáza (SDH, tzv. komplex II v mitochondriálním respiračním řetězci), která je funkční součástí trikarboxylového cyklu a je spojena s mitochondriálním elektronovým transportním řetězcem (Kloutvorová et al. 2018).

Chemické skupiny patřící do třídy SDHI inhibitorů a využívané v ochraně proti *V. inaequalis* v České republice jsou pyridinylethyl benzamidy – tato skupina je představovaná např. komerčním přípravkem s účinnou látkou *fluopyram* – *Luna Experience* (druhá účinná látka je ze skupiny azolů *tebuconazole*). Do jiné chemické skupiny patří pyridin-carboxamidy s účinnou látkou *boscalid*, která se vyskytuje např. v kombinovaném přípravku: *Bellis* (druhou účinnou látkou je *pyraclostrobin*) a *Signum* (*boscalid* + *pyraclostrobin*) (Kloutvorová et al. 2018).

4 Metodika

4.1 Odběr vzorků

Listový materiál, který byl odebrán v červenci 2018 k pokusům pocházel ze tří lokalit: z jabloňového sadu, který se nachází na Demonstračním a experimentálním pozemku České zemědělské univerzity v Praze, dále z jabloní rostoucích v trávniku náležejícímu k bytové zástavbě v Roztokách u Prahy a ze soukromé zahrady v obci Miličín. Seznam izolátů a jejich původ je uveden v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4: Přehled izolátů

| Označení izolátu | Lokace | Odrůda |
|------------------|-----------------|--------------------|
| R1 | Roztoky u Prahy | Planý druh |
| R2 | Roztoky u Prahy | Planý druh |
| R3 | Roztoky u Prahy | Planý druh |
| R4 | Roztoky u Prahy | Planý druh |
| R5 | Roztoky u Prahy | Planý druh |
| R6 | Roztoky u Prahy | Planý druh |
| R7 | Roztoky u Prahy | Planý druh |
| R8 | Roztoky u Prahy | Planý druh |
| R9 | Roztoky u Prahy | Planý druh |
| R10 | Roztoky u Prahy | Planý druh |
| R11 | Roztoky u Prahy | Planý druh |
| R12 | Roztoky u Prahy | Planý druh |
| R13 | Roztoky u Prahy | Planý druh |
| R14 | Roztoky u Prahy | Planý druh |
| R15 | Roztoky u Prahy | Planý druh |
| R16 | Roztoky u Prahy | Planý druh |
| R17 | Roztoky u Prahy | Planý druh |
| Suchdol | Praha – Suchdol | Neznámý |
| Miličín | Miličín | Čistické lahůdkové |

4.2 Izolace patogena

4.2.1 Materiál

Napadené listy

2% vodní agar

Petriho misky \varnothing 6 mm

Chloramfenikol (zásobní roztok 100 mg/ml)

Kyselina mléčná

Sterilizovaná destilovaná voda

Sterilizovaná hodinová sklíčka

Kovová špachtle

Skleněná tyčinka s lopatkou

Pipeta + špičky

Plynový kahan

Papinův hrnec

Parafilm

4.2.2 Postup

Nejprve byl připraven 2% vodní agar, který byl 20 minut sterilizován v Papinově hrnci. Po ochlazení agaru na teplotu cca 50 °C, při které se lze dotknout nádoby, byl do agaru přidán chloramfenikol (100 μ l/ml) a kyselina mléčná (1 μ l/ml) a agar byl rozlit v tenké vrstvě (4 mm) do Petriho misek.

Na hodinové sklíčko bylo pipetou přeneseno 200 μ l sterilizované destilované vody. Poté za pomoci kovové špachtle byly ovlhčeny léze na listech a z nich opatrně seškrabány konidie. Pro dostatečné ovlhčení skvrn a přenos konidií do vody je důležité špachtli ve vodě pravidelně namáčet. Ve vodě na sklíčku by měl být poté vidět šedavě-hnědý zákal. Ze suspenze konidií byl odeberán pomocí pipety vzorek o objemu 100 μ l, který byl přenesen na slabou vrstvu agaru. Suspenze konidií byla pomocí skleněné tyčinky s opatkou rozetřena rovnoměrně do všech stran Petriho misky. Takto připravené stěry byly inkubovány 24 hodin při teplotě 20 °C ve tmě v klimaboxu.

4.3 Příprava monosporických izolátů

4.3.1 Materiál

Petriho misky obsahující konidie *V. inaequalis*

CYGA: Chloramphenicol Yeast Glucose Agar (Himedia) – připravený dle pokynů výrobce

Petriho misky ø 9 mm

Injekční stříkačky + speciálně upravené jehly

Inverzní světelný mikroskop

Plynový kahan

Papinův hrnec

Parafilm

4.3.2 Postup

Petriho misky s rozetřenými konidii byly prohlíženy pomocí inverzního světelného mikroskopu. V zorném poli byly vyhledány klíčící spory, které mají tvar písmene „L“. Tyto klíčící konidie byly ožehnutou jehlou opatrně vypíchnuty a přeneseny na CYGA v Petriho miskách. Tímto způsobem bylo přeneseno pět válečků do jedné misky. Zaparafilmované a označené misky byly inkubovány dnem vzhůru při teplotě 20 °C a ve tmě, dokud se nevytvořily dostatečně velké kolonie *V. inaequalis*.

4.4 Přeočkování kolonií monosporických izolátů

4.4.1 Materiál

Petriho misky s monosporickými izoláty na CYGA

PDA: Potato Dextrose Agar (Himedia) – připravený dle pokynů výrobce

Petriho misky ø 6 mm

Jehly + skleněná tyčinka

Plynový kahan

Papinův hrnec

Parafilm

4.4.2 Postup

Po nárůstu kolonií tmavšího mycelia o průměru zhruba 5 mm na CYGA, byl patogen odizolován na nový agar (PDA). Jehlou byl vyříznut asi 2 mm kousek agaru s myceliem, který byl přemístěn na PDA do středu misky. Z každé kolonie byly takto připraveny 4 nové misky, které byly zaparafilmovány a inkubovány opět ve tmě při teplotě 20 °C.

4.5 Testy citlivosti izolátů k účinným látkám

4.5.1 Materiál

Izoláty *V. inaequalis* na PDA

PDA: Potato Dextrose Agar – připravený dle pokynů výrobce

Petriho misky ø 9 mm

Pipety + špičky

Mikrozkumavky

Účinné látky (*pyraclostrobin*, *boscalid*, *tebuconazole*, *trifloxystrobin*)

DMSO (Dimethylsulfoxid)

Jehly + skleněná tyčinka

Plynový kahan

Parafilm

Elektronické posuvné měřítko (MITUTOYO 0-150/0,01 mm)

Počítač

Program Microsoft Office Excel

4.5.2 Postup

Pro každou variantu byl připraven samostatný agar, do kterého byla pipetou přidána předem připravená účinná látka o určité koncentraci. Účinné látky byly rozpuštěny v DMSO, přičemž byly vytvořeny 2 zásobní koncentrace účinných látek, které byly použity pro finální přípravu všech variant koncentrací (Tabulka č. 5).

Poté co agar utuhl, byly na něj očkované testované izoláty, vždy tři vpichy do jedné Petriho misky. Každá varianta byla založena ve třech Petriho miskách. Takto bylo u jednoho izolátu a jedné varianty celkem připraveno 9 opakování. Petriho misky byly opatřeny parafilmem a izoláty inkubovány za výše definovaných podmínek.

Tabulka č. 5: Přehled cílových koncentrací všech účinných látek v živném agaru

| Varianty | Koncentrace ú. l. [µg/ml] | zásobní roztok ú. l. 10 mg/ml | | zásobní roztok ú. l. 0,1 mg/ml | |
|----------|---------------------------|-------------------------------|-----------|--------------------------------|-----------|
| | | 250 ml agaru | | 250 ml agaru | |
| | | ú. l. [µl] | DMSO [µl] | ú.l. [µl] | DMSO [µl] |
| K | 0 | 0 | 250 | - | - |
| 1. | 0,001 | - | - | 2,5 | 247,5 |
| 2. | 0,01 | - | - | 25 | 225 |
| 3. | 0,1 | - | - | 250 | 0 |
| 4. | 1 | 25 | 225 | - | - |
| 5. | 10 | 250 | 0 | - | - |

K měření růstu mycelia izolátů bylo použito elektronické posuvné měřítko, které data rovnou přenáší do programu Excel. Jelikož se houba *V. inaequalis* vyznačuje velmi pomalým růstem v *in vitro* podmínkách, růst kolonií byl vždy měřen jeden měsíc po založení testu.

4.6 Vyhodnocení výsledků

U kolonií izolátů byly měřeny dva na sebe kolmé rozměry. Růst mycelia na jednotlivých variantách s obsahem účinných látek byl vztažen k růstu mycelia na kontrolní variantě a bylo vypočítáno % růstu a % inhibice růstu. Na základě inhibice růstu byla vypočítána efektivní koncentrace účinné látky inhibující růst mycelia z 50 %, tzv EC₅₀.

$$\% R = \frac{rt}{rk} * 100 \%$$

Kde: R = % růstu

rt = průměr růstu kolonie izolátu na variantě obsahující účinnou látku fungicidu (mm)

rk = průměr růstu kolonie izolátu na kontrolní variantě (mm)

$$\% IR = 100 - \left(\frac{rt}{rk} * 100 \% \right)$$

Kde: IR= % inhibice růstu

Hodnocení bylo provedeno na základě vypočítaných hodnot % růstu.

