

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra ochrany rostlin



Odrůdy řepky ozimé rezistentní k organismu

Plasmodiophora brassicae

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: Ing. Jan Kazda, CSc.

Konzultant: Mgr. Veronika Řičařová

Autor práce: Marie Nikodýmová

Praha 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že tato diplomová práce s názvem „Odrůdy řepky ozimé rezistentní k organismu *Plasmodiophora brassicae*“ byla vypracována mnou, pod vedením vedoucího diplomové práce. Odborná literatura a další informační zdroje použité v této práci jsou citovány a uvedeny v seznamu literatury.

V Praze dne

Podpis autora

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala panu Ing. Janu Kazdovi, CSc., za odborné vedení, cenné rady a trpělivost, při psaní mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Veronice Řičařové, která mě provázela po dobu práce na experimentální části a byla mi velkou oporou. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celé katedře za zázemí a příjemnou atmosféru při práci na experimentální části. A konečně musím poděkovat rodině a to především svému muži a synovi.

Abstrakt

Plasmodiophora brassicae je obligátně biotrofní patogen způsobující nádorovitost kořenů brukvovitých. Vzhledem k rozsáhlému pěstování řepky olejky v České republice, téměř na 400 tisících ha půdy, se musí tomuto patogenu věnovat pozornost. Tento půdní patogen je schopen přežít v půdě, v podobě spor po několik let a způsobit velké výnosové ztráty. Výskyt tohoto patogena lze omezit klasickými agronomickými postupy, jako je dodržování osevního postupu, klasické zpracování půdy, likvidací brukvovitých plevelů, jakožto hostitelských rostlin. Dalšími metodami může být propařování půdy využitelné na malých plochách, chemická ochrana, která je méně účinná, nejlepších výsledků v oblasti ochrany bylo dosaženo pěstováním rezistentních odrůd. Vyšší pozornost a úsilí při práci na šlechtění došlo po nadměrném útoku patogena v Kanadě a Německu a následných 100 % ztrátách na výnosech. Výskyt tohoto patogena je lokalizován do oblasti mírného pásu, Evropy, Asie a Ameriky, kde pod jeho vlivem dochází k největším výnosovým ztrátám, nicméně dochází k jeho šíření i do tropických oblastí.

Předmětem této diplomové práce bylo ověřit účinnost registrovaných rezistentních odrůd v zahraničí pro podmínky České republiky. Odrůdy byly pěstovány ve skleníku, na půdě kontaminované patogenem *Plasmodiophora brassicae*, které pocházely z různých oblastí České republiky. Přítomnost patogena v půdě byla ověřena molekulární detekcí patogena, pomocí metody PCR. Následně bylo napadení rostlin vyhodnoceno symptomaticky, pomocí číselné stupnice v rozmezí 0-3, kdy číslo určuje stupeň napadení. Pokud kořeny nevykazují příznaky napadení, lze provést molekulární detekci z kořenů rostlin.

Detekce patogena byla, ve všech testovaných zeminách z daných lokalit, pozitivní. Po vyhodnocení se nejvíce osvědčily odrůdy RAP 1122 a SY Alister, které dosáhly nejlepších výsledků a byly schopné odolávat nátlaku patogena, naopak jako nevhodná odrůda pro podmínky České republiky se ukázala odrůda CWH 241.

Klíčová slova: *Plasmodiophora brassicae*, rezistence, rezistentní odrůdy, řepka ozimá, diagnostické metody

Abstract

Plasmodiophora brassicae is obligate biotrophic pathogen causing roots knot crucifer. Due to the extensive cultivation of oilseed rape in the Czech Republic, almost 400 000 ha of land, we must be paid attention to this pathogen. This soil pathogen is able to survive in the soil, in the form of a spore for many years and cause large yield losses. The incidence of this pathogen can eliminate traditional agronomic practices comply with crop rotation, tillage, liquidation of classic cabbage family weeds as host plants. Chemical methods are ineffective, and the most effective protection is growing resistant varieties. After the excessive attack of the pathogen in Canada and Germany and the subsequent 100% revenue losses more attention was given to breeding resistant species. This pathogen occurs the most in the area of the warm temperate zone of Europe, Asia and America, where are the biggest revenue losses, however nowadays it is spreading also to tropical areas.

The subject of this thesis was to verify the effectiveness of the resistant varieties registered abroad for the conditions of the Czech Republic. The varieties were grown in the greenhouse on the soil contaminated by the pathogen *Plasmodiophora brassicae*, which originate from different regions of the Czech Republic. The presence of the pathogen in the soil has been verified, the molecular detection of the pathogen in the soil was done by PCR method. Subsequently, the infestation of roots was evaluated symptomatically by using a numerical scale, in the range of 0-3 the number indicates the degree of infestation. If the roots do not show symptoms, molecular detection in the roots of plants can be done.

Pathogen was detected in all tested soils samples, the most successful variety were RAP 1122 and SY Alister, which reached the best results and have been able to withstand the pressure of the pathogen. By contrast, as inappropriate variety for the conditions of the Czech Republic was proved variety CWH 241.

Keywords: *Plasmodiophora brassicae*, resistance, resistant varieties, canola, diagnostic methods

Obsah

1.	ÚVOD.....	1
2.	VÝZKUMNÉ HYPOTÉZY A CÍL PRÁCE	2
3.	LITERÁRNÍ REŠERŠE	3
3.1	Řepka olejka (<i>Brassicae napus</i> subs. <i>napus</i>)	3
3.1.1	Historie, rozšíření, charakteristika Řepky olejky.....	3
3.1.3	Rozšíření, význam a využití.....	4
3.2	Významné choroby řepky	5
3.3	<i>Plasmodiophora brassicae</i>	7
3.3.1.	Taxonomie	7
3.3.2	Životní cyklus	7
3.3.3	Hostitelský okruh.....	10
3.3.5	Dispoziční faktory.....	10
3.4	Historie, prognóza a signalizace výskytu.....	12
3.4.1	Historie rozšíření.....	12
3.4.2	Rozšíření ve světě	13
3.4.3	Rozšíření v ČR.....	13
3.4.4	Prognóza	14
3.4.5	Monitoring	14
3.5	Patotypy.....	14
3.6	Interakce <i>Plasmodiophora brassicae</i> s hostitelem	15
3.7	Ochranná opatření	16
3.7.1	Prevence šíření.....	17
3.7.2	Agrotechnické opatření.....	17
3.7.3	Chemická ochrana.....	18
3.7.4	Fyzikální metody	19
3.7.5	Půdní solarizace	19
3.7.6	Biologická ochrana	20
3.7.7	Supresivní půdy	20
3.8	Rezistence	20
3.8.1	Rezistence <i>Brassica</i>	21
3.8.2	Šlechtění.....	21
3.8.3	Příznaky na rezistentní plodině.....	22
3.8.4	Rezistentní odrůdy	23

3.9	Detekce a determinace- <i>Plasmodiophora brassicae</i>	24
3.9.1	Metoda symptomatická.....	24
3.9.3	Metoda serologická.....	25
3.9.4	Metoda molekulární.....	26
3.9.4.1	Izolace DNA.....	26
3.9.4.2	PCR- polymerázová řetězová reakce.....	26
3.9.4.3	Elektroforetická separace PCR produktů	28
4.	MATERIÁL A METODY	29
4.1	Lokalita	29
4.2	Rostlinný materiál	30
4.3	Organizace pokusu	31
4.3.1	Příprava materiálu.....	31
4.3.2	Založení pokusu.....	31
4.4	Monitoring <i>Plasmodiophora brassicae</i>	32
4.4.1	Půdní vzorky	32
4.4.1.1	Měření pH.....	33
4.4.2.	Izolace DNA z půdy	33
4.4.2.1	Čistota a koncentrace vyizolované DNA	34
4.4.3	PCR- Polymerázová řetězová reakce.....	34
4.4.4	Elektroforetická separace.....	35
4.5	Metoda detekce <i>Plasmodiophora brassicae</i> v rostlinném pletivu	36
4.5.1	37
4.5.1.1	Čistota vyizolované DNA.....	38
4.5.2	PCR- Polymerázová řetězová reakce.....	38
4.5.3	Elektroforetická separace.....	38
5.	VÝSLEDKY	39
5.1	Vliv pH.....	39
5.2	Počet rostlin.....	40
5.3	Index napadení- DI (%).....	40
5.4	Detekce <i>Plasmodiophora brassicae</i> pomocí sekvence	45
5.5	Statistické vyhodnocení skleníkového pokusu.....	47
6.	DISKUZE	50
6.1	Monitoring patogena <i>Plasmodiophora brassicae</i>	50
6.2	Index napadení	51

6.2.1	Hodnocení odrůd.....	51
6.2.2	Hodnocení lokalit.....	52
6.3	Detekce Plasmodiophora brassicae	53
7.	ZÁVĚR	54
8.	SEZNAM LITERATURY	55
9.	SEZNAM PŘÍLOH.....	64

1. ÚVOD

V dnešní době plochy osázené řepkou dosahují téměř 400 tisíc hektarů, dochází k intenzifikaci pěstování, což má za následek častější výskyt chorob a škůdců řepky. Jedním z problematických onemocnění je nádorovitost kořenů brukvovitých, způsobená patogenem *Plasmodiophora brassicae*, patogen napadající rostliny z čeledi brukvovitých. Nádorovitost kořenů brukvovitých, je v dnešní době chorobou zatím spíše opomíjenou, je třeba získat hlubší znalosti o patogenu samotném, o jeho vlastnostech, potřebách a jiných faktorech nutných pro jeho rozvoj.

Tomuto patogenu je třeba věnovat čím dál větší pozornost, je nutné apelovat na pěstitele, aby si uvědomili nebezpečí této choroby a začali používat systém integrované ochrany. Kazda a kol. (2008) uvádí, že systém integrované ochrany využívá všech metod ochrany rostlin v souladu s ekonomickými, ekologickými a toxikologickými požadavky, aby byly škodlivé organismy udrženy pod hranicí škodlivosti, kdy jsou preferovány přirozené faktory regulující jejich výskyt. Evropská unie zavedla závazné směrnice, podle kterých musí pěstitelé dodržovat systém integrované ochrany. Tento systém ovšem vyžaduje větší znalosti a technologickou kázeň a nespolehat se na případnou „záchranu“ aplikací pesticidy.

V dnešní době se využívá řada prostředků se snahou omezit škody způsobené patogeny rostlin. Jedním z těchto prostředků je konvenční šlechtění na rezistenci. Existují odrůdy řepky, které se označují jako rezistentní k původci nádorovitosti kořenů brukvovitých *Plasmodiophora brassicae*. Těmto odrůdám je věnována pozornost při získávání informací o patogenu, odrůdy lze pěstovat na pozemcích zamořených patogenem *Plasmodiophora brassicae* a přitom dosáhnout bez použití dalších metod ochrany podobných hospodářských výsledků, jako při pěstování řepky na nezamořených pozemcích. Získání rezistentních odrůd, které by dosahovaly pozitivních výsledků proti všem vyskytujícím se patotypům patogena, by byl úspěch velkého významu celosvětových měřítek. Je třeba vybírat odrůdy odolné vůči patotypům vyskytujícím se v dané geografické oblasti. Tato práce je zaměřena na použití dostupných odrůd označovaných jako rezistentní v podmínkách ČR.

2. VÝZKUMNÉ HYPOTÉZY A CÍL PRÁCE

Hypotéza:

Rezistentní odrůdy vykazují na různých pozemcích rozdílné reakce na napadení patogenem *Plasmodiophora brassicae* v souvislosti s výskytem různých patotypů tohoto organismu.

Cílem této diplomové práce je:

- Sledovat vztah mezi rezistentní odrůdou a patogenem,
- ověřit zda odrůdy vyšlechtěné v zahraničí si uchovají rezistentní nebo tolerantní vlastnosti i v podmínkách ČR,
- ověřit, zda je možné využití rezistentních odrůd v praxi,
- dílčím cílem byla detekce patogena z půdních vzorků.

3. LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1 Řepka olejka (*Brassicae napus subs.napus*)

3.1.1 Historie, rozšíření, charakteristika Řepky olejky

Řepka olejka je dvouděložná rostlina řadící se spolu například s hořčicí bílou (*Sinapis alba*), brukví zelnou (*Brassica oleracea*) nebo brukví řepáku (*Brassica rapa* L. var *rapa*) do čeledi brukvovitých (Anonym1). Řepka olejnávznikla, jako přirozený mezidruhový kříženec druhu *B. oleracea* a *B. rapa*, má nízkou vnitrodruhovou genetickou variabilitu, která je pro jednotlivé taxony rozšiřována o geny pocházející z původních druhů (Diederichsem et al., 2009).

Do podvědomí se dostala už 2000 př. n. l v Indii, jako kulturní rostlina se uvedla až ve 13.století v Belgii. V Čechách se poprvé vyskytla 1587. Její pěstování se ujalo v letech 1820-1839. Po vzniku Československé republiky, po rozvoji svítiplynu a používáním petroleje ke svícení, došlo k úpadku pěstování olejnin (Fábry, 2007). Toto dokazuje fakt, kdy roku 1930 byla plocha Československa oseta jen 1073 hektary (Graf 1). V průběhu druhé světové války došlo k nárůstu plochy oseté řepkou, nicméně výnosy byly nízké. Nízká výnosnost způsobená rozpadem původní organizační struktury zemědělství pokračovala i po roce 1945 (Baranyk, 2013).

Významným zlomem v pěstování řepky byl počátek 80.let, kdy byly zavedeny odrůdy řepky bez kyseliny erukové a se sníženým obsahem glukosinolátů, a tak se stala řepka vhodnou i pro potravinářské a krmivářské účely (Bečka a kol. 2013). Od 80. let došlo k nárůstu osevní plochy řepkou (Vašák a kol., 2012), a od roku 2000 došlo rapidnímu nárůstu osevních ploch (Graf 1). Tyto změny nastaly v důsledku šlechtění odrůd se speciálním složením olejů, využití MEŘO (metylester řepkového oleje) pro výrobu bionafty, tolerance k herbicidům a k dalším abiotickým i biotickým faktorům (Baranyk, 2013). Důvodem nárůstu je nejen výhodná ekonomika a široké uplatnění ale i nutnost nějak agronomicky přijatelně řešit problematiku osevního postupu, situaci vzniklou po propadu živočišné výroby (Vašák a kol., 2012). Roku 2005 se začaly pěstovat polotrasličí odrůdy, které zjednodušily jednak pěstování ale i sklizeň. Dalším zlomem byl rok 2007, kdy došlo k optimalizaci vstupů a začala se využívat diagnostika ve výživě a ochraně, čímž došlo k zefektivnění a zlevnění pěstování (Bečka a kol., 2013). Od roku 2011 došlo k rapidnímu nárůstu farmářské ceny řepky a to o 46 % oproti předešlému roku (Vašák a kol. 2012). Pro rok 2013 byla osevní plocha řepky 418 tisíc hektarů, v roce 2014 osevní plocha klesla o 33 tisíc hektarů. Za

poklesem stojí počasí, pohyb cen ale také ztráta podpory biopaliv ze strany EU (Anonym 2). Evropská komise přehodnocuje pěstování řepky za účelem výroby biopaliva z důvodu omezení produkce skleníkových plynů, bylo dokázáno, že pokud by došlo k zalesnění plochy, kde se nyní pěstuje řepka, docílili bychom větších úspor skleníkových plynů, než při pěstování řepky pro biopaliva (Anonym 8). Vašák a kol. 2013 jmenují negativní vlivy, se kterými se musí řepka v současnosti vyrovnat.

- Pěstuje se i na nevhodných místech (sucho),
- po nevhodných předplodinách,
- chybí zlepšující předplodiny,
- polovina osevů se zakládá bezorebně,
- nedostatečné hnojení K, Mg, objevují se i nedostatky B a S.

Do roku 2012 byly plochy řepky na vzestupu, prof. Vašák tvrdí, že rok 2014 by mohl být v pěstování řepky mezníkem a že její osevní plocha začne klesat (Vašák a kol., 2013).

3.1.2 Podmínky pro pěstování

Bečka a kol. (2007) uvádí, že řepku lze úspěšně pěstovat od nížin až do nadmořských výšek kolem 700 m. Dále uvádí, že nejvíce je pěstována v bramborářských a řepářských oblastech. Nejlépe se jí daří v nadmořské výšce 400- 600 m, v oblastech s průměrnou roční teplotou 6,6-8,6°C a s ročním úhrnem srážek 550- 750mm (Bečka a kol., 2007). Optimální teplota pro klíčení řepky je 20- 25°C (Fábry, 2007). Baranyk (2005) uvádí, že při průměru kořenového krčku minimálně 0,8 mm je rostlina schopna odolávat holomrazům, teplotám pod – 20°C. Řepka je ohrožena při opakujících se holomrazech a nesvědčí jí ani vysoké teplotní rozdíly mezi dnem a nocí (Bečka a kol., 2007).

3.1.3 Rozšíření, význam a využití

Největšími pěstiteli řepky olejky jsou Čína, Kanada a třetím největším producentem je Indie, je pěstována v celém mírném pásu. (Singh et al., 2011). V současnosti se řadí na třetí místo jako nejvýznamnější zdroj oleje, po palmě olejné a sóje (Vašák a kol. 2013).

Řepka je vyhledávána pro její široké uplatnění, v potravinářství, při výrobě olejů a kosmetiky. Další uplatnění je v oleochemii, výroba bionafty, krmivářství. Díky šlechtění byla řepka zbavena, z krmivářského hlediska nežádoucí, kyseliny erukové a glukosinolátů. Dalším šlechtěním došlo k výrazné změně obsahu a složení mastných kyselin (Bečka a kol., 2007).

3.2 Významné choroby řepky

Řepka ozimá je potenciální hostitelskou plodinou pro více jak 71 druhů mikroorganismů (viry, bakterie, houby). Pouze asi deset, převážně houbového původu, je pro řepku nebezpečných (Bečka a kol., 2013). Kazda a kol. (2008) mezi nejzávažnější choroby řepky řadí fomové černání stonků řepky (*Leptosphaeria maculans*), šedou plísnovitost brukvovitých (*Botryotinia fuckeliana*), alternáriovou skvrnitost brukvovitých (*Alternaria brassicae*), verticiliové vadnutí (*Verticillium dahliae*), plíseň zelnou (*Perenospora brassicae*) a bílou hnilobu řepky (*Sclerotinia sclerotiorum*). V posledních letech dochází k jejich masivnímu šíření a dopadem je snížení výnosu semene o 20-50 %. Základním předpokladem pro snížení výskytu chorob je prevence: osevňovací postup, odstranění posklizňových zbytků, správná předseťová příprava, optimální hustota porostu. Ovšem v důsledku rozšíření pěstování řepky je právě prevence zanedbávaná, dochází k nedodržování osevňovacího postupu a pěstitelské technologie, což má za následek šíření chorob (Bečka a kol., 2007).

Co se týče houbových chorob, jde o ročníkovou záležitost, závislou především na průběhu počasí (Kazda a kol., 2008). Prokinová a kol. (2000) uvádějí jako nejzávažnější onemocnění patogenními houbami řepky **bílou hnilobu řepky** (*Sclerotinia sclerotiorum*) a **verticiliové vadnutí** (*Verticillium dahliae*). Ještě rozšířenější je **fómové černání stonků** (*Leptosphaeria maculans* L. *biglobosa*), proti které je ale většina odrůd odolných. Tato houba napadá všechny rostlinné části, první příznaky se objevují na podzim v podobě okrouhlých, světle zelených, žloutnoucích a postupně zasychajících skvrn na děložních a později i pravých listech. Na napadeném pletivu se objevují pyknidy (Prokinová, 2003). K významnějším škodám dochází, pokud choroba pronikne do kořenového krčku, dochází k tvorbě tmavých skvrn a následně nastává hniloba kořene a rostlina odumírá (Kazda a kol., 2008). K napadení krčků dochází v předjarní a jarním období a je často vázán na poškození krytonosci, zmiňuje Prokinová (2003). Bečka a kol. (2013) uvádí, že toto se stalo po zimě 2011/2012, kdy došlo k poškození pletiv mrazem a poškozená pletiva byla vstupní branou pro fomou. V roce 2011 přišla firma Monsanto na trh s odrůdou DK Ecellium, hybrid, ve kterém jsou jednak zakomponovány geny pro rychlejší vývoj, ale je obohacen o gen RLM 7, který je jedním z genů rezistence proti fómovému černání stonků. Dochází ke zvýšení odolnosti právě vůči tomuto patogenu v kritickém období, což je v době prodlužování stonku (Černý, 2012). Sortiment s odrůdami odolnými proti fómovému černání stonků je ale rozsáhlejší.