Jelikož neexistuje jednotná metodika určující diskriminační bod (inhibice růstu, EC₅₀, rezistentní faktor aj.), který by klasifikoval izolát jako rezistentní nebo citlivý ke konkrétní

účinné látky (skupině), byly izoláty rozděleny do 4 skupin dle jejich % inhibice růstu (Tabulka č.6).

Tabulka č. 6: Rozdělení citlivosti populací *V. inaequalis* na základě % inhibice růstu izolátů

| | |
|--|-------------------------|
| Izolát se značně snížená citlivostí | Inhibice růstu 0-30 % |
| Izolát se sníženou citlivostí | Inhibice růstu 31-65 % |
| Citlivý izolát | Inhibice růstu 66-94 % |
| Velmi citlivý izolát | Inhibice růstu 95-100 % |

5 Výsledky

Vzhledem k velmi různorodé reakci většiny izolátů *V. inaequalis* k účinku fungicidních látek, jsou v této kapitole výsledky shrnuty více podrobně. U testovaných izolátů docházelo vlivem účinných látek fungicidů spíše ke stimulaci jejich růstu než k jejich inhibici. Z tohoto důvodu jsou u jednotlivých účinných látek fungicidů uvedeny tabulky obsahující % růstu a ne % inhibice růstu, aby výsledky nebyly znázorněny v záporných hodnotách.

5.1 Pyraclostrobin

Jak je patrné v Tabulce č. 8 (viz. přílohy), měla nejnižší koncentrace (0,001 µg/ml) u většiny izolátů (74 %) stimulační vliv na růst izolátů *V. inaequalis*. U 6 izolátů dokonce docházelo až k více než 10násobnému růstu mycelia oproti kontrolní variantě. Pouze 5 izolátů bylo touto koncentrací inhibováno, přičemž nejnižší % růstu (92,5 %) bylo na této koncentraci zaznamenáno u izolátu Miličín. Izoláty, u kterých došlo k inhibici, byla inhibována v růstu v průměru z 3,07 %.

V případě druhé nejnižší koncentrace (0,01 µg/ml) byla pozorována inhibice růstu mycelia pouze u 58 % izolátů. Naopak u zbývajících izolátů (42 %) byl růst stále stimulován, a to až desetinásobně oproti kontrole. Inhibované izoláty byly v průměru inhibovány v růstu o 33,26 %.

Ke zdatelné změně došlo až u třetí koncentrace (0,1 µg/ml), kde růst mycelia byl oproti kontrole stimulován pouze u 32 % izolátů, a to v průměru 6krát. Růst mycelia inhibovaných izolátů, byl inhibován v průměru o 57,75 %.

Dvě nejvyšší koncentrace (1 a 10 µg/ml) stimulovaly růst u 6 izolátů, z toho 4 izoláty byly stimulovány v růstu i nejvyšší koncentrací (10 µg/ml). Rozdíl v počtu inhibovaných

izolátů u třetí (0,1 µg/ml) a čtvrté koncentrace (1 µg/ml) byl minimální. U čtvrté koncentrace došlo k inhibici růstu inhibovaných izolátů v průměru o 72,63 % a v páté průměrně o 76,24 %.

Hodnotu EC₅₀ bylo možná spočítat pouze u 4 izolátů a pohybovala se v rozmezí 0,03–0,12 µg/ml.

5.2 Boscalid

V případě této účinné látky (viz Tabulka č. 9 v přílohách) byla také zaznamenána velmi rozdílná reakce izolátů na různé koncentrace. *Boscalid* rovněž stimuloval růst několika izolátů (4) u první varianty (0,001 µg/ml), u druhé koncentrace (0,01 µl/ml) stimuloval v růstu 7 izolátů a u třetí koncentrace (0,1 µg/ml) opět 7 izolátů. Nejvyšší nárůst byl sledován u izolátu R9 u třetí koncentrace a to 200,09 %. Z těchto tří koncentrací nejvyšší inhibici způsobila až třetí koncentrace, a to u izolátů R6 (64,87 %), R11 (65,19 %) a R12 (67,17 %).

U inhibovaných izolátů došlo v první koncentraci ú. l. *boscalid* průměrně k inhibici růstu o 11,71 %, v druhé pouze o 9,17 % a ve třetí o 20,35 %.

U čtvrté (1 µg/ml) a páté (10 µg/ml) varianty došlo k razantnímu snížení růstu mycelia oproti předešlým variantám. U žádného izolátu již nedošlo k většímu nárůstu, než na kontrolní variantě. Nejvyšší hodnota růstu byla zaznamenána u izolátu R3 na čtvrté koncentraci a to 28,99 %, což je necelá třetina velikosti růstu kontroly. Naopak nejvíce byl v růstu inhibován izolát R2 (94,82 %).

Při porovnání průměrné inhibice růstu na inhibovaných izolátech ve čtvrté a páté koncentraci, nejsou rozdíly v inhibování růstu příliš výrazné, u čtvrté koncentrace to je o 82,90 % a v páté koncentraci o 88,73 %.

Hodnoty EC₅₀ bylo možno spočítat u 7 izolátů a pohybovaly se v rozmezí 0,11–0,54 µg/ml.

5.3 Tebuconazole

U první koncentrace účinné látky *tebuconazole* (0,001 µg/ml) bylo v růstu stimulováno už jen 5 izolátů. Zbýlých 14 izolátů bylo inhibováno v průměru o 8,79 %. Jak je viditelné z Tabulky č. 10 (viz přílohy) první tři koncentrace podpořily růst izolátů *V. inaequalis*.

U druhé koncentrace (0,01 µg/ml) došlo ke stimulaci růstu jen u dvou izolátů R3 (106,53 %) a R10 (157,75 %). Nejvyšší inhibice růstu mycelia byla pozorována u izolátu R5 (72,09 %). Průměrná inhibice růstu inhibovaných izolátů byla 27,68 %.

Ačkoliv u třetí koncentrace (0,1 µg/ml) došlo ke stimulaci růstů u tří izolátů, na rozdíl od předešlé koncentrace, u této varianty byla zaznamenána vyšší procenta inhibice. Nejvyšší inhibice růstu (84,55 %) byla zaznamenána u izolátu R17. Inhibované izoláty byly v průměru inhibovány o 50,87 %.

U čtvrté (1 µg/ml) a páté (10 µg/ml) varianty se % inhibice růstu mezi jednotlivými koncentracemi v rámci izolátů význačně nelišilo. Nejvyšší inhibice růstu (87,94 %) ve čtvrté koncentraci byla zaznamenána u izolátu R17. A v páté koncentraci to rovněž bylo u R17 a to již 90,86 %. Průměrná inhibice inhibovaných izolátů byla 52,39 %.

Hodnoty EC_{50} bylo možno spočítat u 7 izolátů a pohybovali se v rozmezí 0,0037–0,75 µg/ml.

5.4 Trifloxystrobin

Jak je viditelné v Tabulce č. 11 (viz. přílohy), u první koncentrace (0,001 µg/ml) byla inhibice růstu velice pozvolná, dokonce u izolátu Suchdol došlo ke dvojnásobnému růstu oproti kontrole. Nejnižší % růstu bylo zaznamenáno u izolátu R13, a to 59,43 %. U inhibovaných izolátů byla průměrná inhibice růstů 20,08 %.

U druhé koncentrace (0,01 µg/ml) sice došlo k mírnému snížení počtu izolátů, které měly % růstu větší než kontrola, ale jinak rozdíl oproti první koncentraci nebyl nijak výrazný. Průměrná inhibice růstu inhibovaných izolátů u druhé koncentrace byla 27,06 %. Pokud jde o rozdíl v rámci této koncentrace, tak nejnižší % růstu bylo pozorováno u izolátů R8 (32,51 %) a R13 (47,32 %).

Třetí koncentrace (0,1 µg/ml) způsobila % růstu o něco nižší než druhá koncentrace, ale stále nešlo o značný rozdíl, dokonce v 7 případech (R1, R2, R7, R10, R16, Suchdol a Miličín) byla hodnota vyšší, a to i vůči kontrole. Nejvyšší inhibice růstu byla zaznamenána u izolátu R8, a to 81,13 %. U inhibovaných izolátů byla průměrná inhibice růstu 32,51 %.

U čtvrté koncentrace (1 µg/ml) došlo u izolátů R10, R11, Suchdol a Miličín k vyššímu růstu oproti kontrole. Nejvyšší inhibice růstu byla pozorována u izolátu R17, a to 76,58 %. U inhibovaných izolátů se průměrná inhibice pohybovala kolem 37 %.

U páté koncentrace (10 µg/ml) se průměrné % inhibice růstu inhibovaných izolátů pohybovalo kolem 45,5 %. Nejvyšší inhibice (83,72 %) byla pozorována u izolátu R6. Izoláty R10, R11 a Suchdol si ve všech koncentracích udržovaly % růstu vyšší nebo jen nepatrně nižší, než byla kontrola.

Hodnoty EC₅₀ bylo možno spočítat u 5 izolátů a pohybovaly se v rozmezí 0,00072–0,40 µg/ml.

Rozdělení izolátů podle jejich citlivosti k účinným látkám je v tabulkách č. 7a a 7b.

Tabulka č.7a: Rozdělení izolátů podle citlivosti (*pyraclostrobin* a *boscalid*)
1 – 0,001; 2 – 0,01; 3 – 0,1; 4–1; 5–10 µg/ml

| Citlivost | <i>pyraclostrobin</i> | <i>boscalid</i> |
|---------------------------------|--|--|
| Velmi citlivý | | |
| 1 | | |
| 2 | | |
| 3 | | |
| 4 | R9 | |
| 5 | R7, R9 | |
| Citlivý | | |
| 1 | | |
| 2 | R16 | |
| 3 | R6, R7, R9, R11, R14, Miličín | |
| 4 | R6, R7, R10, R11, R12, R13, R14, R16, R17, Miličín | R1, R2, R3, R4, R, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, Suchdol, Miličín |
| 5 | R6, R10, R11, R12, R13, R14, R16, R17, Miličín | R1, R2, R3, R4, R, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, Suchdol, Miličín |
| Snížená citlivost | | |
| 1 | | R1, R17 |
| 2 | R6, R11, R12, R14, Miličín | |
| 3 | R8, R12, R13, R16, R17 | R6, R12, R13, R16 |
| 4 | | |
| 5 | | |
| Značně snížená citlivost | | |
| 1 | R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, Suchdol, Miličín | R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, Suchdol, Miličín |
| 2 | R1, R2, R3, R4, R5, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R15, R17, Suchdol | R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, Suchdol, Miličín |
| 3 | R1, R2, R3, R4, R5, R10, R15, Suchdol | R1, R2, R3, R4, R5, R7, R8, R9, R10, R11, R14, R15, R17, Suchdol, Miličín |
| 4 | R1, R2, R3, R4, R5, R15, Suchdol | |
| 5 | R1, R2, R3, R4, R5, R15, Suchdol | |

Tabulka č.7b: Rozdělení izolátů podle citlivosti (*tebuconazole* a *trifloxystrobin*)

1 – 0,001; 2 – 0,01; 3 – 0,1; 4–1; 5–10 µg/ml

| Citlivost | <i>tebuconazole</i> | <i>trifloxystrobin</i> |
|---------------------------------|--|---|
| Velmi citlivý | | |
| 1 | | |
| 2 | | |
| 3 | | |
| 4 | | |
| 5 | | |
| Citlivý | | |
| 1 | | |
| 2 | R5, R12 | R8 |
| 3 | R5, R6, R12, R14, R17 | R8 |
| 4 | R3, R5, R6, R12, R13, R14, R17 | R3, R8, R17 |
| 5 | R3, R5, R6, R12, R13, R14, R17 | R3, R5, R6, R8, R17 |
| Snížená citlivost | | |
| 1 | | R8, R13 |
| 2 | R6, R9, R11 | R3, R13, R17 |
| 3 | R3, R4, R11, R13, R17 | R3, R4, R6, R13, R17 |
| 4 | R11 | R4, R5, R6, R9, R13 |
| 5 | R4, R9, R11 | R1, R7, R9, R13 |
| Značně snížená citlivost | | |
| 1 | R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14, R15, R16, R17, Suchdol, Miličín | R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R9, R10, R11, R12, R14, R15, R16, R17, Suchdol, Miličín |
| 2 | R1, R2, R3, R4, R7, R8, R10, R13, R14, R15, R16, Suchdol, Miličín | R1, R2, R4, R5, R6, R7, R9, R10, R11, R12, R14, R15, R16, Suchdol, Miličín |
| 3 | R1, R2, R7, R8, R9, R10, R15, R16, Suchdol, Miličín | R1, R2, R5, R7, R9, R10, R11, R12, R14, R15, R16, Suchdol, Miličín |
| 4 | R1, R2, R4, R7, R8, R9, R10, R15, R16, Suchdol, Miličín | R1, R2, R7, R10, R11, R12, R14, R15, R16, Suchdol, Miličín |
| 5 | R1, R2, R7, R8, R10, R15, R16, Suchdol, Miličín | R1, R2, R4, R7, R10, R11, R12, R14, R15, R16, Suchdol, Miličín |

6 Diskuze

Vzhledem k tomu, že vzorky listů infikované *V. inaequalis* byly odebrány pouze ze tří lokalit (Praha-Suchdol, Roztoky u Prahy a Miličín), výsledky neodrážejí reálnou situaci v citlivosti *V. inaequalis* vůči fungicidům v České republice.

Izoláty *V. inaequalis* vykazovaly různorodou reakci vůči účinkům fungicidních látek. U tří nejnižších koncentrací fungicidních látek, především u účinné látky *pyraclostrobin*, byl pozorován stimulační účinek na růstu mycelia *V. inaequalis*. I v rámci ostatních koncentrací této účinné látky byla v některých případech zaznamenána stimulace růstu mycelia patogena.

Jak uvádí Cox (2015) u *V. inaequalis* se vyskytuje kvalitativní i kvantitativní rezistence vůči QoI fungicidům, kam patří i *pyraclostrobin*. Izoláty tedy mohou vykazovat různé úrovně citlivosti k fungicidům. V našem případě značně sníženou či sníženou citlivost (Tabulka č. 6) vykazovalo 67 % izolátů, z toho více jak polovinu tvořily izoláty, které byly stimulovány ke značnému růstu mycelia *V. inaequalis*. Je zajímavostí, že zvýšeným nárůstem mycelia reagovaly izoláty, které pocházely z planého druhu jabloně (R1–R17), zatímco izolát z intenzivně obhospodařovaného sadu (Suchdol) reagovaly inhibicí růstu.

Izoláty *V. inaequalis* pocházející z neošetřované jabloně (Miličín) byly spíše citlivé, i když u nejnižší koncentrace, které byly vystaveny, byla pozorována jejich snížená citlivost. Když Lesniak et al. (2011) zkoumali produkční sady v New Yorku a Nové Anglii, tak též zjistili, že 67 % testovaných izolátů vykazovalo sníženou citlivost k fungicidům ze skupiny QoI.

Jak uvádí Kloutvorová (2018) riziko rezistence k SDHI fungicidům, v našem případě k účinné látce *boscalid*, je střední až vysoké oproti ostatním skupinám. V této diplomové práci bylo zaznamenáno nejnižší procento (60 %) izolátů se sníženou až značně sníženou citlivostí právě k účinné látce *boscalid*. U dvou nejvyšších koncentrací (1 a 10 $\mu\text{g/ml}$) všechny testované izoláty reagovaly citlivě k účinku látky *boscalid*, v případě izolátů R1 a R2 byla jejich reakce vůči páté koncentraci vyhodnocena jako velmi citlivá. Rovněž stimulace růstu izolátů účinnou látkou *boscalid* nebyla tak výrazná jako u látky *pyraclostrobin*.

Kunz et al. (1997) zkoumali citlivosti populací *V. inaequalis* k pěti účinným látkám (*difenoconazole*, *flusilazole*, *fenarimol*, *tebuconazole* a *pyrifenoxy*) ze skupiny DMI fungicidů. V rámci jejich testování zjistili, že populace *V. inaequalis* se vyznačovaly druhou nejnižší

citlivostí k účinné látce *tebuconazole*. Stejně tak i naše izoláty vykazovaly druhou nejnižší citlivostí k *tebuconazole*, pouze 22 % izolátů reagovalo k účinku *tebuconazole* inhibicí růstu, a to navíc až u dvou nejvyšších koncentracích.

Posledním testovaným přípravkem byl *trifloxystrobin*. Tato látka také patří do skupiny QoI fungicidů a jak uvádí Kloutvorová (2018) obejvuje se u něj vysoké riziko vzniku snížené citlivosti u populací *V. inaequalis* a zároveň křížová rezistence vůči všem strobilurinovým látkám. Toto potvrzují i naše výsledky, celých 85 % izolátů mělo vůči této účinné látce sníženou či značně sníženou citlivost. A opět jsme mohli sledovat v rámci jeho testování zvýšený růst mycelia oproti kontrolní variantě, a to bez ohledu na použitou koncentraci látky.

Když porovnáme mezi sebou účinné látky, tak nejvyšší inhibice růstu mycelia (nad 66 %) byla pozorována u ú. l. *boscalid* a to u 40 % testovaných izolátů *V. inaequalis*. Rozdíl mezi touto látkou a *pyraclostrobin* však nebyl nijak význačný, pouze k ú. l. *boscalid* bylo zaznamenáno o 7 citlivých a velmi citlivých izolátů více. Rozdíl mezi účinnou látkou s nejmenším (*boscalid*) a největším počtem inhibovaných izolátů (*trifloxystrobin*), resp. stimulovaných v růstů mycelia nebyl příliš výrazný. U účinné látky *tebuconazole* byl inhibiční účinek zaznamenán, ale převážně až u čtvrté a páté použité koncentrace.

Co se týče rozdílů v rámci izolátů, resp. jejich původu, tak v případě izolátů získaných z planého druhu z Roztok u Prahy byly reakce velmi rozmanité. U všech čtyř účinných látek a jejich dvou nejnižších koncentrací reagovaly izoláty spíše zvýšeným nárůstem mycelia nebo značně sníženou citlivostí. U třetí koncentrace se už začaly objevovat i citlivé izoláty. A u nejvyšších koncentrací už byly z velké části (47 %) izoláty citlivé.

Izolát pocházející z ošetřovaných sadů ze Suchdola, reagovaly převážně nižší (do 30 %) inhibicí růstu. Jen v případě ú. l. *boscalid* u čtvrté a páté koncentraci byla pozorována více jak 90% inhibice růstu. Mohlo by to být způsobeno používáním přípravků s jinou účinnou látkou, a tím že s *boscalid* se populace *V. inaequalis* ještě nesešla.