Bílá hniloba řepky (*Sclerotinia sclerotiorum*) poškozují řepku ve všech oblastech světa, proto se výzkumy zaměřují na vypracování spolehlivých prognostických programů,

vycházejících z vyhodnocení podmínek prostředí, jiné pracují se sumou efektivních teplot. K předpovědním metodám také patří tzv. petal test, kdy se přítomnost patogena zjišťuje jeho izolací z korunních plátků (Bečka a kol. 2012). Jde o patogena, který přežívá v půdě na infikovaných posklizňových zbytcích, tak volně ve formě sklerocií, která tvoří (Prokinová 2003). Tato sklerocia, jsou schopna v půdě přežít i 10 a více let, klíčení sklerocií je závislé na vlastnostech půdy. První viditelné příznaky se objevují v období dokvétání a po odkvětu řepky. Na stonku se tvoří protáhlé skvrny, které šednou, chytají stříbřité nádech a následně dochází k trhání pokožky rostliny. V místě napadení se často uvnitř stonku tvoří bílé vatovité mycelium (Prokinová, 2000). Nejvíce ohroženy jsou rostliny s křehkými a poškozenými pletivy, například po napadení škůdcem, mrazem nebo jako důsledek nadměrného dusíkatého hnojení (Kazda a kol., 2008). Jako ochranu je vhodné v období konce kvetení zvolit fungicidní postřik, dalšími opatřeními je hlubší zpracování půdy a odstraňování posklizňových zbytků (Prokinová, 2003).

Pravidelně se v porostech objevuje i **čern řepková**, způsobená houbou *Alternaria brassicicola* a *Alternaria brassicae*. Prvními příznaky jsou koncentrické hnědé okrouhlé skvrny. Toto onemocnění se stává problémem, pokud dojde k napadení šešulí, důsledkem toho je předčasné zasychání semen a pukání šešulí. I na průběh tohoto onemocnění má velký vliv průběh počasí. K největším ztrátám dochází v letech s vysokými srážkami a vysokou teplotou v době kvetení dozralosti. Nejlepší ochranou je fungicidní ošetření v době květu (Prokinová, 2003).

Jako další chorobu je třeba zmínit **šedouplísňovitost brukvovitých** (*Botrytis cinerea* anam.), příležitostný patogen vyhledávající dostatečnou vlhkost. Patogen přežívá na mnoha polních i zahradních plodinách, rostlinných zbytcích nebo ve formě sklerocií v půdě. Může docházet k šíření větrem na dlouhé vzdálenosti pomocí konidií. Napadá všechny nadzemní části rostliny, příznakem jsou šedé, rychle se zvětšující okrouhlé skvrny, které následně hnědnou a dochází k odumírání listu. Na stoncích dochází k tvorbě dlouhých hnědých skvrn. Šedohnědé skvrny se mohou objevovat i na šešulích. Náchylné jsou rostliny poškozené abiotickými faktory ale i živočišnými škůdci (Kazda a kol., 2008).

Plíseň zelná, *Perenospora brassicae* napadá rostliny z čeledi brukvovitých ve všech fázích vývoje. Prvními příznaky jsou žlutě ohraničené skvrny na děložních listech, později dochází k tvorbě bílého povlaku zesponu listů, následně dochází k odumírání rostliny. Ideální podmínky pro rozvoj choroby je vlhké počasí a nízká teplota. Ochranou je dodržování pěstitelské technologie a likvidace brukvovitých plevelů (Rod, 2012).

3.3 *Plasmodiophora brassicae*

3.3.1. Taxonomie

Názory na zařazení tohoto patogenu se v průběhu let mnohokrát změnily. Gaumannův taxonomický systém zařazoval organismus mezi houby (*Mycetes*). Po získání nových poznatků vznikl Arxův systém, který je zařazoval pod oddělení hlenky (*Myxomycota*) třídy nádorovky (*Plasmodiophoromycetes*). Pozdější systémy podle Alexopoulose nebo Waterhouse řadily nádorovky spolu s *Oomycetes*, *Hyphochytridiomycetes* a *Chytridiomycetes* do oddělení *Eumycota*, pododdělení *Zygomycotina* (Rod, 1996, Chytilová a Dušek, 2007). Podle nejnovějších studií je zařazení *Plasmodiophora brassicae* následující: řadí do říše *Rhizaria*, kmene *Cercozoa*, třídy *Plasmodiophoromycetes*, řádu *Plasmodiophorales* (Hwang et al., 2012). Řád *Plasmodiophorales* zahrnuje deset rodů, z čehož tři, *Plasmodiophora*, *Polymyxa* a *Spongospora*, mají zemědělsko-ekonomický význam, buď jako patogeni samotní, nebo jako vektor patogenních virů (Karling, 1968). Rod *Plasmodiophora* má kromě nejvýznamnějšího druhu *P. brassicae* i několik dalších druhů. Co se týče počtu těchto druhů, názory se velmi odlišují, někteří autoři uvádějí až 14 druhů (Anonym 3). Jde o patogena, který se nachází mezi rostlinnou a živočišnou říší, uvádí Hwang et al. (2012a).

3.3.2 Životní cyklus

Stejně jako u taxonomie i poznatky o biologii tohoto druhu se postupně vyvíjejí. Životní cyklus se dělí na tři fáze, z nichž dvě probíhají uvnitř hostitele (Tommerup and Ingram, 1971). Kagyeyama et Asano (2009) rozdělují cyklus do tří fází- přežití v půdě, napadení kořenových vlásků a kořenová infekce.

Životní cyklus začíná haploidními trvalými sporama, které se někdy označují jako spory spící (hypnospory), odpočívající spory nebo cystospory (Buzacki et al., 1974). Právě ve formě spor patogen přežívá v půdě. Do půdy se trvalé spory dostávají z rozpadlých nádorů, kde jich může být v jednom gramu řádově až několik miliard (Rod, 1996). Buněčné stěny spor mají 5 vrstev, které jsou zodpovědné za odolnost těchto spor vůči vnějším faktorům. Tyto vrstvy obsahují 17 různých aminokyselin, sacharidy a lipidy, což udává vysokou životaschopnost. Vitální trvalé spory lze od mrtvých odlišit fluorescenčním mikroskopem po předchozí fluorochromaci akridinooranží nebo orceinem. Vitální spory fluoreskují zeleně, mrtvé červeně (Rod, 1996). Jak uvádí Cao et al. (2014), klidové spory mají v půdě poločas rozpadu 3,6 let. Jejich životaschopnost v půdě se udává až 20let, i přes absenci hostitelské rostliny (Wallenhamar, 1996), je ovlivňována teplotou, vlhkostí půdy a umístěním v půdním

profilu (Dixon, 2009). Jejich vitalitanezení nenarušena ani průchodem zažívacího traktu zvířat nebo silážovacími procesy (Mazáková a kol., 2006). Největší koncentrace spor se nachází v hloubce 15 cm maximálně pak 40 cm (Rod, 1996). Fiberg et al., (2005) uvádí, že k uvolňování spor nastává spontánně, ale může být ovlivněno přítomností některých druhů rostlin, což se využívá v případech tzv. vylapávacích rostlin.

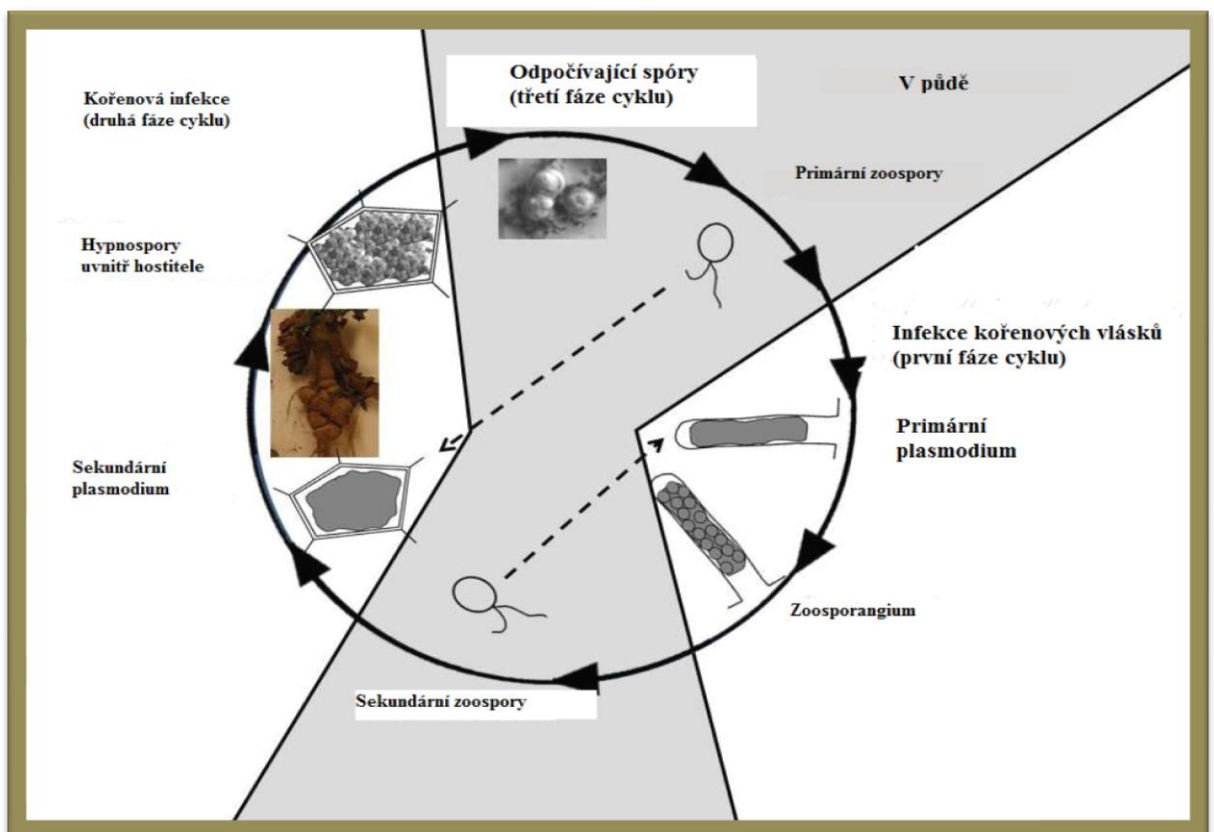
V první fázi dochází k vyklíčení trvalé spory v primární zoospory (Naiki and Dixon, 1987), tento proces je ovlivněn půdní teplotou, vlhkostí, vlivem půdní reakce, organismů a kořenových exudátů, vylučovaných hostitelskou rostlinou (Hwang et al., 2012a). Vyklíčené primární zoospory o velikosti 2,5-3,5 μm mají dva nestejně dlouhé bičíky, pomocí kterých se v půdě aktivně pohybují a dostávají se tak ke kořenovým vláskům (Ayers, 1944). Před proniknutím do buněk hostitele ztrácejí zoospory bičíky (Rod, 1996). Po proniknutí septogen přetváří ze zoospory v primární plasmodium (Ayers, 1944). Plasmodium se zvětšuje a dochází k mitotickému dělení a přeměňuje se v mnohobuněčné primární plasmodium (Devos et al., 2005). Vzniklé primární plasmodium je schopno pronikat z buňky do buňky (Rod, 1996). Po 7-8 dnech se z primárního plasmodia vyvine zoosporangium, z nichž každé obsahuje 4-16 sekundárních zoospor (Tommerup and Ingram, 1971). Tyto sekundární zoospory se uvolňují, opouštějí kořenové vlásky a dostávají se zpět do půdy. Tímto končí primární cyklus, který probíhá u všech brukvovitých plodin, včetně rezistentních (Rod, 1996), nedochází zde k významným výnosovým ztrátám (Howard, 2010). Primární zoospory nelze od sekundárních zoospor vizuálně odlišit (Kageyama and Asano, 2009).

Druhá fáze- kořenová fáze infekce začíná splýváním sekundárních zoospor v půdě v zygoty, které se aktivně pohybují, a do mladých kořenů pronikají skrz buněčné stěny kořenové kůry, ale mohou pronikat i rankami nejen na kořenech, ale i přes hypokotyl, ojediněle i jiným nadzemními částmi (Kageyama and Asano, 2009). Zygoty v buňkách kořenů ztrácejí bičíky, jádra splývají a diferencují se v sekundární plasmodia. Tato plasmodia pronikají do dalších buněk a vodivými pletivy i do vzdálenějších pletiv (Prokinová a kol., 2013). Sekundární cyklus vede ke změně v biochemii, fyziologii a metabolických pochodů v hostiteli (Devos et al., 2005).

Právě po vzniku sekundárního plasmodia a vniknutí do kořenové vrstvy dochází ke spuštění exprese genů podílejících se na tvorbě auxinů, cytokininů a dalších regulátorů růstu, čímž dochází k hypertrofickému růstu kořene a tím ke tvorbě hálek u citlivých odrůd. Ve zvětšených buňkách se tvoří velké množství spor. Háčky se rychle rozpadají a uvolňují se dlouhověké odpočívající výtrusy do půdy (Hwang et al., 2012b, Chytilová a Dušek,

2007Tanaka and Ito, 2013). Krátká fáze mezi klíčením a penetrací je zranitelný čas pro vývoj *P. brassicae*. V této fázi hraje důležitou roli struktura půdy, vlhkost, pH obsah N, B, Ca a přítomnost a aktivita mikrobiálních antagonistů. Tyto faktory ovlivňují potenciál inokula, jeho životaschopnost a invazní výkon (Dixon, 2009).

Siemens et al. (2009) provedli studii, kde sledovali expresi několika genů *Plasmodiophora brassicae* v časovém průběhu interakce hostitel-patogen v *Arabidopsis thaliana*, cílem bylo nalézt molekulární markery pro aktivně rostoucího patogena, v jednotlivých fázích vývoje. Dále uvedli Pb DNA Pb RNA geny mohou rozlišovat aktivitu buněk. Geny PbBrip9 a PBCC249 jsou spojeny s koncem vývoje patogena a zahájením tvorby spór v hostitelské rostlině, o těchto genech jsou ale ještě spekulace. V zásadě popisuje geny, které mohou sloužit k popisu vývoje patogena, doplněk pro kvantifikaci onemocnění. (Siemens et al., 2006)



Obrázek 1. Životní cyklus patogena *Plasmodiophora brassicae* Kageyama and Asano (2009)

3.3.3 Hostitelský okruh

Nádorovitost kořenů brukvovitých je závažné onemocnění řepky, čínského zelí, tuřínu (Hwang et al. 2012c), Kopecká a kol. (2012) uvádí, že na uvedených plodinách a kvěťáku způsobuje nádorovitost významné škody. Potenciálními hostiteli je dalších 3700 rostliny čeledi *Brassicaceae* (Dixon, 2009b). Napadá jednak zeleninu ale mohou být napadány i okrasné rostliny např. *Alyssum*, *Arabis*, *Descurainia*, *Draba*, *Iberia*, *Sysimbrium* (Anonym 7). Z praktického hlediska je důležité vědět, že hostitelským rostlinami mohou být i plevelné rostliny např. kokoška pastuší tobolka (*Capsella bursa pastoris*), penízek rolní (*Thlaspe arvense*), ředkev ohnice (*Raphanus raphanistrum*), hořčice rolní (*Sinapis arvensis*), vesnovka obecná (*Cardaria draba*), rukev (*Roripa*), huseníček (*Arabidopsis*) (Rod, 1996). Mimo všech druhů brukvovitých napadá také druhy dalších čeledí např. jílek vytrvalý, mák vlčí, jetel plazivý, jahodníky (Kopecký a kol. 2012). Napadení bylo zjištěno i u některých z čeledi *Poaceae*. U těchto rostlin většinou probíhá pouze primární cyklus a nejsou tak zdrojem pro šíření nádorovitosti (Rod, 1996).

3.3.4 Projev napadení

Pro nádorovitost kořenů brukvovitých je typický vznik hálek na infikovaných kořenech, tím je narušen příjem vody i živin (Hwang et al., 2012). Toto narušení vede k vadnutí, zakrnění a dochází k postupnému žloutnutí a předčasnému odumírání rostliny (Tanaka and Ito., 2013). Pokud se jedná o závažnou infekci, dochází k významným ztrátám na kvalitě a výnosu produktu (Hwang et al., 2012). Rostlina je menšího vzrůstu, má menší žlutozelené nebo fialové listy, evidentně chřadnoucí, často uvadá. Na kořenech jsou viditelná nepravidelně ztloustlá místa, která později dostávají boulovitý charakter. Boule mohou být různého tvaru (perličkovité, větvenovité, kulovité) a velikosti (Chytilová a Dušek, 2007). Nádory jsou zpočátku bílé a kompaktní, později vnitřní pletivo hnědne nebo je šedobílé, ke konci vegetace nádor šedne a rozpadá se (Dixon, 2009, Baranyak a kol., 2005) Každý z nádorů obsahuje miliony spor, které si uchovávají v půdě životnost až 18 let a jsou tak zdrojem infekce pro následující porost (Wallenhammar, 1996).

3.3.5 Dispoziční faktory

Teplota ovlivňuje vznik onemocnění i jeho závažnost. Během prvních týdnů odpovídá za kolonizaci patogena a rozvoj symptomů v hostiteli (Gossen et al., 2012). Ke klíčení trvalých spor v zoospory dochází při širokém rozmezí půdních teplot od 6 do 27°C. První příznaky se objevovaly při teplotách v rozmezí 9 – 30°C, nejzávažnější výskyt byl zjištěn při

teplotách 25°C (Gossen et al., 2012), což potvrzuje i Dixon et al. (2009), který uvádí optimální teplotu pro klíčení 24°C. Wellman (1930) určil optimální teplotu pro rozvoj 18-24°C. Tyto poznatky pochází ze studií s kontrolovanými podmínkami. První dny po proniknutí zoospory do rostliny je optimální teplota 18 – 20°C další dny 20 – 25°C a později zase teplota klesá (Rod, 1996).

Někteří autoři uvádějí, že na výskyt nádorovitosti má vliv obsahu iontů vápníku v půdě (Rod, 1996). Délka perzistence je větší v půdách zásaditých než v půdách kyselých. Klíčení spor je ovlivňováno půdní reakcí, za optimální pH se považuje rozmezí 4,5-6, ovšem při optimální půdní vlhkosti a teplotě může docházet ke klíčení i v zásaditém prostředí. Hodnota pH je důležitá hlavně v době, kdy je v půdě nižší koncentrace spor. Toto potvrzuje Dixon (2009), který uvádí ideální pH 6,0 -6,7 a dodává, že dochází k poklesu životaschopných spor na vápenité půdě, při pH vyšším než 6,9. Wellenhamer (1996) uvádí, že virulence patogena *Plasmodiophora brassicae* není omezena pouze na kyselých půdách, toto onemocnění bylo zjištěno i v oblastech s pH půdy 7,8. Na našem území byla nádorovitost zjištěna na pozemcích s půdní reakcí v rozmezí pH 4,7-7,4. Vyšší napadení a tím ztráty na výnosech bylo zjištěno ve vyšších polohách s vyšší průměrnou vlhkostí. Typ a druh půdy nehrál významnou roli (Anonym 7). Webster (1986) zkoumal význam dusíku, boru a pH, jako dílčí jednotky pro integrované ošetření a potlačení tlaku inokula. Došlo ke snížení infekce po zvýšení pH na hodnotu 7,2. Bylo prokázáno, že zvýšení pH spolu s aplikací vápníku a borů pozitivně zvyšuje kontrolu nad nádorovitostí a dochází ke snížení indexu onemocnění (Webster, 1986).

Monteith (1925) uvádí životaschopnost spor, pokud je dosaženo minimální půdní vlhkosti 45 % plné vodní kapacity. Toto potvrzuje i Prokinová a kol. (2013), kteří uvádí optimální podmínky pro vznik infekce v našich podmínkách do konce srpna, vysoké teploty musí doprovázet ještě optimální vlhkost. Přijatelná vlhkost pro rozvoj choroby je 50% plné vodní kapacity, optimální však 70-90%. Vzhledem k tomu že organismus vyžaduje aerobní podmínky, tak mu vyšší vlhkost neprospívá (Rod, 1996).