U izolát z Miličina by se dalo předpokládat, že budou citlivé, když se izoláty *V. inaequalis* nikdy nesešly s fungicidním ošetřením. Citlivost vůči vyšším koncentracím se u izolátů objevila jen v případě účinných látek *pyraclostrobin* a *boscalid*. V případě látek *tebuconazol* a *trifloxystrobin* byla u izolátů pozorována u všech koncentrací značně snížená citlivost, takže u těchto izolátů se pravděpodobně vytvořila přirozená snížená citlivost. Je zvláštní, že vůči ú. l. *trifloxystrobin* izoláty reagovaly sníženou citlivostí, zatímco u ú. l. *pyraclostrobin* byla snížená citlivost zaznamenána jen u nejnižší koncentrace, přitom

obě účinné látky patří do skupiny QoI fungicidů. To by znamenalo, že v tomto případě nefunguje křížová rezistence. Mohlo by to být způsobeno tím, že *trifloxystrobin* spadá do podskupiny oximino-acetáty, zatímco *pyraclostrobin* do podskupiny methoxy-karbamáty.

7 Závěr

Na základě vlastních pokusů a s přihlédnutím k literatuře, lze formulovat tyto závěry:

- Během letního období roku 2018 byly ze tří lokalit (Praha – Suchdol, Roztoky u Prahy a obec Miličín) odebrány vzorky listů jabloně s viditelnými příznaky napadení patogenem *V. inaequalis*. Z infikovaného pletiva byl patogen převeden do čisté kultury a bylo získáno celkem 19 izolátů.
- Získané izoláty byly testovány na citlivost pomocí *in vitro* testu na agaru vůči účinným látkám: *pyraclostrobin*, *boscalid*, *tebuconazole* a *trifloxystrobin* v pěti různých koncentracích (0,001; 0,01; 0,1; 1 a 10 µg/ml).
- Izoláty *V inaequalis* vykazovaly značnou variabilitu v růstu a to u všech testovaných koncentrací všech účinných látek. Nižší koncentrace (0,001; 0,01 a 0,1 µg/ml) účinných látek působily na růst izolátů *V. inaequalis* spíše stimulačním účinkem a až u nejvyšší testované koncentrace (10 µg/ml) byla pozorována inhibice izolátů.
- U všech testovaných izolátů se projevila určitá míra snížené citlivosti ke všem účinným látkám. Nejméně snížená citlivost izolátů byla zaznamenána k účinné látce *boscalid*, nejvíce snížená citlivost k účinné látce *trifloxystrobin*.
- Dodržování zásad antirezistentní strategie, střídání systémových přípravků s kontaktními, které jsou méně ohroženy vznikem rezistence.

8 Literatura

1. Ackermann P. 2013. Problematika rezistence oomycet a houbových patogenů révy k fungicidům a antirezistentní strategie. Ekovín, Brno.
2. Ackermann P, Kazda J. 2014. Metodiky ochrany zahradních plodin pro zahradníky a zahrádkáře. ČZS. ISBN 978-80-87091-55-5.
3. Agrios GN. 2005. Plant pathology. Elsevier Academic Press, Boston. ISBN 0-12-044565-4.
4. Bagar M. 2011. Nové prostředky v systému ochrany ovoce před houbovými chorobami. Zahradnictví. **IX**(04): 18-19. ISSN 1213-7596.
5. Blažek, J. 2001. Ovocnictví. Květ, Praha. ISBN 80-85362-43-0.
6. Borck K, Braymer HD. 1974. The genetic analysis of resistance to benomyl in *Neurospora crassa*. Journal of General Microbiology. **85**:51-56.
7. Brent KJ, Hollomon DW. 2007. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed?. FRAC, Brusel.
8. Buchtová I. 2018. Situační a výhledová zpráva: Ovoce. Ministerstvo zemědělství České republiky, Praha. ISBN 978-80-7434-473-2.
9. Bus VGM, Laurens FND, Van De Weg WE. 2005. The Vh8 locus of a new gene-for-gene interaction between *Venturia inaequalis* and the wild apple *Malus sieversii* is closely linked to the Vh2 locus in *Malus pumila* R12740-7A. New Phytologist **166**(3): 1035-1049. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2005.01395.x.
10. Bus VG, Rikkerink EH, Caffier V, Durel CE, Plummer KM. 2011. Revision of the nomenclature of the differential host-pathogen interactions of *Venturia inaequalis* and *Malus*. Annual Review of Phytopathology **49**: 391–413.
11. Carisse O, Svicerev A, Smith R. 2000. Integrated biological control of apple scab. Integrated Control of Pome Fruits. *IOBC wprs Bulletin* **23**(12): 23-28.
12. Carisse O, Jobin T. 2010. Resistance in dodine populations of *Venturia inaequalis* in Quebec,

Canada. Plant Health Progress. DOI: 10.1094/PHP-2010-0614-01-RS.

13. Cox KD. 2015. Fungicide Resistance in *Venturia inaequalis*, the Causal Agent of Apple Scab in the United States. Pages 433-447 in Ishii H, HOLLomon DW, editors. Fungicide resistance in plant pathogens: principles and a guide to practical management. Tokyo: Springer. ISBN 978-4-431-55641-1.
14. Cuomo CA, Guldener U, Xu JR, Trail F. 2007. The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localised polymorphism and pathogen speciation. *Science* **317**:1400–1402.
15. Delp CJ, Dekker J. 1985. Fungicide resistance: definitions and use of terms. *EPPO Bulletin* **15**: 333 - 335. DOI: 10.1111/j.1365-2338.1985.tb00237.x.
16. Graham-Bryce IJ. 1987. Resistance to pesticides and antibiotics: how far is it comprehensible and manageable?. Pages 11-25 in Ford MG, Hollomon DW, Khambay BPS, Sawicki RM, editors. Combating resistance to xenobiotics: biological and chemical approaches. Ellis Horwood, Chichester. ISBN 978-0895736017.
17. Griffiths AJF. 1996. Mitochondrial inheritance in filamentous fungi. *Journal of Genetics* **75**:403–414.
18. Gessler C, Patocchi A, Sansavini S, Tartarini S, Gianfranceschi L. 2007. *Venturia inaequalis* Resistance in Apple. *Critical Reviews in Plant Sciences* **25**(6): 473-503 DOI: 10.1080/07352680601015975.
19. Gisi U, Sierotzki H, Cook A, McCaffery A. 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science* **58**: 859–867.
20. Grovel GG, Eastwell KC, Jones AL, Sutton TB. 2003. Diseases of Apple. Pages 468 - 470 in Ferree DC, Warrington IJ, editors. Apples: botany, production, and uses. CABI Pub, New York. ISBN 0-85199-592-6.
21. Hluchý M, Ackermann P, Zacharda M, Bagar M, Jetmarová E, Vanek G. 1997. *Obrazový atlas chorob a škůdců ovocných dřevin a révy vinné*. Biocont Laboratory, Brno. ISBN 80-901874-2-1.

22. Hollomon DW. 2015. Fungicide Resistance: 40 Years on and Still a Major Problem. Pages 3-11 in Ishii H, Hollomon DW, editors. Fungicide resistance in plant pathogens: principles and a guide to practical management. Springer, Tokyo. ISBN 978-4-431-55641-1.
23. Index Fungorum. 2019. *Venturia inaequalis*. Available from <http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=164141> (accessed March 2019).
24. Ishii H. 2010. QoI fungicide resistance: current status and the problems associated with DNAbased monitoring. Pages 37-45 in Gisi U, Chet I, Gullino ML, editors. Recent developments in management of plant diseases, plant pathology in the 21st century, vol . Springer, Dordrecht.
25. Jackson JE. 2003. Biology of apples and pears. Cambridge University Press, New York. ISBN 0-521-38018-9.
26. Jamar L. 2011. Innovative strategies for the control of apple scab (*Venturia inaequalis* [Cke.] Wint.[Doctoral thesis]. Université de Liège, Gembloux.
27. Jones AL, Aldwinckle HS. 1990. Compendium of apple and pear diseases. APS Press, St. Paul, Minnesota. ISBN 0890541094.
28. Juroch, Jan. 2010. Řízení ochrany proti strupovitosti jableň (*Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.) [Absolventská práce]. Mendelova univerzita v Brně Institut celoživotního vzdělávání, Brno.
29. Kloutvorová J, Lánský M, Ouředníčková J, Náměstek J, Chaloupka R. 2015. Metodické postupy na podporu uplatňování zásad integrované ochrany jádřovin a peckovin. Ministerstvo zemědělství.
30. Kloutvorová J, Jaklová P, Ryšánek P, Zouhar M, Mazáková J, Maňasová M. 2018. Metodika kvantitativní detekce mutace v genu *cytB* u *Venturia Inaequalis* a postupů stanovení rezistence patogena k vybraným DMI fungicidům. Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský, Holovousy.

31. Köller W. 1999. Chemical approaches to managing plant pathogens. Pages 337-376 in Ruberson JR, editor. Handbook of pest management. Marcel Dekker, New York. ISBN 978-0824794330.
32. Köller W, Wilcox WF, Parker DM. 2005. Sensitivity of *Venturia inaequalis* populations to anilinopyrimidine fungicides and their contribution to scab management in New York. Plant Disease **89**(4):357-365. DOI: 10.1094/PD-89-0357.
33. Korsgaard M. 2014. Strategic irrigation can reduce apple scab (*Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.). Pages 52-58 in 16th International Conference on Organic Fruit Growing. FOEKO, Hohenheim. ISBN 978-3-00-045071-6.
34. Kunz S, Deising H a Kurt Mendgen K. 1997. Acquisition of Resistance to Sterol Demethylation Inhibitors by Populations of *Venturia inaequalis*. Phytopathology **87** (12) 1272-1278.
35. Kužma Š. 2002. Metodická příručka pro ochranu rostlin. Zelenina, ovocné plodiny, réva, Díl I. Choroby rostlin. SRS. Brno.
36. Lánský, M., Kloutvorová, J. 2014. Strupovitost jabloně: nejzávažnější choroba jablek. Agromanuál, České Budějovice. Available from <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/choroby/strupovitost-jablone-nejvaznejsi-choroba-jablek> (accessed February 2019).
37. Lateur M, Wagemans C, Populer C. 1999. Evaluation of fruit tree genetic resources as sources of polygenic scab resistance in apple breeding. ISHS Acta horticulturae **484**:35-42.
38. Laurens F. 1999. Review of the current apple breeding programmes in the world: objective for scion cultivar improvement. ISHS. Acta horticulturae **484**: 162-170.
39. Lesniak KE, Proffer TJ, Beckerman JL, Sundin GW. 2011. Occurrence of QoI resistance and detection of the G143A mutation in Michigan populations of *Venturia inaequalis*. Plant Disease **95**:927-934.
40. Lespinasse Y. 1989. Breeding pome fruits with stable resistance to disease: 3 genes, resistance mechanisms, present work and prospects. IOBC-WPRS Bul. **12**: 100-115.

41. Ma Z, Michailides TJ. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* **24**:853–863. DOI: 10.1016/j.cropro.2005.01.011.
42. MacHardy WE. *Apple scab: biology, epidemiology and management*. APS Press, St. Paul, Minnesota. ISBN 978-0890542064.
43. *Milvia De Miccolis Angelini R, Pollastro S, Faretra F. 2015. Genetics of Fungicide Resistance*. Pages 13-34 in Ishii H, Hollomon DW, editors. *Fungicide resistance in plant pathogens: principles and a guide to practical management*. Springer, Tokyo. ISBN 978-4-431-55641-1.
44. Ministerstvo zemědělství. 2019. Vyhledávání v registru přípravků. Ministerstvo zemědělství, Praha. Available from <http://eagri.cz/public/app/eagriapp/POR/Vyhledavani.aspx> (accessed February 2019).
45. Molnar A, Hornok L, Pesti M. 1985. The high level of benomyl tolerance in *Fusarium oxysporum* is determined by the synergistic interaction of two genes. *Experimental Mycology* **9**:326–333.
46. Naqvi SAMH. 2004. *Diseases of fruits and vegetables: diagnosis and management*. Kluwer Academic Publishers, Boston. ISBN 1-4020-1822-3.
47. Nesrsta D, Jan T. 2016. *Přehled odrůd: Ovoce*. Národní odrůdový úřad, Brno. ISBN 978-80-7401-126-9.
48. Nikou D, Malandrakis A, Konstakaki M, Vontas J, Markoglou A, Ziogas B. 2009. Molecular characterization and detection of overexpressed C-14 alpha-demethylase-based DMI resistance in *Cercospora beticola* field isolates. *Biochemistry and Physiology* **95**:18–27.
49. Olaya G, Zheng D, Köller W. 1998. Differential responses of germinating *Venturia inaequalis* conidia to kresoxim-methyl. *Pesticide Science* **54**(3):230 – 236. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9063(1998110)54:3<230::AID-PS815>3.0.CO;2-O.

50. Parisi L, Lespinasse Y, Krüger J. 1993. A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the Vf gene. *Phytopathology* **83**(5): 533-537. DOI: 10.1007/978-94-011-0467-8_16.
51. Parisi L, Lespinasse Y. 1996. Pathogenicity of *Venturia inaequalis* strains of Race 6 on apple clones (*Malus* sp.) *Plant Dis.* **80**:1179-1183.
52. Petersen JH. 2013. *The Kingdom of Fungi*. Princeton University Press, New Jersey. ISBN 978-0-691-15754-2.
53. Quello KL, Chapman KS, Beckerman JL. 2010. In situ detection of benzimidazole resistance in field isolates of *Venturia inaequalis* in Indiana. *Plant Disease* **94**:744–750. DOI: 10.1094/PDIS-94-6-0744.
54. Rostlinolékařský portál. 2014. Strupovitost jabloně. Available from http://eagri.cz/public/app/srs_pub/fytoportal/public/?key=%22cc2ed38a2c348617a4b9b393d701434d%22#ior|met:cc2ed38a2c348617a4b9b393d701434d|kap1:choroby|kap:bad2d59a0927e6d31a2499e0f321966d (accessed March 2019).
55. Sandskär B. 2003. *Apple Scab (Venturia inaequalis) and Pests in Organic Orchards* [Doctoral thesis]. Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp. ISBN 91-576-6416-1.
56. Novák J, Skalický M. 2009. *Botanika: cytologie, histologie, organologie a systematika*. Powerprint, Praha. ISBN 978-80-904011-5-0.
57. Sosna I. 2014. Estimation Of Productive Value Of Czech Origin Scab-Resistant Apple Cultivars On Different Rootstocks. *Journal of Horticultural Research* **22**(2): 115-121. DOI: 10.2478/johr-2014-0028.
58. Steinfeld U, Sierotzki H, Parisi S, Gisi U. 2002. Comparison of resistance mechanisms to strobilurin fungicides in *Venturia inaequalis*. Pages 167-176 in Lyr H, Russell PE, Dehne HW, Gisi U, Kuck KH, editors. *Modern fungicides and antifungal compounds III*. Proceedings of the 13th international reinhardsbrunn symposium, Reinhardsbrunn, Germany, May 2001. AgroConcept GmbH, Bonn.
59. Tomiczek Ch. 2005. *Atlas chorob a škůdců okrasných dřevin*. Biocont Laboratory, Brno. ISBN 80-901874-5-5.

60. van den Bosch F, Pavely N, Shaw M, Hobbelen P, Oliver R. 2011. The dose rate debate: does the risk of fungicide resistance increase or decrease with dose? *Plant Pathology* **60**:597–606.
61. Vávra R. 2015. Detekce ras a populací rezistentních k fungicidům patogena *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. na území České republiky. VŠUO, Holovousy. ISBN 978-80-87030-44
62. Vega B, Dewdney MM. 2014. QoI-resistance stability in relation to pathogenic and saprophytic fitness components of *Alternaria alternata* from citrus. *Phytopathology* **98**:1371–1378. DOI: 10.1094/PDIS-01-14-0078-RE.
63. Westcott C, Horst RK. 2008. Westcott's plant disease handbook. Springer, New York. ISBN 978-1-4020-4584-4.
64. Zacha V, Vaněk G, Nováková J. 1989. Atlas chorôb a škodcov ovocných dřevín a viniča. Příroda, Bratislava. ISBN 80-07-00044-5.
65. Zheng D, Olaya G, Köller W. 2000. Characterization of laboratory mutants of *Venturia inaequalis* resistant to the strobilurin-related fungicide kresoxim-methyl. *Current Genetics* **38**:148–155. DOI: 10.1007/s002940000147.

9 Samostatné přílohy

9.1 Seznam příloh

Tabulka č. 8: Účinek ú. l. *pyraclostrobin* na růst izolátů *V. inaequalis*.

Tabulka č. 9: Účinek ú. l. *boscalid* na růst izolátů *V. inaequalis*.

Tabulka č. 10: Účinek ú. l. *tebuconazole* na růst izolátů *V. inaequalis*.

Tabulka č. 11: Účinek ú. l. *trifloxystrobin* na růst izolátů *V. inaequalis*.

Obrázek č. 2: List jabloně napadený patogenem *Venturia inaequalis* (Foto autor)

Obrázek č. 3: Izolát *Venturia inaequalis* (Foto autor)

Obrázek č. 4: Měření růstu mycelia *Venturia inaequalis* (Foto autor)

Obrázek č. 5: Izolát R16 na PDA s účinnou látkou *pyraclostrobin* (Foto autor)

Obrázek č. 6: Izolát R11 na PDA s účinnou látkou *boscalid* (Foto autor)

Obrázek č. 7: Izolát R13 na PDA s účinnou látkou *tebuconazole* (Foto autor)

Obrázek č. 8: Izolát R6 na PDA s účinnou látkou *trifloxystrobin* (Foto autor)

Tabulka č. 8: Účinek ú. l. *pyraclostrobin* na růst izolátů *V. inaequalis*. 1 – 0,001; 2 – 0,01; 3 – 0,1; 4–1; 5–10 µg/ml

| izolát | koncentrace | % růstu | EC ₅₀ (µg/ml) |
|--------|-------------|----------|--------------------------|
| R1 | 1 | 1 920,71 | - |
| | 2 | 1 798,61 | |
| | 3 | 344,01 | |
| | 4 | 91,27 | |
| | 5 | 127,11 | |
| R2 | 1 | 1 762,90 | - |
| | 2 | 1 665,00 | |
| | 3 | 531,91 | |
| | 4 | 168,09 | |
| | 5 | 103,37 | |
| R3 | 1 | 987,21 | - |
| | 2 | 729,66 | |
| | 3 | 435,08 | |
| | 4 | 165,19 | |
| | 5 | 102,22 | |
| R4 | 1 | 909,71 | - |
| | 2 | 1 244,96 | |
| | 3 | 621,67 | |
| | 4 | 110,70 | |
| | 5 | 79,41 | |
| R5 | 1 | 1 412,52 | - |
| | 2 | 1 351,81 | |
| | 3 | 292,01 | |
| | 4 | 123,53 | |
| | 5 | 83,33 | |
| R6 | 1 | 120,79 | - |
| | 2 | 46,71 | |
| | 3 | 31,20 | |
| | 4 | 12,94 | |
| | 5 | 9,12 | |
| R7 | 1 | 115,40 | - |
| | 2 | 99,78 | |
| | 3 | 20,97 | |
| | 4 | 7,87 | |
| | 5 | 5,03 | |
| R8 | 1 | 119,70 | - |
| | 2 | 97,93 | |
| | 3 | 43,59 | |
| | 4 | 20,49 | |