Pro vznik infekce má vliv i délka dne a intenzita světla, což jsou hlavní faktory pro průběh fotosyntézy, která je nepostradatelná pro aktivaci a projev nádorovitosti (Webster, 1986). To bylo dokázáno na pekingském zelí, u kterého nedocházelo k vytvoření nádorů, je-li délka dne kratší než 11,5 hodiny (Devos et al., 2005, Dixon, 2009).

Zkoumán byl také vliv střídání plodiny, výskyt plevelů nebo výživa na výskyt nádorovitosti kořenů brukvovitých (Dixon, 2009). Byl dokázán vliv výskytu některých prvků v půdě na vznik a průběh onemocnění. Inhibičně působí zvýšený obsah jodu, naopak stimulační účinky má hořčík, dále mohou výskyt snižovat prvky jako bor, zinek, měď, mangan, molybden (Rod, 1996). Vyšší obsah boru v půdě, před zamořením vede k omezené schopnosti zoospor pronikat do kořenového systému (Craig and Dixon, 1993). Vyšší obsah dusičnanů v půdě zpomaluje projev symptomů onemocnění (Webster, 1986). Bhattacharyya a Mandal (2006) zjistili výrazné snížení intenzity napadení po aplikaci dusičnanů amonného s vápencem a dusičnanu vápenatého, toto tvrzení bylo potvrzeno výsledky (Page, 2001). Také dusíkaté vápno má inhibiční účinek na rozvoj patogena *Plasmodiophora brassicae*. Jeho aplikací dochází k omezení rozvoje patogena, toto lze z ekonomického hlediska aplikovat pouze na malých plochách (Dixon, 2009).

3.4 Historie, prognóza a signalizace výskytu

3.4.1 Historie rozšíření

Jak uvádí Rod (1996) první písemné zprávy o nádorovitosti kořenů brukvovitých pocházejí z přírodovědné encyklopedie Pliniuse Staršího „Naturalishistoria“ od Columella z 1. století našeho letopočtu a od Palladiuse ze 4. století. Samozřejmě, že pravý původce této choroby nebyl znám a choroba se přisuzovala nejrůznějším příčinám. Další historické záznamy pocházejí ze 13. století.

Později v 19. století vypukla silná epidemie a nádorovitost zničila úrodu pekingského zelí na obrovských plochách v St. Peteburgu v Rusku. Pravá příčina této choroby nebyla dlouho známá (Chytilová a Dušek, 2007). Roku 1852 bylo onemocnění poprvé zaznamenáno v USA (Prokinová a kol., 2013).

Teprve roku 1874 ruský vědec Michail Wronin zjistil pravého původce nádorovitosti, jehož životní cyklus stručně popsal a roku 1877 patogena pojmenoval *Plasmodiophora brassicae* Wor. (Rod, 1996). O 10 let později, roku 1887, bylo jméno akceptováno vědeckou botanickou komunitou a dodnes je platné. Ruský vědec byl za tento velký objev a krok dopředu v poznávání tohoto patogenu odměněn nejednou cenou (Prokinová a kol., 2013). První zpráva o výskytu v Koreji je z roku 1920, zatímco v Japonsku byl výskyt zaznamenán již roku 1890 (Ikegami et al., 1981). Roku 1930 Cook a Schwarz dokázali, že životní cyklus se skládá ze dvou fází, kdy jedna prochází v kořenových vláscích a druhá probíhá v buňkách hlavního kořene (Tommerup and Ingram, 1971).

První zmínky o nadorovitosti kořenů brukvovitých v českých zemích přinesl roku 1896 F. Sitenský, jeden ze zakladatelů české fytopatologie, a to z okolí Veselí nad Lužnicí, kde se pěstovalo známé kruhárenské zelí (Chytilová a Dušek, 2007).

3.4.2 Rozšíření ve světě

Jedná se o hospodářsky významné onemocnění brukvovitých rostlin, které v dnešní době stoupá na významu. Vzhledem k optimálním podmínkám pro výskyt patogena, je i jeho rozšíření předurčeno do oblastí mírného pásma Evropy, Asie, Ameriky, kde jsou registrovány největší negativní dopady na produkci (Strelkov et al., 2011). Můžeme tedy říct, že výskyt je možný ve všech oblastech kromě Antarktidy, ovšem největší koncentrace napadení je v mírném pásmu Evropy a Asie a tam, kde se hojněji pěstují náchylné plodiny. V posledních letech dochází k rozšíření do subtropických oblastí (Rod, 1996). Rychle se šíří v Asii- Čína, Japonsko, Korea ale i v tropických zemích jako je Indonésie, Thajsko, Vietnam (Tanaka, 1996). V Evropě je výskyt ve všech zemích, liší se intenzitou napadení. Polsko je napadeno celoplošně, v jiných zemích je výskyt ohniskový (Chytilová a Dušek, 2007). Plochy zamořené nadorovitostí se zvyšují a je to způsobeno rozšiřováním ploch brukvovitých plodin, užším spektrem plodin zastoupených v osevním postupu a zhoršováním půdní struktury (Rod, 1996). Významné onemocnění pro oblast Kanady, kde byla nadorovitost poprvé identifikována v Albertě roku 2003, od té doby se masově rozšířila po celé provincii (Hwang et al., 2013). V Albertě a nejen tam je toto onemocnění velkou hrozbou v produkci řepky, může docházet až k 100 % ztrátám na výnosu (Martison and Matt, 2014).

3.4.3 Rozšíření v ČR

Do roku 2010 byla nadorovitost kořenů brukvovitých problémem hlavně v zelinářských oblastech, až na podzim 2011 byl zaznamenán nárůst napadení na řepce ozimé. Do té doby bylo zaznamenáno pravidelné napadení pouze na severní Moravě. Roku 2011 byl silný výskyt na řepce ozimé ve 44 podnicích v 21 okresech, zejména v severních Čechách, na severní Moravě, skutečný rozsah byl ale pravděpodobně větší (Kazda a kol., 2013). Tento nárůst byl způsobem jednak příznivým průběhem počasí a dalším faktorem bylo založení porostů již v druhé dekádě srpna. V roce 2012 byl zaznamenán slabší výskyt, což může být odůvodněno použitím rezistentních odrůd v oblastech napadení v předchozích letech (Prokinová a kol., 2013).

3.4.4 Prognóza

Prognózou je zjišťováno, s dostatečným předstihem, riziko výskytu škodlivých organismů, tuto prognózu je třeba během vegetace upřesňovat. Prognóza nemusí být přesná, bývá ovlivněna atypickým průběhem počasí. Signalizací následně určujeme optimální termín pro zahájení ochrany. Co se týče monitoringu, existuje celá řada faktorů, které přispívají k rozvoji nádorovitosti, především teplota. Pro nádorovitost je alarmující dlouhý a teplý podzim (Kazda a Škeřík 2008). Gludovacz et al. (2013) začali pracovat na vývoji předpovědního modelu, který by na základě závislosti teploty a srážek dokázal předpovídat nádorovitost kořenů brukvovitých a závažnost výskytu. Po vylepšení by mohl model dosahovat slibných výsledků.

3.4.5 Monitoring

Pro detekci patogena jsou využívány biotesty. Jako novější metoda pro detekci patogena je využití kvantitativní polymerázově řetězové reakce (qPCR) a ve spojení s analýzou mastných kyselin je tato metoda ještě citlivější.

3.5 Patotypy

Buzacki et al. (1975) tvrdí, že různé izoláty *Plasmodiophora brassicae* mají odlišné preference na hostitele. Tyto populace s hostitelskou preferencí jsou nazývány patotypy. Tyto patotypy jsou následně určovány různými typy biologických zkoušek (Hatakeyama et al., 2004). Mikroorganismus *P. brassicae* a jeho genetická variabilita byla pozorována od roku 1931 (Honig, 1931), existence patotypů byla prokázána až roku 1959 (Ayers, 1972). Jak uvádí Rod (1996) už počátkem 60. let bylo zjištěno, že tuřín je v některých oblastech se projevuje infekce a v jiných neprojevuje známky napadení. Pro účel identifikace byly sestaveny diagnostické sady (Rod, 1996), nejvíce využívanou je Williamsova metoda a metoda ECD (European Clubroot Diferencial set) (Strelkov et al., 2006). Kopecký a kol. (2012) popisují vznik tzv. Williamsovy metody (1966), sada čtyř hostielů, která je schopna identifikovat 16 patotypů. Pomocí této metody bylo u nás koncem 80. let detekováno 6 patotypů (Rod, 1996), Chytilová a Dušek (2007) uvádí, že bylo identifikováno 7 patotypů. Roku 1975 byla vytvořena metoda ECD (European Clubroot Diferencial set), což je číselný systém k určování patotypů (Hatakeyama, 2004). Tento test se skládá z 15 různých genotypů představující tři podskupiny ze tří druhů *B. oleracea*, *B. rapa*, *B.napus*. Tyto genotypy představují odlišnou kombinaci genů resistance k nádorovitosti košťálovin. Přesné informace o počtech rezistentních genů nejsou známy (Diederischen et al., 2009). Tato metoda určí sérii

recesivních genů pomocí zastoupení genů. Později k těmto identifikačním metodám přibyla klasifikace podle Somé et al. (1996), obsahující 3 diferenční rostliny, z nichž 2 pochází z metody ECD. Tato klasifikační metoda rozeznává 8 patotypů, Somé et al. (1996) používal k inokulaci pouze jednu sporu a výsledkem byl geneticky jednotný patotyp. Tato metoda je pracná a navíc úspěšnost inokulace jednou sporou bylo dosaženo v 10 % případů, ve zmiňované studii.

V bývalém Československu bylo podle Wiliamsovy metody detekováno 7 patotypů. Pomocí ECD metody bylo detekováno 35 patotypů, často se jednalo o směs dvou až tří patotypů (Rod, 1996). Nádorovitost košťálovin je tedy charakteristická svou velkou genetickou variabilitou a jeden izolát se mnohdy skládá z komplexu patotypů, což komplikuje ochranu ale i šlechtění (Kopecký a kol., 2012). Stanovení patotypu má totiž velký význam právě pro šlechtění rezistentních odrůd proti nádorovitosti košťálovin (Buzacki et al., 1975).

V Edmontonu na jaře 2014 byl nalezen nový patotyp, který má schopnost infikovat všech 7 běžně dostupných odolných odrůd řepky. Bylo zjištěno, že jde o nový kmen vzniklý častým pěstováním v infikované oblasti, došlo k mutaci a tak mohou být nakaženy i odrůdy rezistentní (Martison and Matt, 2014).

3.6 Interakce *Plasmodiophora brassicae* s hostitelem

Plasmodiophora brassicae, biotrofní patogen, který často závisí na vytvoření složitého vztahu se svým hostitelem, musí překonat obranné mechanismy hostitele, aniž by došlo k jeho usmrcení a patogen tak měl přísun živin k dokončení vývojového cyklu (Hok et al., 2010). V důsledku toho dochází ke změnám v biochemii, fyziologii a metabolických pochodů hostitele (Feng et al., 2012). Znalost těchto změn v hostiteli a znalost interakce hostitel - patogen přispívá k rozvoji nových technik pro ochranu nádorovitosti. Byly stanoveny geny s různou úrovní exprese korelující s určitými fázemi vývoje onemocnění, které se podílí na patogenitě *Plasmodiophora brassicae* (Ito et al., 1997).

Volné kyslíkové radikály (ROS) nemají v rostlinných pletivech pouze negativní funkci, naopak v přiměřeném množství zastávají funkci ochrannou. Jejich produkce roste vlivem stresových faktorů. Mezi ROS (reaktivní formy kyslíku) řadíme: superoxidový anion, hydroxylový radikál a peroxid vodíku, které vznikají jako vedlejší produkt při fotolýze a glykolýze. Tvorba, regulace a odbourávání ROS je řízeno souborem genů, v

případě nerovnováhy mezi odbouráváním a tvorbou, vede k oxidativnímu stresu, dochází ke vzniku a hromadění kyslíkových radikálů (Piterková a kol., 2005).

Jak uvádějí Lamb and Dixon (1997) avirulentní patogeni, kteří byli rozpoznáni díky přítomnosti genů rezistence imunitního systému rostlin, vyvolávají v rostlině dvoufázovou akumulaci ROS. V první fázi dochází k nízké akumulaci ROS, kterou střídá druhá déletrvající fáze tvorby ROS, což je charakteristický projev rezistence. Důležitou roli hraje také oxid dusnatý (NO), který je nepostradatelný pro procesy jako je klíčení, kvetení, obranné reakce, senescenci, či buněčnou smrt. Dále hraje významnou roli v rasově specifické i rasově nespecifické rezistenci (Piterková a kol., 2008).

Patogen způsobuje tvorbu nádorů na kořenech, čímž dochází k narušení příjmu vody a živin, následkem toho je zakrslý růst, chlorózy či předčasné odumírání nadzemních orgánů (Cao et al., 2014). Tvorba nádorů má souvislost se změnou rostlinných hormonů v rostlinném pletivu. Kyselina salicylová (SA) je zodpovědná za prvotní signál pro aktivaci ochrany rostlin, exogenní aplikace SA zvyšuje rezistenci rostlin proti napadení biotrofními patogeny (Ludwig- Müller et al., 2014). Ludwig- Müller et al. (2014) pozorovali vliv fytohormonů při průběhu onemocnění nádorovitostí. Dokázali, že napadené rostliny mají zvýšené množství kyseliny salicylové, než rostliny kontrolní. Po vzniku sekundárního plasmodia a vniknutí patogena do kořenové vrstvy dochází ke spuštění exprese genů podílejících se na tvorbě auxinů, cytokininů a dalších regulátorů růstu, čímž dochází k hypertrofickému růstu kořene, což vede ke tvorbě nádorů (Hwang et al., 2012b). Siemens et al. (2006) zmiňují velký vliv cytokininů na průběh infekce. Existují důkazy, kdy cytokininy jsou syntetizovány pomocí plasmodií, ale také může docházet k poklesu cytokininů v některých fázích vývoje (Devos et al., 2005). Devos et al. (2005) dále zmiňují vyšší produkci auxinů u hostitelů rostlinouvlivem napadení patogena *Plasmodiophora brassicae*. Auxiny jsou fytohormony podílející se na regulaci růstu kořenů (Procházka a kol., 1998). Funkce sekundárního plasmodia vede k poklesu auxinů, tato reakce neprobíhá u rezistentních hostitelů (Ludwig - Müller et al., 2009).

3.7 Ochranná opatření

Patogen se vyskytuje v podzemních, stojatých vodách, jezerech a závlahové vodě, odkud může být šířen dál. Patogen je šířen nejen vodou, šíří se i půdními částicemi, na což mají vliv povětrnostní vlivy, dále se půdní částice šíří zemědělskou technikou a dalšími méně významnými způsoby (Jędryczka et al., 2014). Mezi méně významné způsoby řadí Dixon

(2009) transport patogena na kratší vzdálenosti krtky, žížalami nebo hlístitkami. Ochrana proti tomuto patogenu je složitá, především kvůli snadnému rozšiřování a vysoké perzistenci trvalých spor v půdě (Chytilová a Dušek, 2007). Situace se stává vážnou, jelikož není levná a ekologická cesta proti tomuto patogenu (Řičařová a kol., 2013). Jak píše Kazda a Škeřík (2008), jednotlivá opatření jsou nedostatečná, proto je třeba dodržovat zásady integrované ochrany a provádět komplexní ochranu a zkombinovat všechny dostupné metody ochrany, v čele s preventivním opatřením. Ke zmírnění dopadů nadorovitosti může přispět preventivní úprava pH, dále aplikace fungicidů nebo fumigace půd (Cao et al., 2014). Vůbec neúčinnější a neúspěšnější metodou jsou rezistentní odrůdy, nicméně i rezistence může být díky vysokému selekčnímu tlaku narušena (Buzacki et al., 1975, Strelkov et al., 2007).

3.7.1 Prevence šíření

Tato opatření jsou založena na eliminaci rozšiřování nadorovitosti na nezamořené pozemky. Na nezamořené pozemky se dostává výsadbou infikované sadby, používáním infikovaných organických hnojiv (Dušek a Chytilová, 2007).

Dále je třeba věnovat pozornost zemědělské technice a nářadí, aby došlo k očištění od případné ulpělé infikované půdy. Jedná se o významný zdroj přenosu, při přejezdech mezi pozemky (Martison and Matt, 2014). Howard et al. (2013) se zabývají metodami a čištění kontaminovaného zařízení, jelikož právě ulpělá půda na zemědělské technice je významným zdrojem šíření nákazy. Dezinfekce se skládá ze tří kroků, nejdříve dochází k hrubému čištění, pomocí škrabání, kartáčování, následuje jemné čištění pomocí tlakového mytí a na závěr dezinfekce aplikovaná na čištěný povrch, po dobu 20 minut (Strelkov et al., 2011). Chemikálie, které dosáhly při čištění nejlepších výsledků, jsou chlornan sodný, peroxid vodíku, kyselina octová a peroxymonosulfát draselný. V neposlední řadě je potřeba věnovat pozornost závlahové vodě (Howard et al., 2013). Pěstitelé by měli být obezřetní při používání slámy, sena, siláže, kejdy nebo močůvky z nakažených nebo podezřelých oblastí. Je třeba se také vyhnout množitelského materiálu z potenciálně infikovaných oblastí (Martison and Matt, 2014).

3.7.2 Agrotechnické opatření

Primárně by na zamořených pozemcích neměly být pěstovány žádné brukvovité plodiny (Rod, 1996). Dalším krokem je úprava osevního postupu, eliminace zastoupení brukvovitých plodin, dodržovat časový odstup minimálně 5 let (Chytilová a Dušek, 2007). Martison a Matt (2014) uvádějí v ideálním případě pět let, ne však méně než tři roky.

Nepěstovat brukvovité plodiny na vlhkých pozemcích, ideálních pro rozvoj patogena, nebo tyto pozemky odvodnit (Chytilová a Dušek, 2007). Ani střídání plodin nemusí být efektivní, v případě zamoření pozemku brukvovitými plevely (Hwang et al., 2013), je třeba jejich likvidace, jinak mohou fungovat jako mezihostitel patogena. V případě napadení, je nutná likvidace napadených plodin před rozpadem nádorů, tyto plodiny se nesmí dostat do kompostů a hnojišť, nejlepší je nádory spálit a zabránit tak šíření. Napadení můžeme eliminovat termínem setí, řepka setá později na podzim je proti nádorovitosti odolnější (Rod, 2006). Prokinová a kol. (2013) testovali odolnost polních odrůd na zamořeném pozemku a vliv termínu setí. U rostlin zasetých v termínu 2.8 byly zjištěny velké nádory, u rostlin stejných odrůd zasetých o měsíc později bylo napadení zjistitelné pouze mikroskopicky. Strelkov et al. (2011) uvádí, že díky časnému setí došlo ke zvýšení výnosu a to až o 58%.

Velký význam má úprava půdní reakce vápněním a docílení neutrální až slabě alkalické hodnoty pH. Výběrem rezistentních odrůd lze eliminovat výnosové ztráty. V neposlední řadě je třeba dbát na vyváženou výživu rostliny, čímž zvýšíme odolnost plodiny a eliminujeme dopady dalších chorob (Chytilová a Dušek, 2007). Mezi plevele napadené nádorovitostí patří, hořčice bílá, kokoška pastuší tobolka, penízecká rolní nebo ředkev ohnice (Hwang et al., 2013).

Jako ochrana plodin na zamořených pozemcích mohou sloužit vylapávací předplodiny jako ředkev olejná (*Raphanus sativus* var. *oleifera*), oves setý (*Avena sativa* L.), žito (*Secale cereale* L.) nebo jílek vytrvalý (*Lolium perenne* L.), které stimulují vyklíčení trvalých spor *Plasmodiophora brassicae* a jsou tak schopny snižovat koncentraci spor v půdě. Tato metoda by mohla být složkou integrované ochrany řepky, ovšem studie jsou prozatím nejednotné (Friberg et al., 2006).

3.7.3 Chemická ochrana

Použití chemické ochrany je problematické, většina fungicidních přípravků má na omezení nádorovitosti malou nebo žádnou účinnost, fungicidní přípravky s dobrou účinností jsou z důvodu fytotoxicity nepoužitelné (Chytilová a Dušek, 2007). Naiki a Dixon (1987) sledovali účinnost chemických látek na vývoj patogena a závažnost symptomů. Mezi aplikovanými látkami byly benomyl, trichlamide a dusíkaté vápno. Zjistili, že po použití došlo ke snížení invaze patogena a následného vývoje symptomů. Nejúčinnější na potlačení infekce kořenů a snížení rozvoje hálek měly benomyl a trichlamide. Dusíkaté vápno mělo toxický účinek, pouze když došlo k zasazení sazenic do 7 dnů od aplikace nebo při použití

nadměrné koncentrace. V minulosti našel uplatnění chlorid rtuťnatý (kalomel), od kterého se rychle ustoupilo, pro nežádoucí účinky rtuti na životní prostředí (Naiki and Dixon, 1987).

Pro ochranu je možné využít desinfekce pěstebních substrátů ve sklenících nebo použití dusíkatého vápna v polních podmínkách ke zvýšení pH (Donald and Porter, 2009). Tyto metody nenašly pro jejich ekonomickou nákladnost širšího uplatnění (Webster and Dixon, 2001). V Kanadě jsou povoleny přípravky, obsahující účinnou látku quintozene, které redukuje výskyt nádorů, dále přípravky s účinnou látkou fluazinam, který poskytuje ochranu kvěťáku ale pouze na organických půdách (Cao et al., 2014). Fumigace půdy přípravky s účinnou látkou metam sodium je využíváno i v USA a Kanadě (Zuzak et al., 2014). V Kanadě byl prováděn pokus s aplikací fumigantu Vapam (dithiokarbamát, sodium N-methyldithiokarbamát), byl zkoumán vliv na primární a sekundární infekci a závažnost onemocnění. Byly prokázány kladné výsledky tohoto přípravku, kdy došlo ke snížení infekce až o 50 %, a tím zlepšení výnosu řepky, ovšem pouze ve skleníkových pokusech (Zuzak et al., 2014, Hwang et al., 2014) Dále byl zjištěný pozitivní účinek, bez fytotoxických dopadů, u přípravků s účinnou látkou cyazofamid, zatím však nedošlo k jeho povolení (Chytilová a Dušek, 2007)..

3.7.4 Fyzikální metody

Proprařování zeminy po dobu 30 minut o teplotě minimálně 90°C, v praxi se proprařování provádí pod plachtami. Tato metoda je náročná jak časově, tak pro finanční náklady, tudíž je její využití omezené, navíc dochází k reinfekci (Chytilová a Dušek, 2007). Při této metodě nedochází k usmrcení veškerých spor, při tlaku a teplotě 120°C je půda stále infekční (osobní sdělení).

3.7.5 Půdní solarizace

Metoda, objevená v Izraeli u nás bohužel nenašla přílišného uplatnění. Je používána v oblastech s velkou intenzitou slunečního záření, založená na využití slunečního záření. Půda je pokryta po dobu 3-4 týdnů transparentní folií, díky které dochází ke zvýšení teploty. Účinným prvkem je nejen vzniklá vysoká teplota, ale dochází také k fyzikálně-chemickým změnám a následně biologickým procesům, díky nimž dochází k redukci patogena v půdě (Chytilová a Dušek, 2007).

3.7.6 Biologická ochrana

Arie et al. (1997) získali výsledky, které dokazují, že přirozeně se vyskytující organismy nebo některé biofungicidy mohou přinést výsledky v oblasti ochrany proti patogenu *Plasmodiophora brassicae*. Ve světě bylo testováno několik biologických agens pro omezení výskytu nádorovitosti, ale výsledky bohužel nebyly jednoznačné. Omezení výskytu nádorovitosti na kořenech bylo docíleno některými izoláty *Trichoderma spp.* Došlo k omezení výskytu nádorovitosti a tím se zvýšila konečná hmotnost rostlin (Chytilová a Dušek, 2007). Dalším adeptem byl izolát *Streptomyces spp.*, který sice redukoval projevy nádorovitosti na kořenech, nicméně na zvýšení výnosu to vliv nemělo. Jako důležité opatření v biologické ochraně patří využití předplodin inhibujících vitalitu trvalých spor v půdě, mezi které patří máta peprná (*Menha piperita*), tymián obecný (*Thymus vulgaris*) (Chytilová a Dušek, 2007).

Dále byly zkoumány i další metody, jako biologický agens nádorovitosti byl použit *Bacillus subtilis* XF-1. Plánem bylo dosáhnout inhibici růstu patogena za použití N-methyl N'-nitro- N- nitrosoguanidinu, který se aplikoval na XF-1 (Li, Xing-yu, 2014). Toto potvrzuje Kammerich et al., (2014), popisují účinky *Bacillus subtilis* a jeho vliv na nádorovitost, kdy dochází k potlačení růstu vlasového kořínku a tím i kortikální infekci.

Strategií k navození obranných mechanismů proti nádorovitosti by mohlo být použití nepatogenního *Rhizobacterium* nebo endofytické houby, které se vyskytují téměř ve všech vyšších rostlinách. Došlo k využití endofytů *Acremonium alternatum* na indukci tolerance k nádorovitosti *Brassicae rapa*, tato analýza ukázala, že *A. alternatum* zpomalil vývoj *P. brassicae* (Jäschke et al., 2010). Dále Jäschke et al., 2010 uvádí přípravky, obsahující *Gliocladium catenulatum*, jež dokázaly snížit závažnou míru poškození patogenem.

3.7.7 Supresivní půdy

Supresivní půdy jsou takové půdy, kde choroba působí malé škody, patogen se zde nevyskytuje nebo se zde není schopen se usídlit. Tato vlastnost je dána souborem abiotických a biotických vlastností. U nás byl takovýto typ půdy nalezen v katastru obce Bolehošť v Nahořanech (Rod, 1996).

3.8 Rezistence

Rezistence je schopnost rostliny odolávat tlaku patogena, má mnoho rozdělení. Tradičně se dělí na vertikální a horizontální. Vertikální, též rasově specifická dává odolnost jen k některým rasám patogena. Projev vertikální rezistence řídí většinou alely s dominantním

účinkem, geny velkého účinku, zřídka je odolnost řízena recesivními alelami a projevuje se hypersenzitivní reakcí (Věchet, 2012). Šlechtění na tento typ rezistence bývá jednodušší, avšak může dojít k překonání rezistence virulentními rasami patogena (Bartoš, 1979). Horizontální typ rezistence, rasově nespecifická odolnost ke všem rasám patogena je řízena polygenně, tedy více geny malého účinku. Tento typ rezistence bývá trvalejší a je využíván u plodin pěstovaných na velkých plochách (Agrios, 1997, Bartoš, 1979). Určitou úroveň rasově nespecifické rezistence mají i odrůdy, obsahující současně rasově specifickou rezistenci. Za přítomnosti účinného genu specifické rezistence je rasově nespecifická rezistence překryta účinkem tohoto genu (Dreiseitl, 2010).

3.8.1 Rezistence *Brassica*

V rámci druhu *Brassica oleracea* se vyskytují poddruhy, v nichž byla zaznamenána komplexní rasově nespecifická rezistence, u většiny rezistentních odrůd a genetických zdrojů rodu *Brassica* (*Brassica rapa*, *Brassica nigra*) je zjištěna rasově specifická rezistence, tedy dědičná (Diederichsen et al., 2009).

Rasově specifická- též vertikální rezistence je kontrolována dominantními geny a částečně kvantitativně pomocí minoritních QTLs (lokusů kvantitativních znaků) s epistatickým efektem, což je nadřazené působení jednoho genu nad genem jiným (Hirai, 2006, Werner et al. 2008). Rezistence k izolátům patogena je genetického charakteru, proto neztrácí odrůda nikdy svoji rezistenci k těmto izolátům, může být ale ovlivňována určitými podmínkami, jako je růstová fáze hostitele, teplota, intenzita světla, výživný stav hostitele, pak může být rezistence překonána. U specifické rezistence existuje orgánově- specifická rezistence, kdy patogen napadá pouze určitou část hostitele (Věchet, 2012). Systémová rezistence (SAR), dochází k akumulaci proteinů- hypersenzitivní reakci, která vyžaduje přítomnost kyseliny salicylové (Ludwig-Müller, 2014).

3.8.2 Šlechtění

V dnešní době se na šlechtění proti nádorovitosti kořenů brukvovitých zaměřuje hned několik zemí, Čína na čínském zelí, Německo a Švédsko na řepku olejku a Francie a Holandsko se zaměřují na šlechtění brukvovité zeleniny (Diederischen, 2009).

Inokula se skládají z více patotypů, proto by bylo snazší začlenit do kultivarů více genů rezistence. Šlechtění je zaměřováno hlavně na druhy, *B. oleracea*, *B. rapa*, *B. napus*. Pro nás je nejvýznamnější *Brassica napus*, zde je šlechtění komplikované, vzhledem k polygenně založené rezistenci s recesivně aditivním účinkem. Rezistentní genotypy se vyskytují vzácně a

dochází k rychlé ztrátě genů rezistence (Rod, 1996). Kvantitativní, též polygenní rezistence je ovlivňována vlivem vnějších faktorů (Věchet, 2012). Testování na rezistenci je vhodné provádět v laboratorních podmínkách, kde jsou konstantní podmínky prostředí. V polních podmínkách lze testovat jak rezistenci, tak toleranci ale nelze zajistit konstantní pěstební podmínky. V případě testování tolerance i rezistence je nutné použít infekční pole, dostatečně a rovnoměrně zamořené sporami *Plasmodiophora brassicae* (Chytilová a Dušek, 2007).

Boj proti nádorovitosti košťálovin je nejefektivnější pomocí pěstování rezistentních odrůd, jejichž sortiment narůstá díky rozvíjející se molekulární biologii, biologicko-technologickým přístupům v oblasti genetiky (Grupta, 2009). Rozvoj v oblasti molekulární biologie přinesl rozsáhlejší informace o genomu, rozvoj molekulárních markerů, a dále se věnovala pozornost identifikaci a mapování genů rezistence (Diederischen, 2009, Voorrips and Visser, 1993). Šlechtění rezistentních odrůd je založeno na posuzování fenotypu, případně využívá molekulární markery (Voorrips, 1996), které umožňují určit genetiku kvantitativní rezistence a nalézt místo kvantitativního znaku souvisejícího s rezistencí (Slusarenko et al., 2002). Geneticky modifikované rostliny s rezistencí k houbovým patogenům jsou založeny na využití peptidů z různých organismů (Collinge et al., 2010). K vývoji odolných odrůd jsou nutné screening testy, zjištění genetické variability (Hwang et al., 2012). Práce na vytvoření rezistentních odrůd není jednoduchá, jelikož existuje málo genetických zdrojů rezistence (Diederischen, 2009). Patogen *Plasmodiophora brassicae* vykazuje značnou genetickou variabilitu, korespondence mezi geny je dosud málo objasněna, z důvodu nedostatku informací o genetických sekvencích (Hirai, 2006).

Jak uvádí Věchet (2012) předpokladem efektivního rezistentního šlechtění:

- znalost biologie patogena, včetně rasového spektra,
- znalost mechanismu rezistence, včetně typu odolnosti a genetického založení rezistence
- projev odolnosti,
- znalost techniky inokulací, umělých infekcí v polních i skleníkových podmínkách.

3.8.3 Příznaky na rezistentní plodině

Po velkém tlaku patogena k infekci na kořenových vláscích dochází, ale šíření infekce je pomalejší, než u odrůd citlivých. U rezistentních následně dochází k inhibici sekundárního cyklu a následné tvorby nádorů, proběhl pouze primární cyklus (Voorrips, 1995,

Diederischen,2009) a nebylo prokázáno hromadění volných kyslíkových radikálů- ROS, tudíž nedochází k hypersenzitivní reakci (Hwang, 2012).Hwang et al. (2013) potvrzují, že pokud se na rezistentních odrůdách vytvoří nádory, obsahují méně spor a ne všechny jsou dostatečně vyvinuté a životaschopné. spór, než odrůdy odolné, čímž dochází k menšímu zamoření půdy.

Po pěstování rezistentních odrůd by mohlo dojít k postupnému vyčerpání odpočívajících spor v půdě, testování půdy probíhá měřením koncentrací spor pomocí kvantitativní PCR před a po sklizni (Ernst et al., 2013).

3.8.4 Rezistentní odrůdy

Odrůdy mají rasově specifickou rezistenci, jsou odolné proti nejčastějším patotypům. Roku 2000 byly v Evropě představeny 2 rezistentní odrůdy řepky ozimé Mendel a Tosca. Předpokladem rezistenčního šlechtění je existence zdrojů rezistence, které se vyskytují v geografických centrech původu jednotlivých plodin, je třeba zaměřit se na odolnost proti konkrétnímu patotypu převládajícímu v dané geografické oblasti (Habibur et al. 2011). Genetický základ pro rezistenci byl studován v *B. rapa*, *B. oleracea*, *B. napus* na rostlině *Arabidopsis thaliana*. V tuřínu bylo zjištěno, že rezistence nádorovitosti je řízena třemi nezávislými dominantními geny, každá rezistence je účinná k různým patotypům (Voorrips et al., 1997).

Po roce 2003, kdy došlo v západní Kanadě k rozšíření nádorovitosti kořenů brukvovitých, se začalo usilovat o vyšlechtění odolných a rezistentních odrůd a to proti hlavním patotypům, podle Wiliamsova systému, patotypy 2, 3, 5, 6 a 8 (Peng et al., 2014). Rezistentní odrůdy byly zavedeny na kanadském trhu v roce 2009 a okamžitě se staly dominantní odrůdou na trhu, pěstovanou v ohrožených oblastech. Další rezistentní odrůdy jsou ve vývoji, problémem je, že odolnost je podmíněna genem z jediného zdroje, tedy rasově specifická, což může vést k tomu, že odrůdy se časem stanou opět citlivými (Peng et al., 2014, Ahmed et al. 2011). Rezistence těchto odrůd musí být průběžně kontrolována kvůli vysokému selekčnímu tlaku. Také díky rozšiřování produkčních ploch řepky a opakovanému pěstování rezistentní odrůdy je riziko zhroucení rezistenčních mechanismů, díky výskytu specifických ras patogena (Cao a kol., 2014, Diederichsen et al., 2009).

Mezi rezistentní odrůdy řepky patří zmiňovaná odrůda Mendel s rasově specifickou rezistencí. Roku 2007 ÚZPI (Ústav zemědělských a potravinářských informací) přišly se zprávou, že v Německu a Velké Británii se objevila infekce odrůdy novou rasou patogena. Napadení neznamena prolomení rezistenčního mechanismu, ale je třeba prozkoumat novou

rasu patogena. Výzkumy ukázaly, že riziko modifikace patogena se zvyšuje v oblastech s intenzivním pěstováním meziplodin nebo zařazením cukrovky seté do mulče do osevního postupu (Anonym). Proto nejlepší cestou pro udržení rezistence odrůdy Mendel je nezařazování cukrovky seté do mulče do osevního postupu, používat odrůdu výhradně v zamořených oblastech (Anonym 4). V pokusu byla použita dále odrůda SY Alister s rasově specifickou rezistencí, speciálně vyšlechtěný hybrid odolný proti nejčastěji se vyskytujícím rasám *Plasmodiophora brassicae*, na napadených pozemcích poskytuje vysokou výnosovou stabilitu (Anonym 5).

Rezistentní odrůdy čínského zelí byly vyšlechtěny za pomoci genu evropské vodnice (*Brassica rapa*). *B. napus* je amfidiploid (kříženec) druhu *B. oleracea* a *B. rapa*, má nízkou vnitrodruhovou genetickou variabilitu, která je pro jednotlivé taxony rozšiřována o geny pocházející z původních druhů (Diederichsem et al., 2009).

3.9 Detekce a determinace- *Plasmodiophora brassicae*

Potvrzení nadorovitosti košťálovin vyžaduje sledování příznaků onemocnění, detekci DNA patogena ze vzorků půdy nebo kořenů rostliny. I přes absenci symptomů u rostlin mohou výsledky testů DNA pozitivní na přítomnost patogena. Následně pomocí biotestů je zapotřebí zjistit životaschopnost patogena. Biologická zkouška je založena na pěstování náchylných rostlin, po 6 týdnech dochází k vyhodnocení příznaků nadorovitosti (Anonym 6). Byla vyvinuta řada testů pro detekci patogena fluorescenční mikroskopie, sérologie, metody na bázi DNA, tyto metody jsou používány pro testování půdy, vody ale i pro vzorky rostlin (Faggian and Strelkov, 2009).

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

- Metoda symptomatická
- Metoda mikroskopická
- Metoda chemická a biochemická
- Metoda serologická
- Metoda molekulární

3.9.1 Metoda symptomatická

Tato metoda určuje poškození na základě viditelných příznaků, jedná se o základní metodu, využívanou jako první krok k určení poškození. Je využitelná okamžitě v prostoru a dostupná všem pěstitelům (Kazda a kol., 2010). Jednou z hojně využívaných metod

v minulosti byl Biotest, který byl vyhodnocován po 5-6 týdnech. Následně dochází k porovnávání přirozeně zamořených pozemků s těmi naočkovanými. Tyto testy jsou spolehlivé, nýbrž náročné na pracovní sílu, čas a prostor. Biotest je vhodné následně potvrdit PCR detekcí (Jędryczka et al., 2014). Biotest je buď vizuální, nebo probíhá mikroskopicky (Toxopeus et Janessen, 1975). Hodnocení pomocí Toxopeus et al. (1986) klasifikuje rostliny s DI nižším než 20 jako odolné, 20- 80 jako meziprodukt a více než 80 jako náchylné.

3.9.2 Metoda mikroskopická

Využívá charakteristických morfologických znaků původce poškození, metody využitelná u původců poškození, kteří nejsou okem viditelní (Kazda a kol., 2010).

Průkopníky diagnostiky pomocí mikroskopu jsou Takahashi a Yamaguchi (1987), kteří vyvinuli fluoresenční test pro detekci *Plasmodiophora brassicae*. Pod fluoresenčním mikroskopem mohou být pozorovány odpočívající výtrusy (Faggian et al., 1999). Metoda prošla nejednou aktualizací, poslední aktualizovaný test zahrnuje použití dvou fluorochromů, což vedlo ke zlepšení detekce spor. Jeden z fluorochromů je vázán na chitin v nepoškozených buňkách, druhý fluorochrom- ethidiumbromid proniká do poškozené buňky. To umožnilo barvením odlišit životaschopné spory, zbarvení modře a neživé spory, zbarvené červeně (Takahashi and Yamaguchi, 1989). Tato metoda je později zpochybněna Donaldem et al. (2002). Práce s mikroskopem a počítání spór vyžaduje bohaté zkušenosti a jako předchozí metoda je náročná na čas (Faggian et Strelkov, 2009).

3.9.3 Metoda serologická

Další metodou je serologická metoda, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), která je rychlá, spolehlivá i vysoce výkonná, ovšem nutností je laboratoř se základním přístrojovým vybavením. Užívá se pro determinaci virových a některých bakteriálních a houbových patogenů (Kazda a kol., 2010). Vyžaduje dostupnost protilátek specifických patogenů a může docházet k problémům s ohledem na citlivost nebo afinitu, protože je možná přítomnost více patotypů, proto není vhodné použít rutinně (Faggian et Strelkov, 2009). Zamořené půdy byly barveny látkou obsahující IgG, antiséra připravených z králíka, odpočívající spory byly obarveny a odlišeny od ostatních půdních částic a tkání rostlin (Arie et al., 1998)

Byla vyvinuta levná diagnostická souprava a zlepšit kvantifikaci patogenu koncentraci inokula prostřednictvím real- time PCR (Rennie et al., 2011, Wallenhammer et al., 2012)

3.9.4 Metoda molekulární

Jak uvádí Kazda a kol. (2010) jedná se o metodu vysoce přesnou, proveditelnou v dostatečně vybavené laboratoři. Využívá se pro stanovení virů, bakterií a hub. Jednou z metod molekulární biologie je PCR- polymerázová řetězová reakce.