| | | | |
|-----|---|----------|-------------|
| | 5 | 10,81 | |
| R9 | 1 | 117,70 | - |
| | 2 | 107,11 | |
| | 3 | 19,31 | |
| | 4 | 5,28 | |
| | 5 | 4,46 | |
| R10 | 1 | 109,04 | - |
| | 2 | 110,54 | |
| | 3 | 77,36 | |
| | 4 | 21,78 | |
| | 5 | 8,50 | |
| R11 | 1 | 103,89 | - |
| | 2 | 50,83 | |
| | 3 | 32,77 | |
| | 4 | 13,94 | |
| | 5 | 9,84 | |
| R12 | 1 | 128,98 | - |
| | 2 | 54,72 | |
| | 3 | 58,03 | |
| | 4 | 33,91 | |
| | 5 | 23,44 | |
| R13 | 1 | 121,27 | - |
| | 2 | 92,49 | |
| | 3 | 69,23 | |
| | 4 | 31,15 | |
| | 5 | 8,08 | |
| R14 | 1 | 99,36 | 0,066158159 |
| | 2 | 44,73 | |
| | 3 | 25,98 | |
| | 4 | 14,98 | |
| | 5 | 7,09 | |
| R15 | 1 | 1 016,27 | - |
| | 2 | 967,92 | |
| | 3 | 552,20 | |
| | 4 | 306,68 | |
| | 5 | 194,58 | |
| R16 | 1 | 94,17 | 0,038009904 |
| | 2 | 33,42 | |
| | 3 | 36,74 | |
| | 4 | 16,45 | |
| | 5 | 15,04 | |
| R17 | 1 | 99,46 | 0,118012739 |
| | 2 | 71,00 | |

| | | | |
|---------|---|-------|-------------|
| | 3 | 39,20 | |
| | 4 | 10,12 | |
| | 5 | 11,13 | |
| Suchdol | 1 | 99,16 | - |
| | 2 | 91,21 | |
| | 3 | 83,09 | |
| | 4 | 91,38 | |
| | 5 | 72,88 | |
| Miličín | 1 | 92,50 | 0,030182141 |
| | 2 | 51,29 | |
| | 3 | 24,78 | |
| | 4 | 11,67 | |
| | 5 | 8,23 | |

Tabulka č. 9: Účinek ú. l. *bosclid* na růst izolátů *V. inaequalis*. 1 – 0,001; 2 – 0,01; 3 – 0,1; 4–1; 5–10 µg/ml

| izolát | koncentrace | % růstu | EC50 (µg/ml) |
|--------|-------------|---------|--------------|
| R1 | 1 | 68,38 | 0,123082816 |
| | 2 | 91,80 | |
| | 3 | 89,66 | |
| | 4 | 10,36 | |
| | 5 | 5,86 | |
| R2 | 1 | 82,41 | 0,167330283 |
| | 2 | 82,35 | |
| | 3 | 96,86 | |
| | 4 | 10,11 | |
| | 5 | 5,18 | |
| R3 | 1 | 83,85 | - |
| | 2 | 132,74 | |
| | 3 | 78,38 | |
| | 4 | 28,96 | |
| | 5 | 11,99 | |
| R4 | 1 | 99,87 | - |
| | 2 | 103,83 | |
| | 3 | 70,97 | |
| | 4 | 10,68 | |
| | 5 | 12,75 | |
| R5 | 1 | 78,83 | 0,106533402 |
| | 2 | 87,03 | |
| | 3 | 77,34 | |
| | 4 | 11,64 | |
| | 5 | 8,18 | |
| R6 | 1 | 99,30 | 0,282786756 |
| | 2 | 95,72 | |
| | 3 | 64,87 | |
| | 4 | 13,82 | |
| | 5 | 11,70 | |
| R7 | 1 | 95,47 | - |
| | 2 | 102,92 | |
| | 3 | 104,61 | |
| | 4 | 16,52 | |
| | 5 | 9,96 | |
| R8 | 1 | 97,39 | - |
| | 2 | 98,13 | |
| | 3 | 107,96 | |
| | 4 | 13,02 | |

| | | | |
|-----|---|--------|-------------|
| | 5 | 8,89 | |
| R9 | 1 | 91,41 | - |
| | 2 | 157,71 | |
| | 3 | 200,09 | |
| | 4 | 26,70 | |
| | 5 | 16,80 | |
| R10 | 1 | 121,64 | - |
| | 2 | 130,07 | |
| | 3 | 129,14 | |
| | 4 | 17,53 | |
| | 5 | 10,54 | |
| R11 | 1 | 95,97 | 0,539188077 |
| | 2 | 95,93 | |
| | 3 | 95,93 | |
| | 4 | 21,34 | |
| | 5 | 9,89 | |
| R12 | 1 | 104,55 | - |
| | 2 | 121,93 | |
| | 3 | 65,19 | |
| | 4 | 25,65 | |
| | 5 | 16,34 | |
| R13 | 1 | 128,54 | - |
| | 2 | 144,14 | |
| | 3 | 67,17 | |
| | 4 | 26,22 | |
| | 5 | 14,82 | |
| R14 | 1 | 96,17 | 0,367875382 |
| | 2 | 96,31 | |
| | 3 | 83,78 | |
| | 4 | 14,93 | |
| | 5 | 13,84 | |
| R15 | 1 | 70,04 | - |
| | 2 | 77,11 | |
| | 3 | 109,76 | |
| | 4 | 11,05 | |
| | 5 | 9,69 | |
| R16 | 1 | 99,08 | 0,241973163 |
| | 2 | 92,17 | |
| | 3 | 69,63 | |
| | 4 | 11,94 | |
| | 5 | 10,88 | |
| R17 | 1 | 69,58 | - |
| | 2 | 95,68 | |

| | | | |
|---------|---|--------|---|
| | 3 | 118,42 | |
| | 4 | 24,07 | |
| | 5 | 13,81 | |
| Suchdol | 1 | 117,24 | - |
| | 2 | 84,88 | |
| | 3 | 95,97 | |
| | 4 | 8,18 | |
| | 5 | 6,81 | |
| Miličín | 1 | 96,59 | - |
| | 2 | 92,88 | |
| | 3 | 108,63 | |
| | 4 | 22,09 | |
| | 5 | 16,22 | |

Tabulka č. 10: Účinek ú. l. *tebuconazole* na růst izolátů *V. inaequalis*. 1 – 0,001; 2 – 0,01; 3 – 0,1; 4–1; 5 – 10 µg/ml

| izolát | koncentrace | % růstu | EC50 (µg/ml) |
|--------|-------------|---------|--------------|
| R1 | 1 | 88,78 | - |
| | 2 | 93,93 | |
| | 3 | 97,42 | |
| | 4 | 90,98 | |
| | 5 | 83,57 | |
| R2 | 1 | 105,81 | - |
| | 2 | 98,61 | |
| | 3 | 95,27 | |
| | 4 | 107,13 | |
| | 5 | 101,96 | |
| R3 | 1 | 124,59 | - |
| | 2 | 106,53 | |
| | 3 | 61,19 | |
| | 4 | 20,07 | |
| | 5 | 18,19 | |
| R4 | 1 | 98,85 | - |
| | 2 | 73,05 | |
| | 3 | 62,92 | |
| | 4 | 70,52 | |
| | 5 | 64,53 | |
| R5 | 1 | 89,22 | 0,013166069 |
| | 2 | 27,91 | |
| | 3 | 18,80 | |
| | 4 | 19,07 | |
| | 5 | 17,86 | |
| R6 | 1 | 99,42 | 0,094412166 |
| | 2 | 60,25 | |
| | 3 | 27,01 | |
| | 4 | 12,80 | |
| | 5 | 12,65 | |
| R7 | 1 | 96,81 | - |
| | 2 | 88,12 | |
| | 3 | 105,98 | |
| | 4 | 109,09 | |
| | 5 | 124,80 | |
| R8 | 1 | 103,89 | - |
| | 2 | 88,64 | |
| | 3 | 92,61 | |
| | 4 | 113,64 | |
| | 5 | 85,82 | |

| | | | |
|-----|---|--------|-------------|
| R9 | 1 | 77,22 | |
| | 2 | 65,53 | |
| | 3 | 70,80 | |
| | 4 | 74,32 | |
| | 5 | 42,65 | |
| R10 | 1 | 140,60 | - |
| | 2 | 157,75 | |
| | 3 | 154,44 | |
| | 4 | 133,26 | |
| | 5 | 143,39 | |
| R11 | 1 | 98,06 | 0,758918984 |
| | 2 | 50,73 | |
| | 3 | 41,59 | |
| | 4 | 54,41 | |
| | 5 | 45,66 | |
| R12 | 1 | 72,57 | 0,003613261 |
| | 2 | 34,78 | |
| | 3 | 16,16 | |
| | 4 | 10,52 | |
| | 5 | 10,84 | |
| R13 | 1 | 88,58 | 0,218842999 |
| | 2 | 92,25 | |
| | 3 | 51,90 | |
| | 4 | 21,99 | |
| | 5 | 20,19 | |
| R14 | 1 | 99,94 | 0,217393368 |
| | 2 | 72,72 | |
| | 3 | 24,21 | |
| | 4 | 19,81 | |
| | 5 | 23,99 | |
| R15 | 1 | 99,03 | - |
| | 2 | 98,85 | |
| | 3 | 96,00 | |
| | 4 | 93,09 | |
| | 5 | 77,15 | |
| R16 | 1 | 79,92 | - |
| | 2 | 76,94 | |
| | 3 | 94,67 | |
| | 4 | 70,97 | |
| | 5 | 81,90 | |
| R17 | 1 | 90,02 | 0,014464545 |
| | 2 | 37,58 | |
| | 3 | 15,45 | |
| | 4 | 12,06 | |

| | | | |
|---------|---|--------|---|
| | 5 | 9,14 | |
| Suchdol | 1 | 104,53 | - |
| | 2 | 98,58 | |
| | 3 | 124,09 | |
| | 4 | 88,28 | |
| | 5 | 81,67 | |
| Miličín | 1 | 98,50 | - |
| | 2 | 71,05 | |
| | 3 | 92,20 | |
| | 4 | 78,05 | |
| | 5 | 85,95 | |