3.9.4.1 Izolace DNA

Prvním krokem při práci s nukleovými kyselinami je jejich izolace v nativním stavu z přirozeného materiálu v dostatečném množství a čistotě. Nukleové kyseliny je nutné zbavit všech látek, které se po lýze buněk nebo virových částic stávají součástí hrubých lyzátů a jejichž přítomnost brání účinnému a specifickému působení enzymů používaných k jejich analýze a úpravám (Rozsypal, 2002).

Postup izolace DNA (Bártová, 2011, Rozsypal, 2002, Ovesná a Hodek, 2007)

- Rozrušení buněk nebo virových kapsidů působením enzymů (lysozym, celulóza) nebodetergentů (laurylsíran sodný).
- Odstranění kontaminant pomocí enzymů.
- K separaci DNA, je používána směs fenol-chloroformu. Chloroform denaturuje proteiny, rozpouští tuky a pomáhá oddělit jednotlivé fáze, dochází k vysrážení. Pro menší kontaminaci fenolem, lze použít směs fenol: chloroform: isoamylalkohol.
- Následnou centrifugací dojde k oddělení spodní fáze tvořené fenolem, mezifáze tvořené proteiny a zbytky buněk a horní fáze obsahující nukleové kyseliny. Následně se vodní fáze inkubuje RNázou.
- Následně je DNA vysrážena etanolem, a centrifugací získaný sediment obsahující DNA je rozpuštěn ve vodném roztoku.

Fenol- chloroformová extrakce je poměrně náročná, jednak časově, kvůli opakujícím se centrifugacím a jednak je závislá na pečlivém provedení. Práci a čas lze ušetřit využitím komerčně dodávaným kitů, které výrazně usnadňují a urychlují postup při získávání DNA (Bártová, 2011).

3.9.4.2 PCR- polymerázová řetězová reakce

Metoda PCR byla zavedena v roce 1985 Kary B. Mullisem a byla velkým přínosem pro molekulární biologii (Šmarda a kol., 2008). Tato metoda našla využití k detekci houbových patogenů, využívá se na rostliny i půdní vzorky a poskytuje rychlé, citlivé a spolehlivé výsledky (Cao et al., 2007). Principem metody PCR je enzymatická

amplifikace DNA v *in vitro* podmínkách. Reakce probíhá ve třech cyklicky se opakujících se fázích- denaturace, nasedání primerů, elongace, tedy prodlužování fragmentů DNA. Tyto fáze se odlišují teplotními požadavky. Pro tuto metodu je nutná přítomnost primerů (oligonukleotidových sond), které slouží jako stavební základ pro tvorbu nového vlákna (Bartůňková a kol., 2011). Primery, sekvence 15-20 nukleotidů, zahajují replikaci a vymezují úsek, který má být namnožen (Nečas, 2000). Zahřívací krok v každé fázi vyžaduje přítomnost DNA-polymerázy a nukleotidů, kdy probíhá syntéza nových řetězců (Rozsypal, 2002). Primery pro detekci *Plasmodiophora brassicae* byly navrženy pro amplifikaci sekvence s jednou kopií (Ito et al., 1997) nebo více kopií z ITS úseků ribozomální DNA (Faggian et al., 2009, Cao et al., 2007) s použitím tří primerů založená na sekvenci DNA z pentylntransferase genu (Ito et al., 2007).

Faggian et al. (2009) uvádí další nested PCR techniky pro konkrétní detekce *Plasmodiophora brassicae* v půdě a vodě, využívající dvě sady primerů. Vnější pár primerů vymezí z dlouhého fragmentu určitý lokus. Vnitřní pár primerů amplifikuje pouze potřebnou část sekvence. Metoda nested PCR technika, probíhající dvoufázově, za použití primerů, se kterými přišel na trh Ito et al. (1997) PBTZ-3 a PBTZ-4. Nicméně pro zlepšení citlivosti a odhalení patogena v přirozeně infikovaných půdách, musí produkty získané z této PCR metody projít druhou PCR amplifikací (Cao et al., 2007).

Následně byla vyvinuta odstupňovaná PCR pro detekci patogena z rostlinných i půdních vzorků. Byly navrženy primery TC1F a TC1R založené na *P. brassicae* částečně 18S ribozomální RNA (dochází k sestřihu a vzniká 18S r- RNA), genové sekvence z GenBank, kdy je získán produkt o 548 bp. Ve druhém kroku jsou získané amplikony převedeny do jiné zkumavky obsahující druhou dvojici primerů, TC2F a TC2R specifických k vnitřnímu úseku amplikonů, je produkován 519 bp produktu (Cao et al. 2007).

Kvantitativní PCR (QPCR), nazývaná též real- time PCR, její podstatou je průběžné sledování množství amplifikovaného produktu během jednotlivých cyklů reakce. Tato metoda, využívá například primerů navržených Faggian et al. (1999) PbITS6 a PbITS7, pro sledování progresu onemocnění v kořenech. Pomocí PCR lze detekovat patogena *Plasmodiophora brassicae* z kořene, který nevykazuje příznaky napadení, již 3 dny po inokulaci patogenem.

Další metodou pro detekci patogena je LAMP (izotermická amplifikace DNA, ke které se využívá sada tří primerů. Extrakce DNA probíhá za použití modifikované metody CTAB. Tato metoda je snadná, rychlá, přesná, ovšem méně citlivá než kvantitativní PCR.

3.9.4.3 Elektroforetická separace PCR produktů

Tato metoda patří k nejpoužívanějším technikám při vizualizaci a případně k izolaci produktů PCR. Principem metody je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Nositelem náboje nukleových kyselin jsou záporně nabitě fosfátové skupiny (Rozsypal, 2002). Používá se gelová elektroforéza, která dokáže rozdělit jednotlivé fragmenty (bp), stejně dlouhé, podle pohyblivosti.

4. MATERIÁL A METODY

Předmětem experimentu bylo sledování odolnosti odrůd vůči patogenu *Plasmodiophora brassicae*. Experiment s odolnými kultivary nádorovitosti kořenů brukvovitých řepky ozimé započal v roce 2012. Pro rok 2014 byly testované rezistentní odrůdy pěstovány na kontaminované půdě odebrané z 15 vybraných lokalit. Tyto lokality byly vybrány z velké části České republiky, z odlišných krajů (tabulka 1, obrázek 2). Experiment byl vyhodnocován na základě četnosti a velikosti nádorů na kořenech rostlin. Pokusy byly prováděny ve skleníku a v polních podmínkách.

4.1 Lokalita

Pro pokus bylo vybráno 15 lokalit zamořených patogenem *Plasmodiophora brassicae*.

Číslo lokality	Lokalita	Kraj	Nadmořská výška
1.	Modlibohov	Liberecký	389 m. n. m.
2.	Holany	Liberecký	265 m. n. m.
3.	Bílý Kostel nad Nisou	Liberecký	275 m. n. m.
4.	Horka u Bakova nad J	Středočeský	221 m. n. m.
5.	Třebnouševy	Královéhradecký	278 m. n. m.
6.	Miletín	Královéhradecký	334 m. n. m.
7	Kbelnice	Královéhradecký	294 m. n. m.
8.	Žirovnice	Vysočina	565 m. n. m.
9.	Horusice	Jihočeský	228 m. n. m.
10.	Hrdějovice Ves	Jihočeský	385 m. n. m.
11.	Bílovice	Zlínský	194 m. n. m.
12.	Pohledy	Pardubický	495 m. n. m.
13.	Kozmice	Moravskoslezský	236 m. n. m.

Číslo lokality	Lokalita	Kraj	Nadmořská výška
14.	Klokočov	Jihočeský	619 m. n. m.
15.	Hrádek nad Nisou	Liberecký	255 m. n. m.

Tabulka 1. Seznam lokalit pro odběr půdy odebraných v roce 2014



Obrázek 2. Mapa lokalit

4.2 Rostlinný materiál

Jako rostlinný materiál byla použita řepka olejka, díky spolupráci se Svazem pěstitelů a zpracovatelů olejnin bylo získáno osivo rezistentních odrůd řepky. Bylo posuzováno 6 rezistentních odrůd řepky ozimé, které jsou distribuovány šlechtitelskými společnostmi (tab. 2). Kromě rezistentních odrůd, byla jako kontrola použita odrůda náchylná, dodána anonymně, u které onemocnění vždy propuklo.

Odrůdy 2014	Distributor
SY Alister	Syngenta
CWH 241	Monsanto
Mendel	Rapool
Mendelson	Rapool
SY Alister	Rapool
X10W513	Pioneer

Tabulka 2. Rezistentní odrůdy a jejich distributoři

4.3 Organizace pokusu

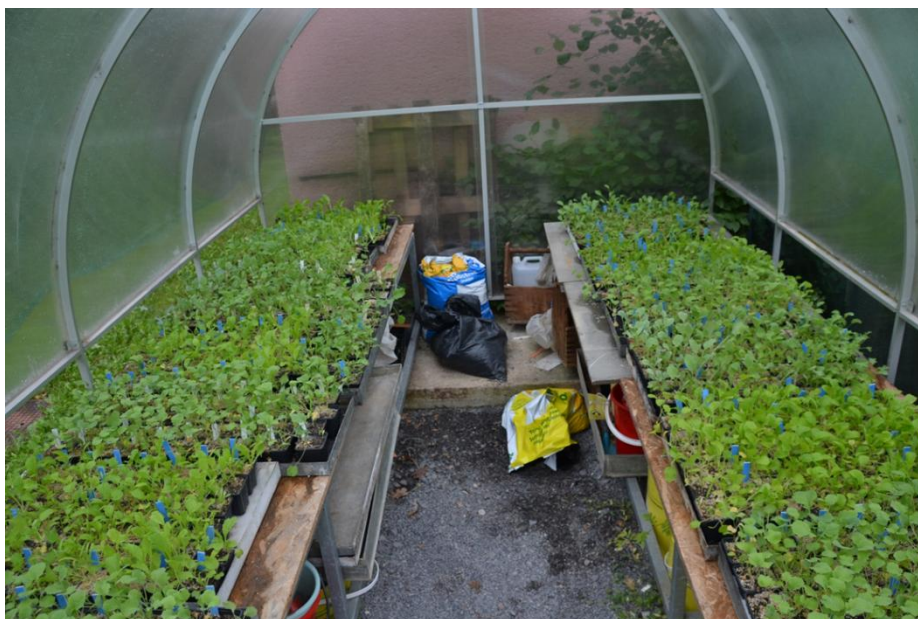
4.3.1 Příprava materiálu

V roce 2014 byly odebrány půdní vzorky z polí infikovaných patogenem *Plasmodiophora brassicae* z různých částí České republiky (tab. 1). Do této zeminy bylo vyseto 6 odrůd řepky ozimé (tab. 2), distribuovaných jako rezistentní. Na jednotlivé lokality bylo vyseto 30 rostlin, což je asi 2520 rostlin celkem. Nepotřebná a nadbytečná infikovaná zemina a další materiál byl ukládán do speciálně označených nádob. Při přípravě pokusu, byla před samotným zasetím odrůd zemina z vybraných lokalit zbavena nečistot a dále promíchána s pískem v poměru 1:1, čímž došlo ke zlepšení podmínek pro rozvoj patogena *Plasmodiophora brassicae*. Mísením došlo k odlehčení půdy a snížením obsahu humusu (Rod, 1996).

4.3.2 Založení pokusu

Pokus byl založen 30. 4. 2014 v technickém izolátoru, který zajišťuje podmínky pro růst rostlin podobné podmínkám venkovním. Při samotném plnění květináčů infikovanou zeminou musel být opět striktně dodržována veškerá pravidla pro práci s toxickým materiálem. Pro jednotlivé lokality a jednotlivé odrůdy byly používány gumové rukavice, aby se zabránilo případné vzájemné kontaminaci vzorků. Jednotlivé květináče byly rozříděny podle lokality odběru zeminy a podle jednotlivých odrůd. Takto rozříděné květináče byly

naskládány na hliníková plata, která byla opatřena geotextílií. Tato textilie měla zaručit optimální a rovnoměrné vlhkostní podmínky pro jednotlivé květináče. Jak plata s květináči, tak jednotlivé květináče měly zřetelné označení dvojitým způsobem, aby se eliminovaly případné chyby způsobené lidským faktorem. Při zakládání porostu a manipulaci s patogenem bylo samozřejmostí dodržet hygienická opatření. Veškeré nářadí a pomůcky byly vydesinfikovány v roztoku Sava. Rostlinám byla zajištěna dostatečná zálivka a pravidelná aplikace hnojiv.



Obrázek 3. Pěstované rostliny řepky ozimé na infikované zemině. Foto: Veronika Řičařová (2014)

4.4 Monitoring *Plasmodiophora brassicae*

4.4.1 Půdní vzorky

Na každé lokalitě byl proveden sběr půdních vzorků. Z jedné lokality bylo odebráno vždy přibližně 0,5 kg zeminy, které byly následně v laboratorních podmínkách vysušeny a uskladněny pro následující použití. Půda z každé lokality byla označena dvojitým způsobem, aby nedošlo k záměně. Na identifikačním štítku byl uveden název lokality, její číslo a rok odběru. Toto označení bylo dodržováno při jakékoliv manipulaci se vzorky. U každého vzorku z lokality došlo k měření pH a následně byl testován na přítomnost patogenu *Plasmodiophora brassicae*.

4.4.1.1 Měření pH

U použité zeminy, z dodaných 12 lokalit bylo změřeno pH. Pro měření pH byl zvolen vodotěsný pH metr, výrobcem je Hanna instruments, HI 98127- HI 98128.

Postup stanovení:

- Do kádinky bylo odváženo 10 g jemnozeme,
- bylo přidáno 20 ml vychladlé převařené destilované vody,
- následně byla směs promíchána skleněnou tyčinkou,
- kalibrovanou skleněnou elektrodou bylo změřeno pH přímo v suspenzi.

4.4.2. Izolace DNA z půdy

Izolace DNA byla prováděna pomocí komerčního kitu NucleoSpin soil DNA Purification Kit (firma EURx). Postup probíhal podle protokolu výrobce. Odebraná zemina z lokalit (tab. 1) byla vysušena při laboratorní teplotě.

- Do mikrozkušavky bylo napipetováno 40 μ l Buffer SL, poté byla ponechána při laboratorní teplotě.
- Půda byla homogenizována, rozdrčena ve třecí misce na jemné částice, bylo odváženo 50mg a následně byla převedena do mikrozkušavky *Bead Tube*, vzorek byl promíchán v ruce, a následně k němu bylo přidáno 700 μ l Lyse SL1 a opět promíchán v ruce.
- Poté bylo přidáno 150 μ l Enhancer SX, následně byla mikrozkušavka dána do horizontální polohy a stočena, následně ponechána 5 minut při pokojové teplotě.
- Dalším krokem byla centrifugace vzorku po dobu 2 minut, 11 000 \times g, po centrifugaci vzorku byl získán supernatan pro srážení volné DNA a sediment pro izolaci DNA z půdních mikroorganismů, který byl převeden do nové 2 ml mikrozkušavky.,
- Bylo přidáno 150 μ l SL3 pufru protřepáno a inkubováno 5 minut na ledu. Dále byla mikrozkušavka centrifugována po dobu 1 minuty 11 000 \times g.
- 700 μ l supernatanu bylo převedeno do předpřipravené mikrozkušavky s kolonkou, vzorek byl centrifugován (1 minuta, 11 000 \times g) a byla odstraněna vodní fáze. Do stejné mikrozkušavky a bylo přidáno 250 μ l SB pufru a stočeno. Dále bylo převedeno 550 μ l do nové kolonky, centrifugováno (1 minuta, 11 000 \times g) a zbývající vzorek byl dán na kolonu a centrifugován (1 minuta, 11 000 \times g).
- Dále bylo přidáno 500 μ l SB pufru, centrifugováno (30s, 11 000 \times g), vodní fáze byla odstraněna a bylo přidáno 550 μ l SW1 pufru centrifugovat (30s, 11 000 \times g), byla

odstraněna vodní fáze a přidáno 700 μ l SW2 pufru, stočit a centrifugovat (30s, 11 000 \times g).

- Na závěr bylo přidáno 50 μ l SE pufru a ponecháno inkubovat při pokojové teplotě 1 minutu, následně proběhla centrifugace (30s, 11 000 \times g). Kolonka s membránou byla odstraněna a izolovaná DNA použita pro další analýzy.

4.4.2.1 Čistota a koncentrace vyizolované DNA

Čistota a koncentrace celkové DNA byla měřena na spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA). Pro stanovení stačilo malé množství vzorku o objemu 2 μ l. Přístroj měří koncentraci a čistotu nukleových kyselin a proteinů. Čistota vzorku, hodnota poměru absorbancí 260/280 by se měla pohybovat kolem 1,8- 2,0.

4.4.3 PCR- Polymerázová řetězová reakce

Tato metoda byla prováděna pro ověření přítomnosti patogena *Plasmodiophora brassicae* na lokalitách vybraných pro experiment. Plní funkci ověření přítomnosti a zároveň je účinnou, rychlou detekční metodou.

- Reakce PCR byla prováděna v objemu 25 μ l obsahujícím:
- 18,05 μ l dd sterilní H₂O
- 2,5 μ l 10 \times DreamTaq pufru (Fermentas)
- 2 μ l Mg Cl₂
- 0,25 μ l každého dNTP (zásobní roztok 10 μ M, Fermentas)
- 0,5 μ l reverzní primer (zásobní roztok 10 μ l)
- 0,5 μ l forwardového primeru (zásobní roztok 10 μ M)
- 0,2 μ l DreamTaq polymerázy (zásobní roztok 5U/ μ l, Fermentas)
- 1 μ l vzorku

Pro PCR byl použit termocykler MJ Research PTC 200. Velikost amplifikovaného fragmentu 548 bp.

Vzorky byly vloženy do termocykleru, podmínky během reakce byly následující:

- denaturace 94°C 2 minuty
- 35 cyklů:
- nasednutí primerů 94°C 30 s.
- syntéza DNA 65°C 45 s.
- 72°C 45 s.

- konečná syntéza vlákna 72°C 7 minut

Název	Sekvence 5'-----→3'	Orien- tace	Velikost produktu
TC1F	GTGGTCGAACTTCATTAATTTGGGCTCTT	forwardový	548 bp
TC1R	TTCACCTACGGAACGTATATGTGCATGTGA	reverzní	
TC2F	AAACAACGAGTCAGCTTGAATGCTAGTGTG	forwardový	519 bp
TC2R	CTTTAGTTGTGTTTCGGCTAGGATGGTTCG	reverzní	
attTC1F	AAAAGCAGGCTGTGGTCGAACTTCATTA ATTTGGGCTCTT	forwardový	
attTC1R	AGAAAGCTGGGTTTCACCTACGGAACGTAT ATGTGCATGTGA	reverzní	

Tabulka 3. Použité primery Cao et al. 2007

4.4.4 Elektroforetická separace

Pro elektroforetickou separaci byl připraven agarózový gel z agarózy a ředěného TBE pufru, takto byl převeden do Erlenmayerovy baňky, promíchán a rozvařen v mikrovlnné troubě. Po mírném zchladnutí, na 60°C, byl přidán 1 µl ethidium bromid. Agaróza s ethidiem byla následně přelita do aparatury určené pro tuhnutí gelu a byl vložen hřebínek. Takto byl gel ponechán při laboratorní teplotě, asi 20 minut- dokud neztuhl. Takto připravená aparatura byla vložena do elektroforetické vany a zalita TBE pufrem. Následně byl hřebínek vyjmut. První a poslední jamka zůstala prázdná. Do následujících byly vzorky převedeno 10 µl PCR produktu smíchaného s 2 µl barviva (6× loading dye solution, Fermentas). Do prázdných jamek bylo napipetováno 3 µl standartu. Následně byla elektroforéza spuštěna. Proces trval 1 hodinu při konstantním stejnosměrném napětí 90 V. Vizualizace fragmentů byla provedena na UV transiluminátoru Syngene.

Složení TBE pufry:

10 × TBE (pH) – 890 mM Tris, 890 mM kyselina boritá; 20 mM EDTA. Sterilizace pomocí autoklávu. Skladování při laboratorní teplotě.