Tabulka č. 11: Účinek ú. l. *trifloxystrobin* na růst izolátů *V. inaequalis*. 1 – 0,001; 2 – 0,01; 3 – 0,1; 4–1; 5 – 10 µg/ml

| izolát | koncentrace | % růstu | EC50 (µg/ml) |
|--------|-------------|---------|--------------|
| R1 | 1 | 83,53 | - |
| | 2 | 84,43 | |
| | 3 | 95,09 | |
| | 4 | 71,86 | |
| | 5 | 63,45 | |
| R2 | 1 | 76,70 | - |
| | 2 | 79,00 | |
| | 3 | 82,07 | |
| | 4 | 91,99 | |
| | 5 | 80,82 | |
| R3 | 1 | 71,82 | 0,058827898 |
| | 2 | 60,16 | |
| | 3 | 54,87 | |
| | 4 | 27,12 | |
| | 5 | 22,52 | |
| R4 | 1 | 73,76 | - |
| | 2 | 73,09 | |
| | 3 | 66,06 | |
| | 4 | 69,84 | |
| | 5 | 73,90 | |
| R5 | 1 | 84,23 | 0,402970127 |
| | 2 | 76,71 | |
| | 3 | 70,79 | |
| | 4 | 45,21 | |
| | 5 | 20,98 | |
| R6 | 1 | 110,55 | - |
| | 2 | 74,42 | |
| | 3 | 37,74 | |
| | 4 | 41,80 | |
| | 5 | 16,28 | |
| R7 | 1 | 81,50 | - |
| | 2 | 88,72 | |
| | 3 | 91,22 | |
| | 4 | 96,05 | |
| | 5 | 64,03 | |
| R8 | 1 | 64,87 | 0,000720254 |
| | 2 | 32,51 | |
| | 3 | 18,87 | |
| | 4 | 28,24 | |

| | | | |
|-----|---|--------|-------------|
| | 5 | 30,53 | |
| R9 | 1 | 106,36 | - |
| | 2 | 72,29 | |
| | 3 | 70,03 | |
| | 4 | 42,18 | |
| | 5 | 44,97 | |
| R10 | 1 | 98,00 | - |
| | 2 | 114,96 | |
| | 3 | 116,23 | |
| | 4 | 110,48 | |
| | 5 | 118,53 | |
| R11 | 1 | 111,47 | - |
| | 2 | 110,36 | |
| | 3 | 103,02 | |
| | 4 | 129,49 | |
| | 5 | 112,89 | |
| R12 | 1 | 97,08 | - |
| | 2 | 111,19 | |
| | 3 | 90,14 | |
| | 4 | 84,30 | |
| | 5 | 92,52 | |
| R13 | 1 | 59,43 | 0,008968341 |
| | 2 | 47,32 | |
| | 3 | 38,31 | |
| | 4 | 41,37 | |
| | 5 | 37,31 | |
| R14 | 1 | 109,98 | - |
| | 2 | 98,19 | |
| | 3 | 88,54 | |
| | 4 | 86,25 | |
| | 5 | 109,84 | |
| R15 | 1 | 106,84 | - |
| | 2 | 103,35 | |
| | 3 | 89,14 | |
| | 4 | 95,70 | |
| | 5 | 103,78 | |
| R16 | 1 | 106,34 | - |
| | 2 | 91,99 | |
| | 3 | 107,15 | |
| | 4 | 96,48 | |
| | 5 | 110,66 | |
| R17 | 1 | 88,21 | 0,095314844 |
| | 2 | 55,15 | |

| | | | |
|---------|---|--------|---|
| | 3 | 52,05 | |
| | 4 | 23,42 | |
| | 5 | 24,53 | |
| Suchdol | 1 | 209,36 | - |
| | 2 | 102,69 | |
| | 3 | 279,50 | |
| | 4 | 112,06 | |
| | 5 | 90,09 | |
| Miličín | 1 | 103,08 | - |
| | 2 | 87,17 | |
| | 3 | 120,70 | |
| | 4 | 105,93 | |
| | 5 | 99,89 | |



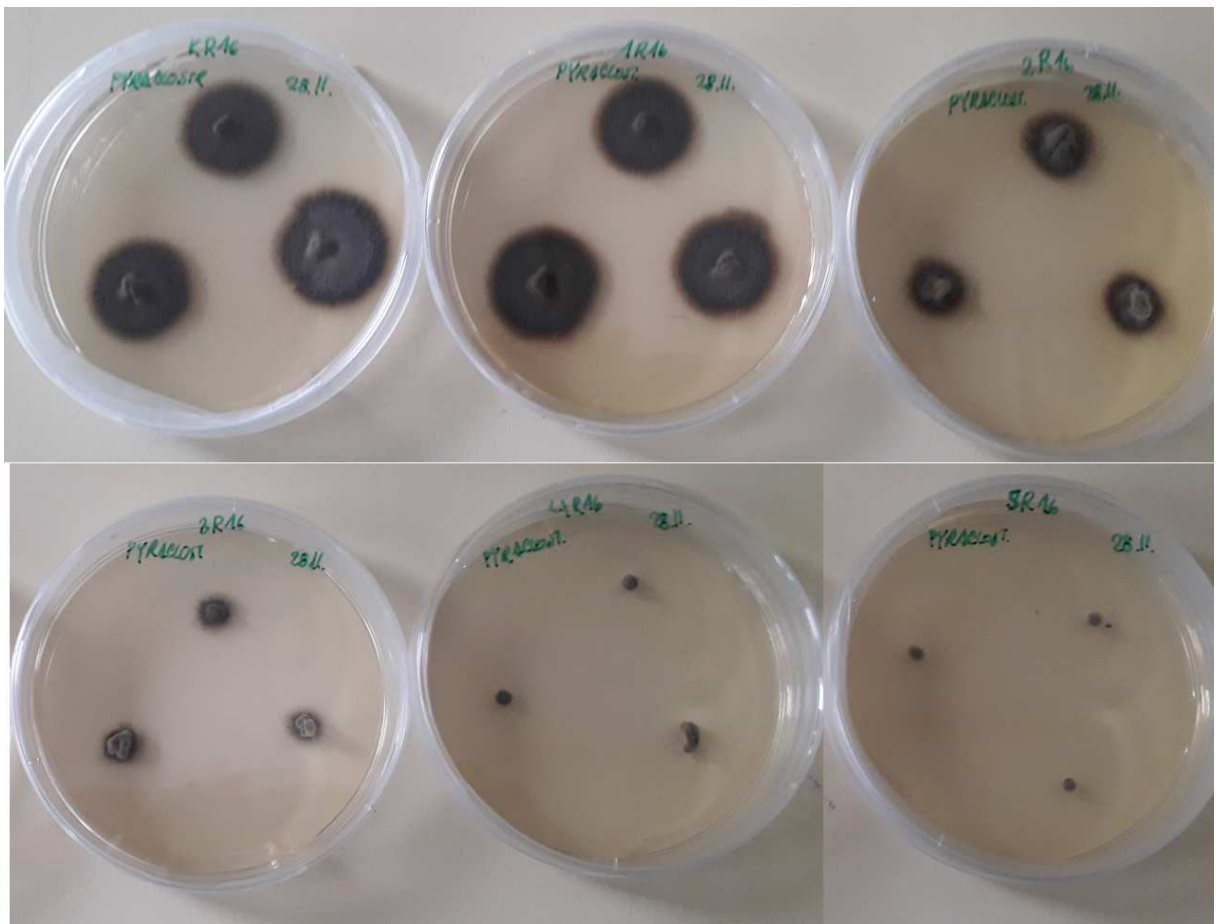
Obrázek č. 2: List jabloně napadený patogenem *Venturia inaequalis* (Foto autor)



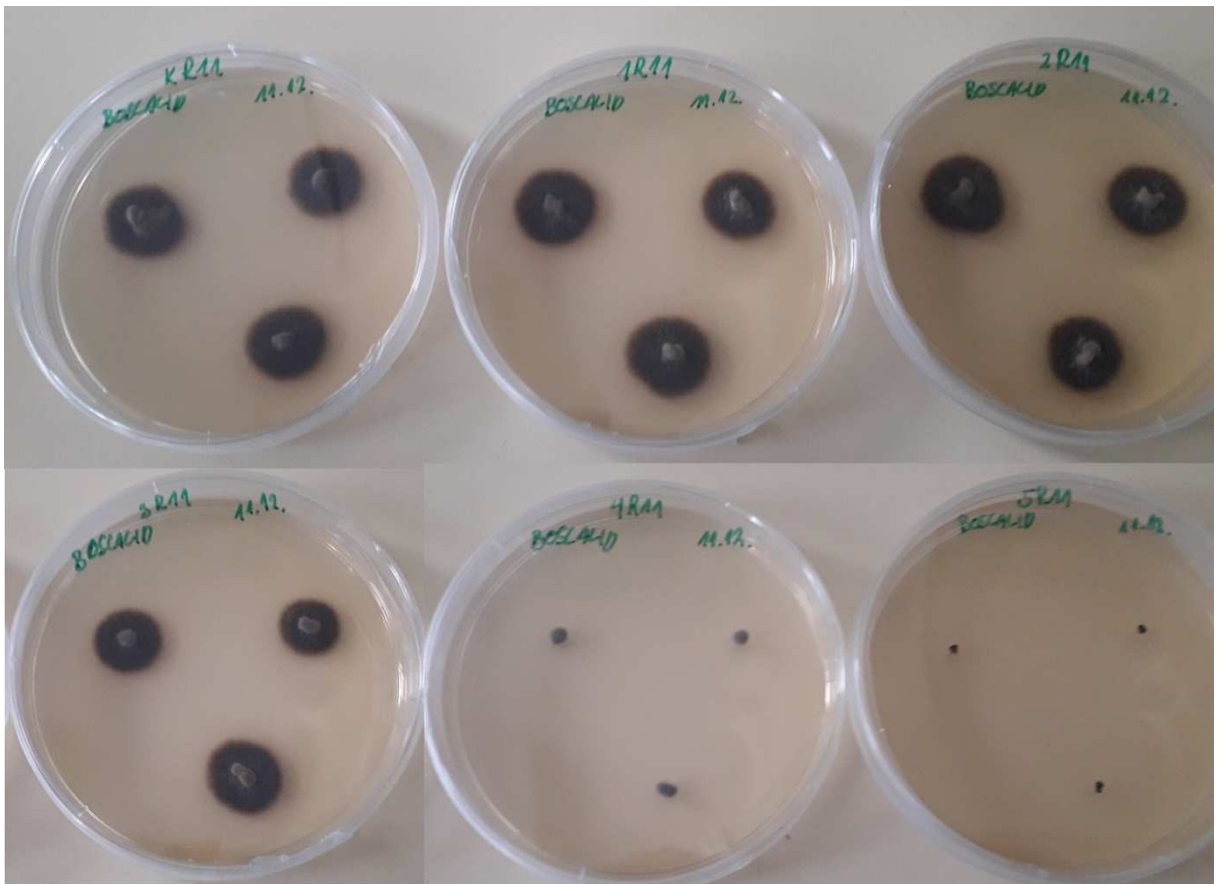
Obrázek č. 3: Izolát *Venturia inaequalis* (Foto autor)



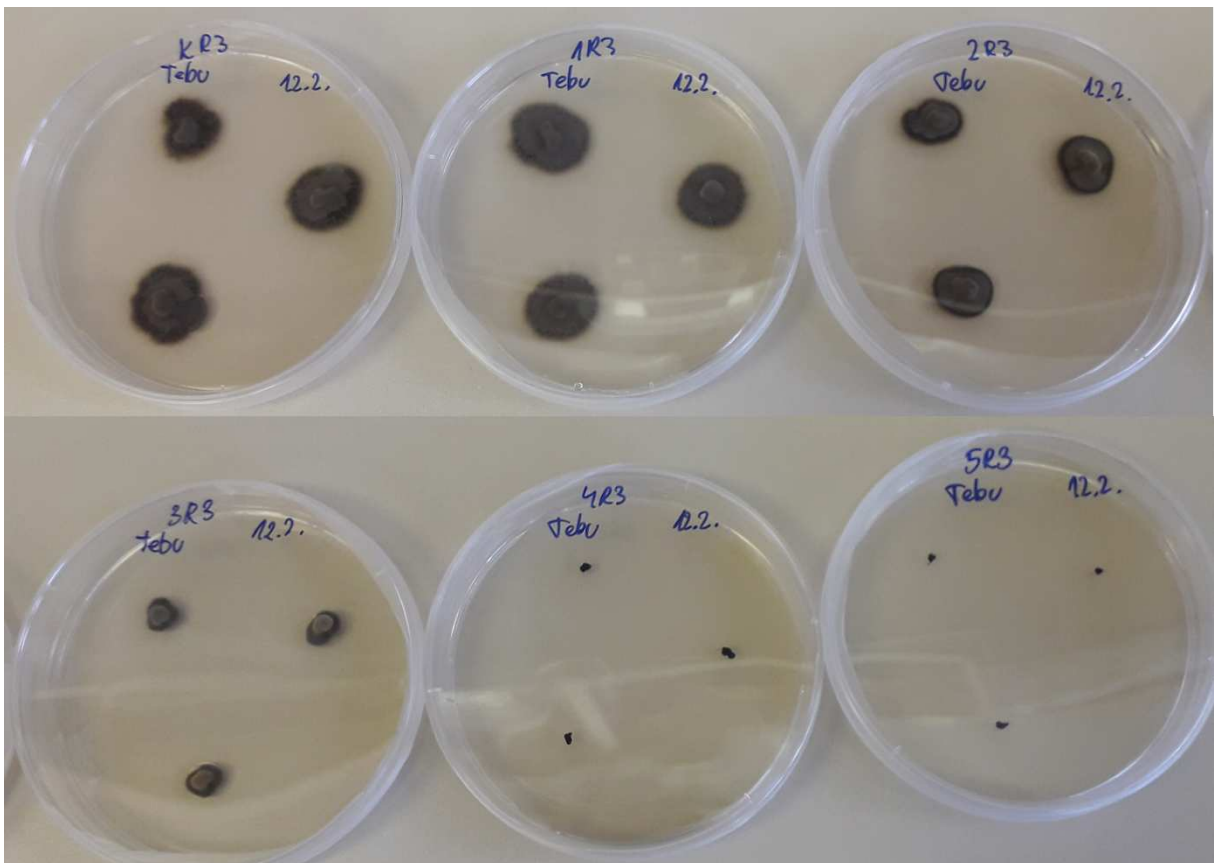
Obrázek č. 4: Měření růstu mycelia *Venturia inaequalis* (Foto autor)



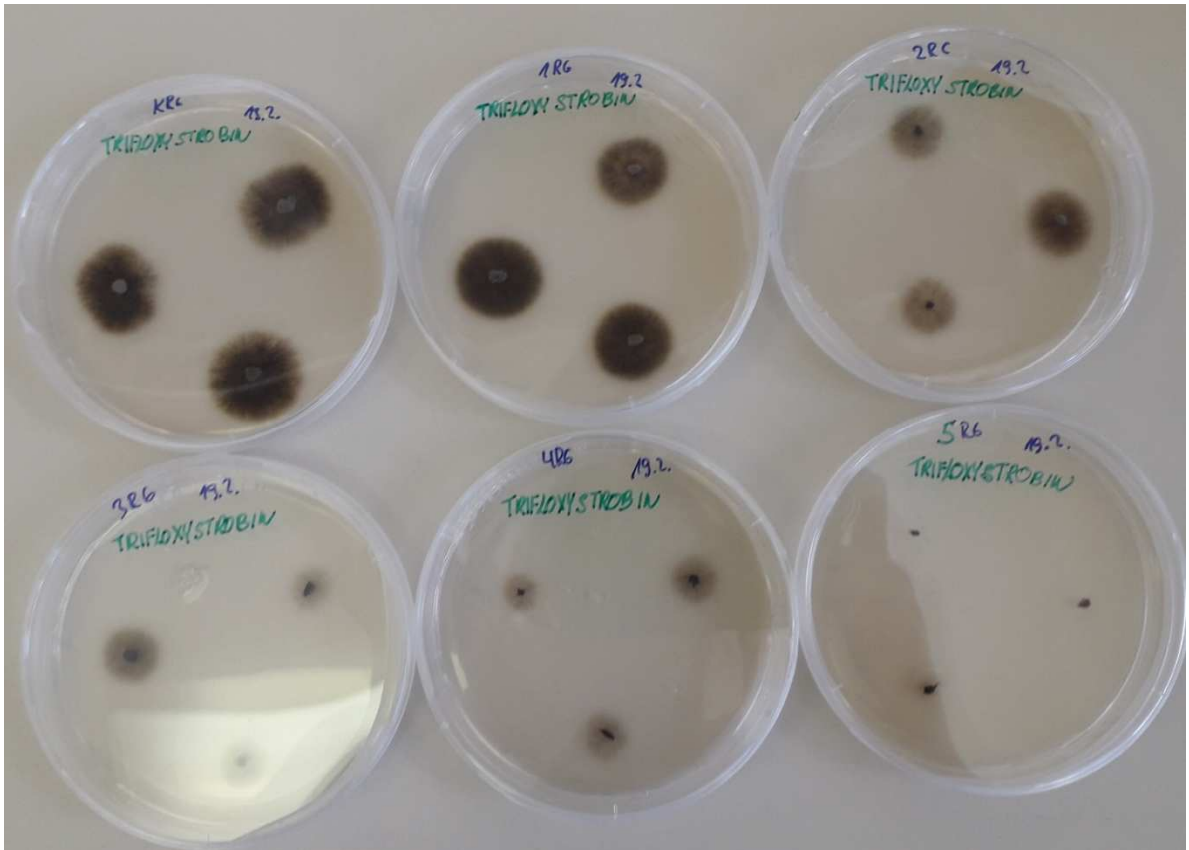
Obrázek č. 5: Izoláty R16 s účinnou látkou pyraclostrobin



Obrázek č. 6: Izoláty R11 s účinnou látkou *boscalid*



Obrázek č. 7: Izoláty R13 s účinnou látkou *tebuconazole*



Obrázek č. 8: Izoláty R6 s účinnou látkou *trifloxystrobin*