4.5 Metoda detekce *Plasmodiophora brassicae* v rostlinném pletivu

Skližeň a následné vyhodnocení proběhlo 6-7 týdnů od založení porostu (po inokulaci). Z každého květníku byly odebrány rostliny, jejichž zelená část byla odříznuta. Kořenová část řepky byla zbavena zeminy a následně důkladně omyta pod proudem tekoucí vody. Při omývání byl kladen důraz na pečlivost a opatrnost při manipulaci, aby nedošlo k eliminaci ztrát vlivem lámání postranních kořenů. Mezi omýváním jednotlivých variant byla voda měněna a likvidována. Použitá nádoby a jiný skleníkový materiál, který přišel do kontaktu s infikovanou zemínou byl následně vydesinfikován roztokem SAVA. U každé rostliny byla stanovena intenzita napadení, vizuální vyhodnocení probíhalo podle stupnice Kuginuki et al. (1999). Označení stupnice je číselné v rozmezí 0-3 a určuje stupeň poškození rostliny.

- 0 - bez vizuálních příznaků napadení
- 1 - několik malých nádorů na postranních kořenech
- 2 - malé až střední hálky na 1/3-2/3, napaden hlavní kořen
- 3 - střední až velké hálky na víc jak 2/3 kořenů, deformace celé kořenové soustavy

Na základě získaných údajů lze stanovit index napadení (disease index- DI %). Tento index udává procentuální napadení řepky ozimé patogenem *Plasmodiophora brassicae* a byla vypočtena s použitím vzorce Horiuchi and Hori (1980) uvedeném Strelkov et al., (2006).

$$DI (\%) = \frac{\sum(n \times 0 + n \times 1 + n \times 2 + n \times 3)}{N \times 3} \times 100 \%$$

DI- Index napadení

N-celkový počet rostlin

n- počet rostlin pro jednotlivé stupně napadení

S procentem napadení roste poškození rostliny. U rezistentních odrůd bývá hodnota DI menší než 20 %, u vnímavých odrůd to je 80-100 % (Dušek a Chytilová, 2007). V případě negativního nálezu na kořenech, nebo pro urychlení pokusu, lze použít další metodu pro detekci- PCR.

4.5.1 Izolace DNA pomocí CTAB

Biologický materiál (kořeny) byly důkladně omyty pod tekoucí vodou.

- Následně byly sterilizovány, aby došlo k zabránění kontaminace z vnějšího prostředí. Nejdřív v roztoku 70 % etanolu po dobu 2 minut, následně 10 minut v 20% SAVU (5 % chlornan sodný, 1% hydroxid sodný), následně opět omyté tekoucí vodou.
- Omyté kořeny byly rozdrčeny ve třecí misce a pomocí tekutého dusíku na drobný prášek. Takto připravený prášek byl pomocí sterilní špachtle převeden do mikrozkušavky (navážka 100 mg). Mikrozkušavka byla umístěna do tekutého dusíku a následně použita pro izolaci DNA.
- Ke vzorku byly přidány 3 drtící koule o průměru 3 mm a 100 μ l CTAB pufru, který byl zahřátím zbaven sraženin. Vzorek byl homogenizován. K homogenizaci vzorku byl použit oscilační mlýn, 1,5 minuty rychlostí 30 kmitů za sekundu. Po homogenizaci bylo přidáno 400 μ l CTAB pufru a následně třepán 2 minuty stejnou rychlostí.
- Do vzorku bylo přidáno opět 400 μ l CTAB pufru a byl inkubován při 64 °C po dobu 1 hodiny.
- Ke vzorku bylo po inkubaci přidáno 900 μ l směsi fenol DNA (pH 8): chloroform-izoamylalkoholu (24:1) v poměru 1:1. Vzorek byl třepán a centrifugován 7000 \times g po dobu 10 minut. Následně byla vodní fáze převedena do nové mikrozkušavky a předchozí krok s přidáním množství fenolu bylo zopakováno.
- Vodní fáze byla převedena do nové mikrozkušavky, bylo přidáno stejné množství chloroform- izomylalkoholu (24:1). Vzorek byl třepán (2200 RPM, 10 min), poté centrifugován (7000 \times g, 10 min.).
- Vodní fáze převedena do nové mikrozkušavky a přidáno totožné množství ledového izopropylalkoholu. Tato směs byla promíchána a vzorek ponechán 3 \times 3 minuty v tekutém dusíku nebo přes noc ponechán v mrazicím boxu (-24°C).
- Poté byl vzorek centrifugován (10 000 \times g, 10 min.) a vodní fáze byla odstraněna. Peleta byla promyta v 70 % chlazeném etanolu a centrifugována (10 000 \times g, 10 min.)
- Mikrozkušavka byla po odstranění fáze ponechána při laboratorní teplotě po 10 minut. Peleta byla rozpuštěna v 50 μ l TE pufru a použit ihned pro další analýzy, nebo ponechán přes noc při teplotě -28 °C.

Použité chemikálie

- CTAB pufr: 2% CTAB (cetyltrimetylamonium bromid); 0,1 M Tris (pH 8); 20 mM EDTA; 0,7 M NaCl; 2- merkaptoetanol
- Fenol (pH 8)
- Chloroform- izoamylalkohol (24:1)
- Izopropylalkohol
- 70% etanol
- TE pufr: 10 mM Tris (pH 8); 1mM EDTA

4.5.1.1 Čistota vyizolované DNA

Viz. protokol uvedený v kapitole 4.4.2.1

4.5.2 PCR- Polymerázová řetězová reakce

Viz. protokol uvedený v kapitole 4.4.3.

4.5.3 Elektroforetická separace

Viz. protokol uvedený v kapitole 4.4.4.

5. VÝSLEDKY

V roce 2014 nebyla dodána zemina z lokalit číslo 8(Žirovnice), 10 (Hrdějovice Ves) a 11 (Velké Bílovice). Z důvodu neúspěšné infekce u lokality číslo 1 (Modlibohov) byla tato lokalita vyřazena z experimentu. Experiment byl prováděn ve skleníku i v polních podmínkách, výsledky byly totožné. Hodnocení probíhalo symptomaticky, kdy byla stanovena intenzita napadení podle stupnice Kuginuki et al. (1999) a následně vypočítán index napadení za použití vzorce Horiuchi and Hori (1980), vše probíhalo podle protokolu uvedeného v kapitole 4.5. Dále byla z kořenů provedena detekce patogena pomocí metody PCR za použití primerů uvedených v tabulce 3. U odebraných zemin, z uvedených lokalit (tab. 1) bylo změřeno pH a dále byla izolována DNA, která byla analyzována technikou PCR za účelem detekce patogena *Plasmodiophora brassicae*, protokol uveden v kapitole 4.4.

Horní části rostlin nevykazovaly jasné příznaky napadení.

5.1 Vliv pH

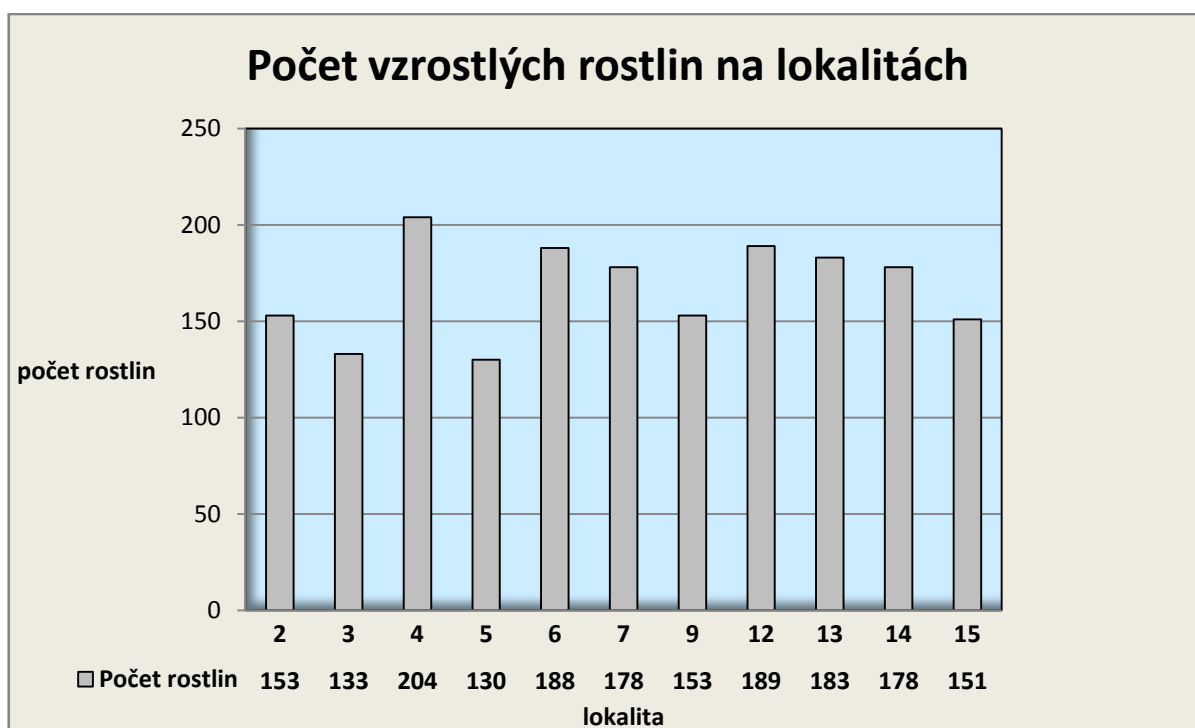
V rámci tohoto experimentu bylo u půd odebraných z jednotlivých lokalit (tab. 1) změřeno pH, hodnoty pH naměřené na jednotlivých lokalitách jsou uvedeny v následující tabulce (tab.3). Byly naměřeny hodnoty pohybující se v rozmezí 6,2- 7,3.

Číslo	Lokalia	pH	Číslo	Lokalia	pH
1	Modlibohov	7,1	9	Horusice	6,4
2	Holany	7,3	10	Hrdějovice Ves	x
3	Bílý Kostel nad Nisou	6,8	11	Velké Bílovice	x
4	Hourka u Bakova nad J.	6,9	12	Pohledy	6,6
5	Třebnouševy	6,5	13	Klokočov	6,7
6	Miletín	6,6	14	Kozmice	6,6
7	Kbelnice	6,6	15	Hrádek nad Nisou	6,8
8	Žirovnice	x			

Tabulka 4. Hodnoty pH naměřené na lokalitách

5.2 Počet rostlin

Následující graf (graf 2.) znázorňuje počet vzrostlých rostlin na jednotlivých lokalitách 1- 15, mimo lokality uvedené v kapitole 4.2. Celkem bylo vyseto 2520 rostlin, počet vzešlých rostlin v době sklizně bylo 2025, což odpovídá 80,3 %. V předchozím roce, jak uvádí Pícha (2014) vzešlo z 2940 pouze 1656, což je pouze 56,3 %. Nejméně vzešlých rostlin bylo na lokalitě 5 (Třebnouševs), konkrétně 130 z 210 vyšetých semen, což je 61,9 %, naopak nejvíce bylo na půdě z lokality 4 (Horka u Bakova nad J.), kde z 210 vyšetých semen vzešlo 204 rostlin, tedy 91,4 %. Nejvíce vzrostlých rostlin a tím, nejvíce materiálu pro hodnocení bylo u zmiňované lokality 4 (Horka u Bakova nad J.) ze Středočeského kraje a lokality 12 (Pohledy) z Pardubického kraje.



Graf 2. Počet vzrostlých rostlin na lokalitách 2-15.

5.3 Index napadení- DI (%)

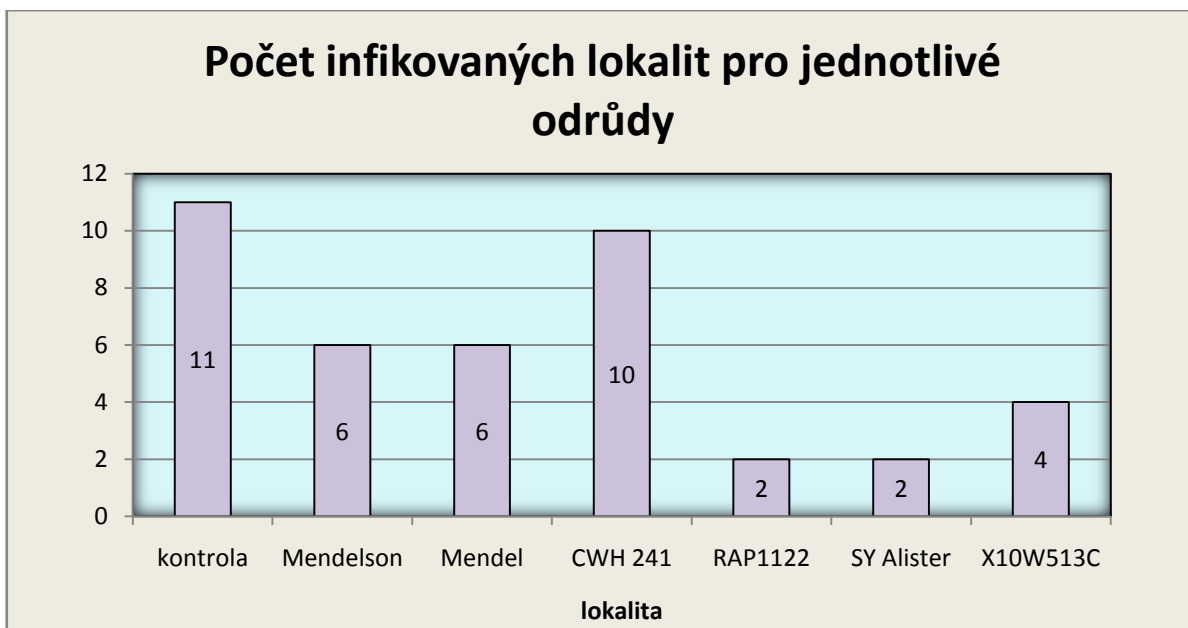
Podrobný přehled pro dané lokality, který zahrnuje počet rostlin, stupeň poškození a index napadení (DI %) je uveden v tabulce 5, příloha- kapitola 9. V této tabulce jsou rostliny rozříděny do 4 skupin, na základě stupněpoškozenípodle stupnice Kuginuki et al. (1999), u jednotlivých vzorků je uveden DI (%).Mezi testovanými odrůdami dosáhla nejlepších výsledků odrůda **SY Alister** s DI 0,5% a hned vzápětí **RAP 1122** s DI 0,8%. Naopak z testovaných dopadla nejhůře,s indexem napadení 27,5 % (tab. 6), odrůda**CWH 241**, vedená jako rezistentní vůči onemocnění *Plasmodiophora brassicae*. V rámci jednotlivých lokalit

dopadla nejlépe lokalita číslo 4 (Horka u Bakova nad Jizerou) s průměrným indexem napadení 1,2 %. Ostatní lokality jsou vcelku vyrovnané, nejhůře dopadly lokality 2, 5, 6, 15 s průměrným indexem napadení v rozmezí 20,7- 21,3 %. Společným znakem těchto lokalit je lokalizace na severu republiky. Podrobnější rozbor je uveden níže, u jednotlivých grafů.

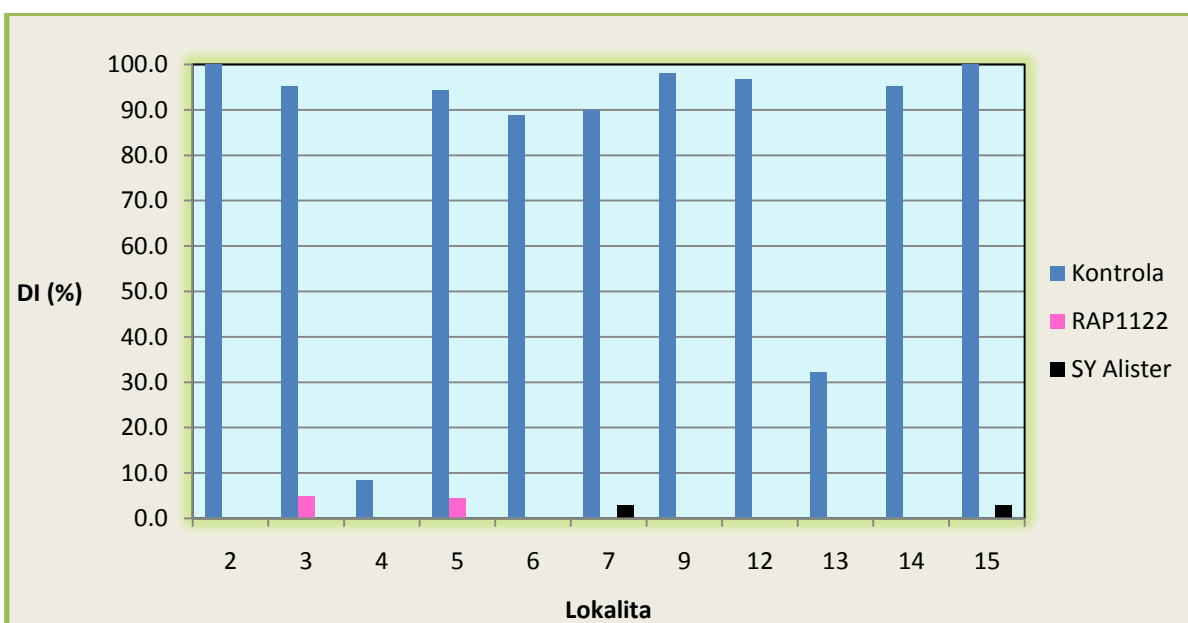
Lokalita	Kontrola	Mendelson	Mendel	CWH 241	RAP1122	SY Alistr	X10W513C	Průměr
2	100,0	0,0	0,0	36,4	0,0	0,0	10,8	21,0
3	95,2	5,6	0,0	33,3	5,0	0,0	0,0	19,9
4	8,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2
5	94,4	11,1	9,3	26,7	4,3	0,0	0,0	20,8
6	88,9	6,4	6,5	42,9	0,0	0,0	0,0	20,7
7	90,0	7,3	0,0	11,1	0,0	2,9	2,5	16,3
9	98,0	0,0	0,0	13,9	0,0	0,0	0,0	16,0
12	96,7	0,0	6,0	30,4	0,0	0,0	3,0	19,4
13	32,2	0,0	2,9	44,4	0,0	0,0	0,0	11,4
14	95,2	4,2	5,3	30,4	0,0	0,0	0,0	19,3
15	100,0	6,1	2,9	33,3	0,0	3,0	3,6	21,3
Průměr	81,7	3,7	3,0	27,5	0,8	0,5	1,8	

Tabulka 6. Průměrný index napadení (DI %) u rezistentních odrůd na vybraných lokalitách

V následujícím grafu (Graf 3) je znázorněno, u kolika lokalit došlo k napadení v rámci jednotlivých odrůd. Potvrzuje, hodnocení podle indexu napadení, kde byly nejlépe hodnoceny odrůdy **SY Alister** a **RAP1122**, i z následujícího grafu vyplývá, že tyto odrůdy dosáhly nejlepších výsledků, kdy došlo k napadení pouze u 2 lokalit, čímž obě odrůdy dosáhly totální rezistence na 9 lokalitách (tab. 6, graf 3). Tyto lokality se neshodují, u odrůdy SY Alister byly napadeny lokality 7 (Kbelnice) a 15 (Hrádek nad Nisou) (graf 4), u odrůdy RAP1122 lokality 3 (Bílý Kostel nad Nisou) a 5 (Třebnouševy) (graf 4). Společné pro tyto lokality je lokalizace na severu republiky. Nejhůře z testovaných, s napadením na 10 lokalitách dopadla odrůda CWH 241, jedinou lokalitou, která nevykázala napadení je lokalita 4 (Horka u Bakova nad Jizerou).

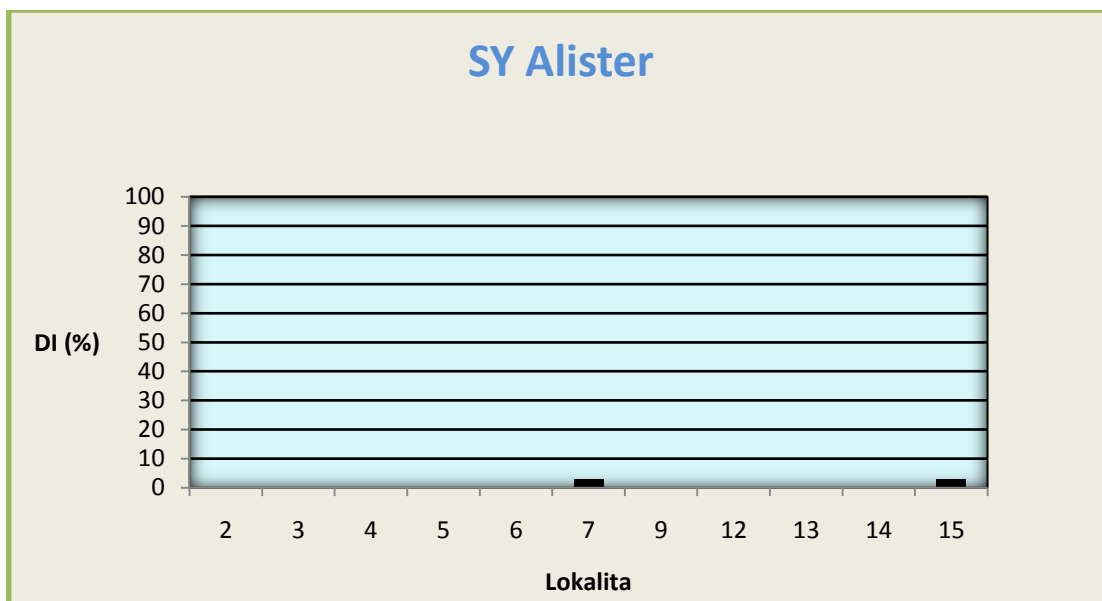


Graf 3. Počet napadených lokalit v rámci jednotlivých odrůd.



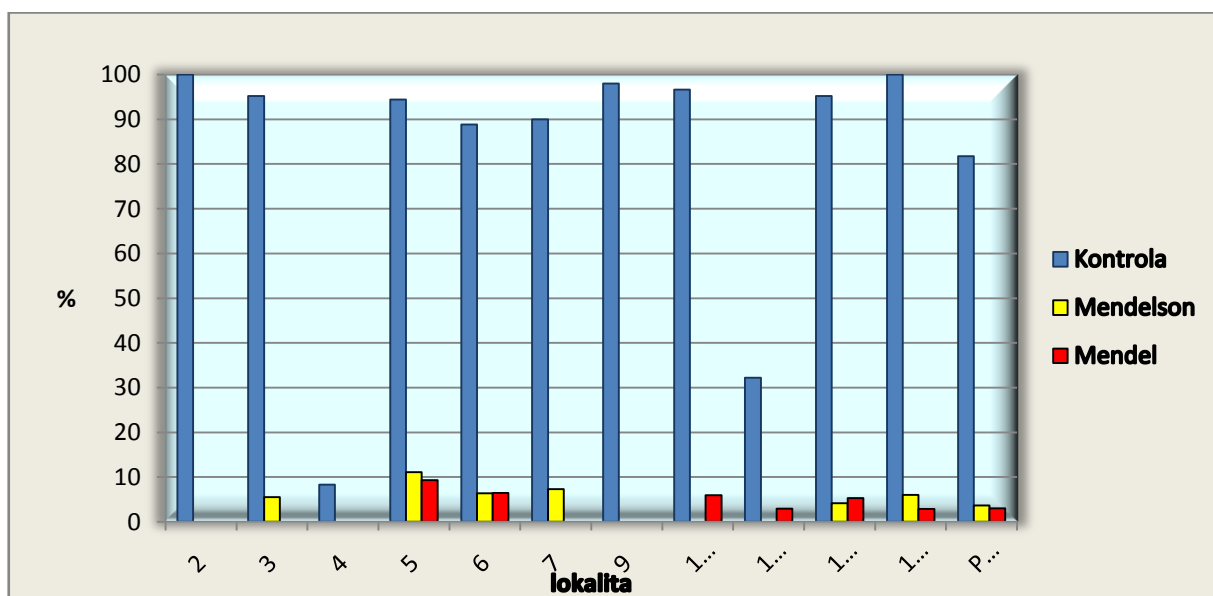
Graf 4. Porovnání průměrného indexu napadení- DI (%), mezi kontrolou, RAP1122, SY Alister

V následujícím grafu, grafu 5 je zobrazen DI (%) odrůdy SY Alister, nejlépe hodnocené odrůdy. U této odrůdy došlo k napadení pouze na lokalitě 7 (Kbelnice), kde ID dosáhl 2,9 % (tab. 5) a lokalitě 15 (Hrádek nad Nisou) s DI 3,0 % (tab. 5). Obě tyto lokality se nacházejí na severu republiky a podmínky pro rozvoj patogena mohou být obdobné.



Graf. 5 Průměrný index napadení- DI(%) u nejlépe hodnocené rezistentní odrůdy SY Alister

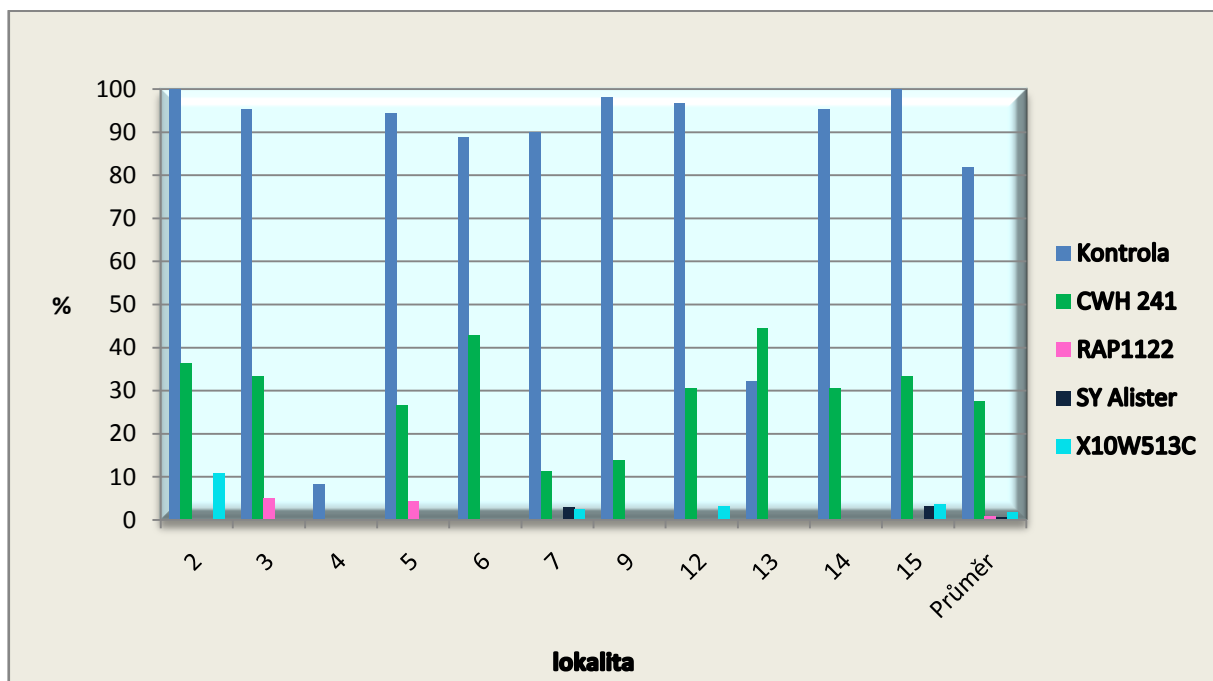
V následujících dvou grafech je znázorněn index napadení pro jednotlivé odrůdy na vybraných lokalitách, pro větší přehlednost jsou data rozdělena do dvou grafů (graf 6 a graf 7). Z grafu 6 vyplývá, že k největšímu napadení odrůd Mendelson a Mendel došlo na lokalitě číslo 5 (Třebnouševs) (tab. 1), kde index napadení odrůdy Mendelson dosáhl 11,1%, u odrůdy Mendel pak 9,3%. Obě odrůdy jsou s tímto indexem považovány za rezistentní.



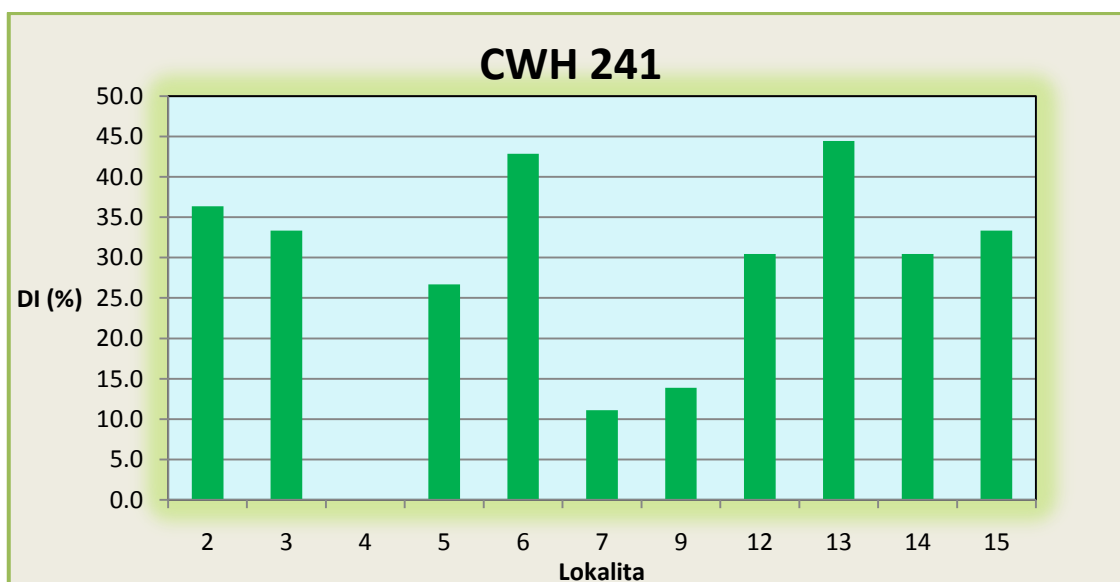
Graf 6. Průměrný index napadení u rezistentních odrůd Mendel a Mendelson na vybraných lokalitách.

V grafu 7 je zobrazen index napadení pro odrůdy CWH 241, RAP 1122, SY Alister a X10W513C. Z grafu je patrné rozsáhlé napadení u odrůdy CWH 241, podrobněji rozebráno

níže, u grafu 8. Odrůda RAP 1122 byla nejvíce napadena na lokalitě 3 (Bílý Kostel nad Nisou), kde hodnota indexu napadení dosáhla 3 %. SY Alister byl napaden na dvou lokalitách a okomentován je u grafu číslo 5. Odrůda X10W513C byla napadena nejvíce na lokalitě 2 (Holany) (tab.1), kde index napadení dosáhl 10,8 %.



Graf 7. Průměrný index napadení u rezistentních odrůd CWH 241, RAP 1122, SY Alister, X10W513C na vybraných lokalitách



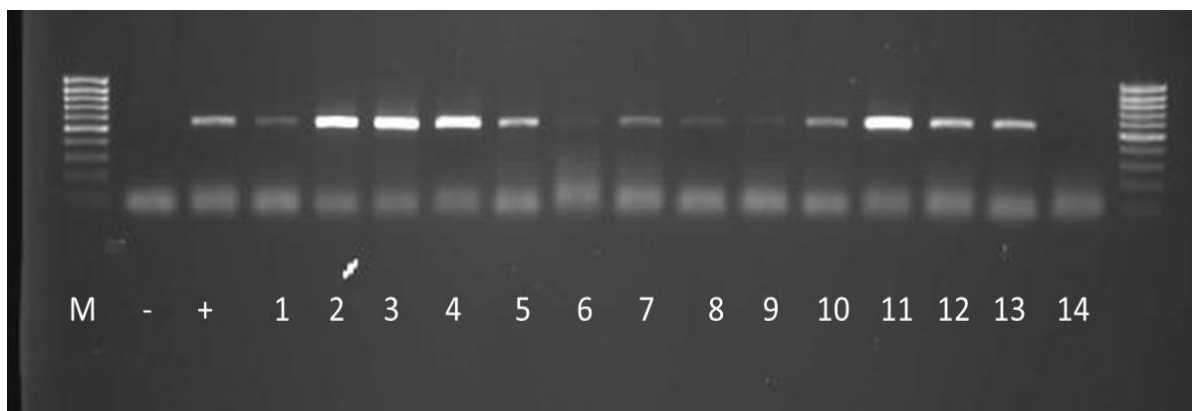
Graf 8. Průměrný index napadení- DI(%) u nejhůře hodnocené rezistentní odrůdy

V grafu 8 je vykreslen index napadení- DI (%) u odrůdy CWH 241, pro jednotlivé lokality. Jak z grafu vyplývá, tato odrůda vykázala nadměrné napadení patogenem *Plasmodiophora*

brassicae. Jedinou lokalitou, kde u rostlin neproběhla infekce je lokalita 4 (Horka u Bakova nad Jizerou). K přípustnému napadení došlo na lokalitě 7 (Kbelnice), kde byl vypočítán index napadení na 11% a lokalitě 9 (Horusice), kde index napadení dosáhl necelých 15%. Obrázky 8- 14 (kapitola 9- Příloha) zobrazují ukázkou napadení jednotlivých odrůd. Na základě těchto obrázků je patrné extrémní napadení kontrolní (Obrázek 8), náchylné odrůdy, následně je patrné napadení na odrůdě CWH 241 (Obrázek 10), která v tomto experimentu nedosáhla dobrých výsledků.

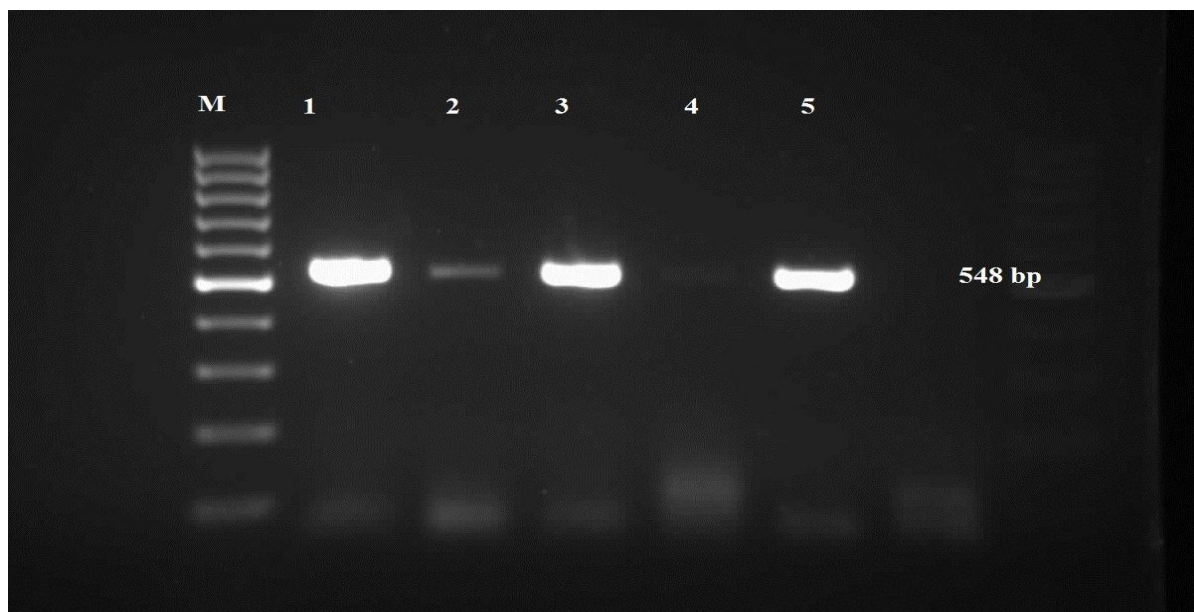
5.4 Detekce *Plasmodiophora brassicae* pomocí sekvence

V rámci studie bylo otestováno 14 vzorků půd testovaných lokalit (tab. 1), odebraných v roce 2013. U těchto vzorků byla izolována DNA, k testování byla použita PCR metoda a následně proběhla vizualizace fragmentů na UV transiluminátoru. Byly použity primery navržené Cao et al. (2007). Jak vyplývá z níže uvedeného elektroforeogramu, z celkem 14 testovaných vzorků půdy, byla přítomnost *Plasmodiophora brassicae* detekována na všech 14 lokalitách. Tyto půdní vzorky byly již dříve použity v pokusu k bakalářské práci Pícha (2014).



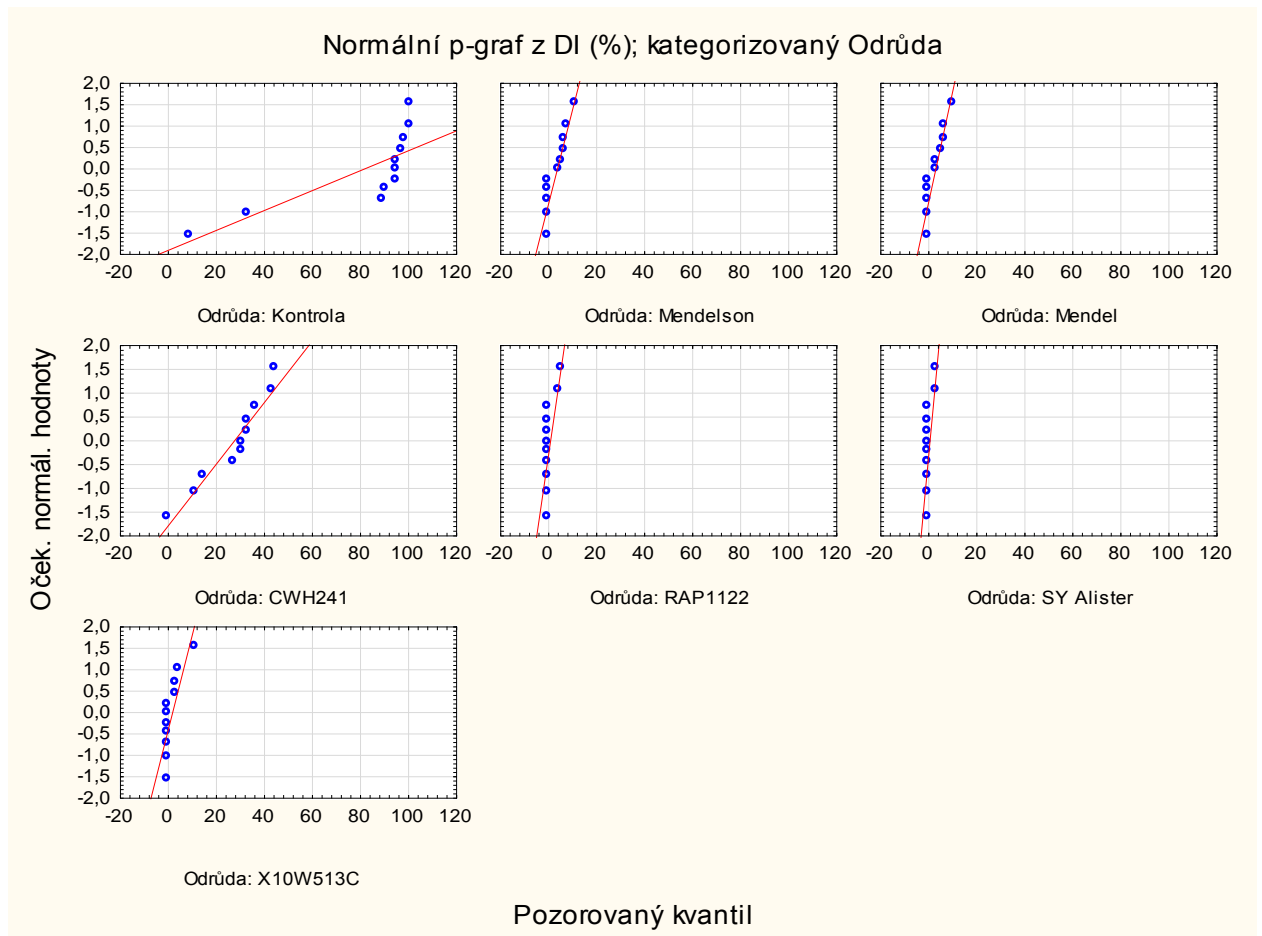
Obrázek 4. Detekce *Plasmodiophora brassicae* z půd odebraných z testovaných lokalit Elektroforeogram PCR produktů po separaci na agarózovém gelu. Použité primery, (-)- negativní kontrola, (+)- pozitivní kontrola, 1- 14 – lokality- pozitivní na přítomnost *Plasmodiophora brassica*

Z kořenů řepky olejky, pěstované v infikované zemině z testovaných lokalit, byla izolována celková DNA pomocí CTAB. K detekci byla využita technika PCR za využití specifických primerů (tab. 3) a vizualizace fragmentů na UV transiluminátoru.. Tato metoda je další detekční metodou využitelnou pro detekci patogena *Plasmodiophora brassicae*.



Obrázek 5. Detekce *Plasmodiophora brassicae* kořenů odebraných z testovaných lokalit Elektroforeogram PCR produktů po separaci na agarózovém gelu. Použité primery, (- Velikost PCR produktu 548 bp; M- marker, 1-3,5 pozitivní na přítomnost *Plasmodiophora brassicae*, 4 negativní vzorek,)

5.5 Statistické vyhodnocení skleníkového pokusu



Graf11. Testování normálního rozložení dat (SW-W- hodnoty Shapiro- Wilkova testu)

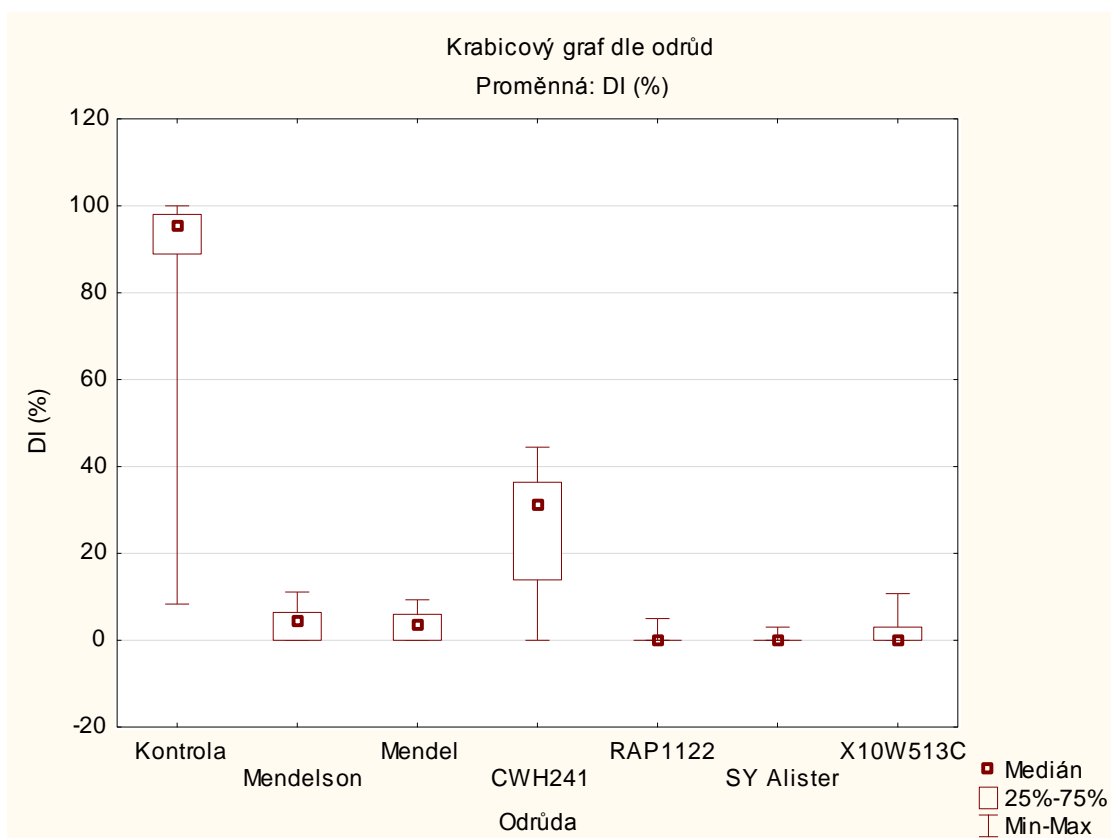
Odrůda: Kontrola DI (%): SW-W = 0,6131; p = 0,00004
 Odrůda: Mendelson DI (%): SW-W = 0,842; p = 0,0335
 Odrůda: Mendel DI (%): SW-W = 0,8427; p = 0,0343
 Odrůda: CWH241 DI (%): SW-W = 0,9142; p = 0,2733
 Odrůda: RAP1122 DI (%): SW-W = 0,5003; p = 0,00000
 Odrůda: SY Alister DI (%): SW-W = 0,4893; p = 0,00000
 Odrůda: X10W513C DI (%): SW-W = 0,6298; p = 0,00006

Pro testování normality byl zvolen Shapiro- Wilkův test. Z grafu i hodnot je patrné, že došlo k porušení předpokladu normality, především kvůli nepatrným rozdílům v hodnotách DI (%) u některých odrůd (Graf 11). Z tohoto důvodu není možné použít ANOVU a proto bylo zvoleno testování její neparametrickou obdobou Kruskal- Wallisův test, díky kterému bylo zjištěno, mezi kterými odrůdami je významný rozdíl. Na základě tohoto vícenásobného porovnání lze říct, že nejlepších výsledků bylo dosaženo u odrůd RAP 1122 a SY Alister. Rozdíl mezi těmito odrůdami není statisticky významný (Tab. 10). Na rozdíl od odrůdy CWH 241, kde došlo ke statisticky významnému rozdílu. Výsledky Kruskal- Wallisova testu lze také graficky, pomocí krabicového grafu, tento graf (Graf 12) znázorňuje medián, dolní a horní

kvantil a rozpětí. Z tohoto grafu je opět patrný nejlepší výsledek u odrůd RAP 1122 a SY Alister, který dosáhl o něco lepších výsledků, kdy hodnota mediánu se rovná nule a rozpětí hodnot, v našem případě hodnot indexu napadení, je úzké.

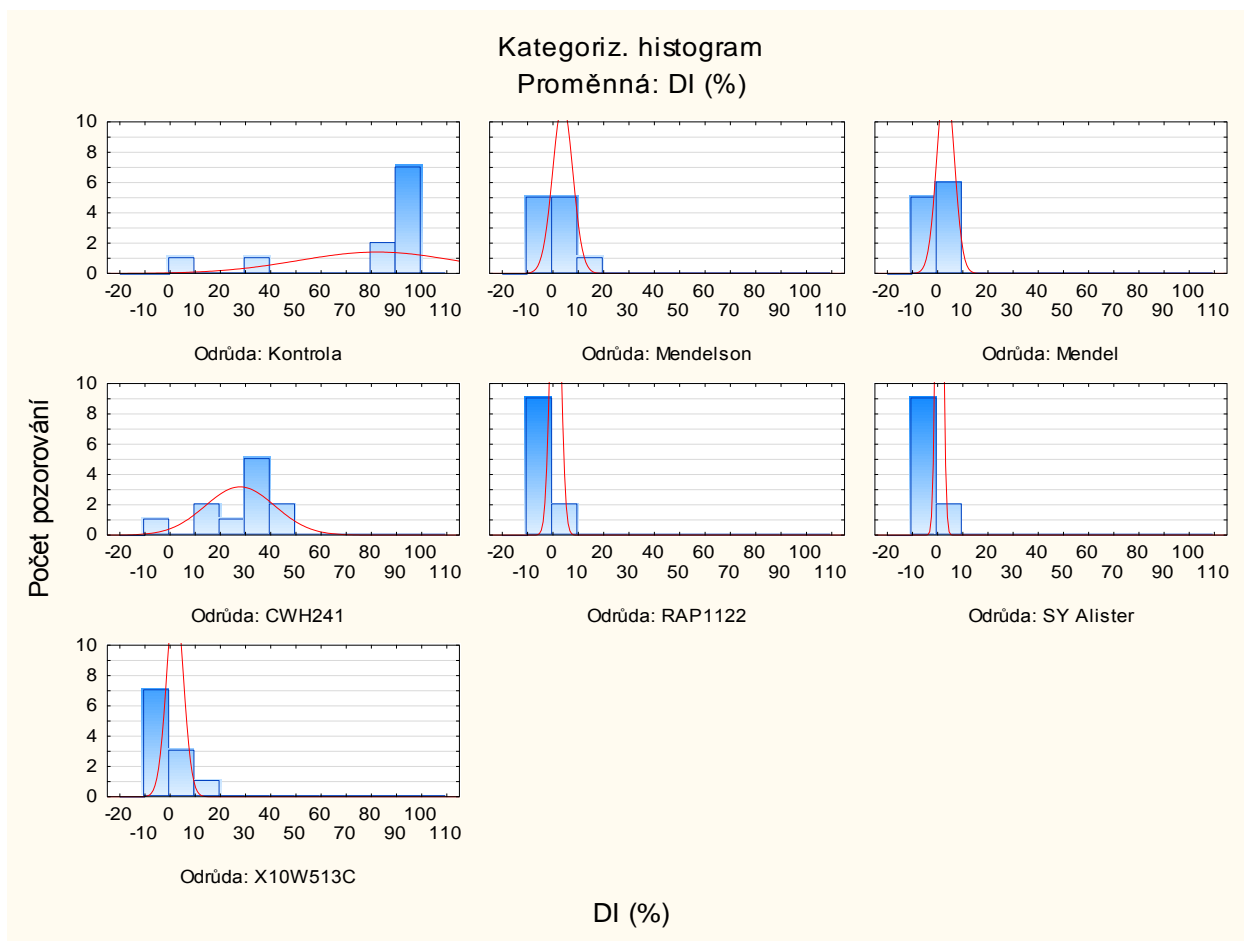
Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); DI (%) (Tabulka vs e)							
Nezávislá (grupovací) proměnná : Odrůda							
Kruskal-Wallisův test: H (6, N= 77) =50,26531 p =0,0001							
Závislá: DI (%)	Kontrola R:70,364	Mendelson R:36,000	Mendel R:33,909	CWH241 R:58,909	RAP1122 R:23,409	SY Alister R:22,500	X10W513C R:27,909
Kontrola		0,006624	0,002786	1,000000	0,000018	0,000011	0,000180
Mendelson	0,006624		1,000000	0,342865	1,000000	1,000000	1,000000
Mendel	0,002786	1,000000		0,184267	1,000000	1,000000	1,000000
CWH241	1,000000	0,342865	0,184267		0,004160	0,002840	0,024262
RAP1122	0,000018	1,000000	1,000000	0,004160		1,000000	1,000000
SY Alister	0,000011	1,000000	1,000000	0,002840	1,000000		1,000000
X10W513C	0,000180	1,000000	1,000000	0,024262	1,000000	1,000000	

Tabulka 10. Kruskal- Wallisův test- porovnání hodnot



Graf 12. Grafické znázornění Kruskal- Wallisova testu

Rozložení hodnot indexu napadení v jednotlivých skupinách lze pomocí kategorizovaného histogramu (Graf 13). Opět se potvrzují nejlepší výsledky u odrůd RAP 1122 a SY Alister.



Graf. 13 Kruskal- Wallisův test- rozložení závislé proměnné

6. DISKUZE

Výskyt *Plasmodiophora brassicae* byla detekována v mírném pásu Evropa, Asie, Amerika (Strelkov et al., 2011), dochází k jejímu šíření i do tropických oblastí- Vietnam, Thajsko, Indonesie (Tanaka, 1996). K masovému šíření došlo roku 2003 v Kanadě (Hwang et al., 2011). První zmínky o tomto onemocnění v českých zemích je datováno roku 1896 z okolí Veselí nad Lužnicí (Chytilová a Dušek, 2007). Do roku 2011 bylo v České republice toto onemocnění problémem převážně zelinářských oblastí, roku 2011 byl zaznamenán nárůst napadení na řepce ozimé (Kazda a kol., 2013), čímž došlo ke zvýšení pozornosti směrem ke zmiňovanému patogenu.

Tento experiment probíhá druhým rokem, výsledky z roku 2013 byly publikovány v bakalářské práci Pícha (2014). Experiment byl v roce 2014 obohacen o lokalitu Hrádek nad Nisou (tab. 1), nicméně byl naopak ochuzený o lokality 8 (Žirovnice), 10 (Hrdějovice Ves), 11 (Velké Bílovice) a v závěru o lokalitu 1 (Modlibohov), u které neproběhla úspěšná infekce.

Součástí experimentu bylo zjištění stupně napadení u odrůd řepky olejky deklarovaných jako rezistentní, které byly pěstovány na infikované zemině z odlišných lokalit. Infikovaná zemina byla použita z oblastí s výskytem patogena *Plasmodiophora brassicae*, kde lze předpokládat, že panují podmínky prostředí příznivé pro rozvoj patogena. Přítomnost patogena byla ověřena přímou detekcí z půdních vzorků. Dále proběhl biologický test, kdy došlo k založení pokusu a následnému vyhodnocení symptomatickou metodou, pomocí stupnice napadení dle Kuginuki et al. (1999). Hlavním cílem této práce bylo zjistit účinnost rezistentních odrůd řepky ozimé v podmínkách České republiky.

6.1 Monitoring patogena *Plasmodiophora brassicae*

Jak vyplývá z literární rešerše, napadení hostitelské rostliny patogenem je ovlivňováno vnějšími podmínkami, jako je teplota půdy, vlhkost a výživný stav rostliny. Ke klíčení trvalých spor dochází v širokém teplotním rozmezí 6-27°C (Gossen et al., 2012), což potvrzuje i Dixon (2009b), který uvádí ideální podmínky pro klíčení 24°C. V našem skleníkovém pokuse, byly teploty ideální pro rozvoj patogena. Dalším důležitým faktorem ovlivňující průběh napadení je hodnota pH půdy, názory na hodnotu optimálního pH se liší, Řičařová a kol. (2013), uvádí optimální hodnotu pH v rozmezí 4,5-6, naopak Dixon (2009a), uvádí optimální hodnotu půdní reakce pro rozvoj patogena v rozmezí 6-6,7, při hodnotách pH nad 6,9 dochází k poklesu životaschopnosti spor. Webster (1986) uvádí pokles indexu

napadení se zvyšujícím se pH, což z výsledků tohoto experimentu nemůžeme potvrdit. U půd použitých v našem experimentu se hodnoty pH pohybovaly v rozmezí 6,4-7,3 a optimálním hodnotám podle Dixona (2009a) se vymykají lokalita 1 (Modlibohov), která byla pro neúspěšnou infekci s pokusu vyřazena a lokalita 2 (Holany). Vezmeme-li v úvahu hodnoty naměřené v našem experimentu, lze potvrdit výsledky Dixona (2009a), kdy pozitivní vliv na šíření spor měla hodnota pH 6,6- 6,8.

U jednotlivých půd, využitých pro skleníkový pokus bylo nutné potvrdit přítomnost patogena, aby byly zajištěny ideální podmínky pro případný vznik infekce. Přítomnost patogena lze zjistit pomocí fluoresenčního mikroskopu (Faggian et al., 1999), nicméně efektivnější metoda je molekulární, kdy dojde k izolaci DNA a její následné použití pro detekci patogena *Plasmodiophora brassicae* pomocí metody PCR (Cao et al., 2007). Výhodou této metody je rychlost, opakovatelnost, nicméně se jedná o metodu finančně náročnou, vyžadující dobré technické zázemí. Pro PCR byly použity primery navržené Cao et al., (2007), pomocí těchto primerů dochází k detekci patogena *Plasmodiophora brassicae*. Přítomnost patogena byla potvrzena na všech lokalitách, tudíž chyby v důsledku použití neinfikované zeminy mohly být vyloučeny.

6.2 Index napadení

6.2.1 Hodnocení odrůd

Tento index udává schopnost odrůdy odolávat nátlaku patogenu. U rezistentních odrůd bývá index napadení do 20 % u náchylných odrůd pak 80- 100 % (Chytilová a Dušek, 2007). U kontroly je index napadení 81,7 % (tab.6), což značí její náchylnost a na zamořeném pozemku by podlehla tlaku patogena, což by vedlo až k zaorání porostu. Výsledky byly porovnány s výsledky v bakalářské práci Pícha (2014). Dále byly hodnoty získané z roku 2014 podrobeny statistickému vyhodnocení, které potvrzuje níže zmiňované výsledky (kapitola 5.5). Tabulka 7, kapitola 9- Příloha zobrazuje podrobný přehled experimentu a porovnání pro rok 2013 a 2014. Pícha (2014), uvádí, že v roce 2013 dosáhly nejlepších výsledků odrůdy RAP 1122 s DI 3,6% a vzápětí s DI 4,5% odrůda SY Alister. Výskyt příznaků se objevil na čtyřech lokalitách. Pro rok 2014 byl výsledek opačný, nejlepšího hodnocení dosáhla odrůda SY Alister s DI 0,5% a na druhém místě RAP 1122 s DI 0,8% (graf 9 a 10., kapitola 9 Příloha), neshodoval se ani výskyt napadení na jednotlivých lokalitách, v roce 2014 došlo k napadení pouze na dvou lokalitách (obr. 5 a 6, kapitola 9. Příloha). Nicméně z výsledků vyplývá souvislost mezi teplotou, vlhkostí a pH půdy. Jednotlivé

odřůdy v roce 2014 vykázaly největší index napadení na lokalitách v Libereckém, nebo Královéhradeckém kraji. Podobných výsledků bylo dosaženo v roce 2013, v těchto lokalitách, jak vyplývá z dat ČHMÚ (tab. 8 a 9, kapitola 9. Příloha), panovaly nadměrné srážky a ideální teploty pro rozvoj patogena. Výsledky jednotlivých let mohou být ovlivněny menším množstvím vzešlých rostlin, a tím menším množstvím rostlinného materiálu, pro hodnocení v roce 2013. Celkem bylo v roce 2014 vyseto 2520 rostlin, počet vzešlých rostlin v době sklizně bylo 2025, což odpovídá 80,3%. V předchozím roce, jak uvádí Pícha (2014) vzešlo z 2940 pouze 1656, což je pouze 56,3%. Nejhorších výsledků v obou letech dosáhla odrůda CWH 241. V roce 2013 byl index napadení 32,1 %, v roce 2014 27,5 %. Podle Chytilová a Dušek (2007) by se dala odrůda, v roce 2014, považovat za rezistentní na lokalitě 7 (Kbelnice), kde byl vypočítán index napadení na 11% a lokalitě 9 (Horusice), kde index napadení dosáhl necelých 15%. Pro uvedené lokality, 4, 7, 9 by se dala, v případě nedostupnosti vhodnější odrůdy, použít odrůda CWH 241.

6.2.2 Hodnocení lokalit

Nejlepších výsledků v rámci lokalit dosáhla lokalita 4 (Horka u Bakova nad Jizerou), Tato lokalita se nachází ve Středočeském kraji, kde z dat ČHMÚ (2015) lze vyčíst podprůměrné srážky a nadprůměrné teploty. Přítomnost patogena v zemině byla potvrzena pomocí metody PCR, lze vyloučit nízký index napadení v důsledku nepřítomnosti patogena. Jak uvádí Prokinová a kol. (2013) pro ideální rozvoj patogena jsou vyšší teploty doprovázené vlhkostí, optimálně 70- 90 % plné vodní kapacity. Nízký index napadení lze odůvodnit, vzhledem k nízkému napadení i náchylné odrůdy, nedostatečnou závlahou a tím nedostatečně příznivých podmínek pro rozvoj onemocnění. Pro ověření lze doporučit ověřit přítomnost patogena pomocí molekulární metody. V tomto směru bohužel nelze porovnat, jak uvádí Pícha (2014), v roce 2013 dosáhla nejlepších výsledků lokalita 11 (Velké Bílovice), která nebyla v roce 2014 součástí experimentu. Nejhorších výsledků dosáhla lokalita 15 (Hrádek nad Nisou) v Libereckém kraji s DI 21,3%, která je podle dat ČHMÚ teplotně i srážkově průměrná (tab. 8 a 9, kapitola 9- Příloha). Obdobných výsledků dosáhly lokality 2, 5 a 6. Nejhuře v roce 2013 dopadla lokalita 9 a obdobných výsledků bylo dosaženo na lokalitách 5 a 6, což se shoduje s výsledky roku 2014.

Jediný zástupce Moravskoslezského kraje, lokalita číslo 13 (Kozmice), která vykázala pozitivní nález pouze na kořenech odrůd Mendel a CWH 241 se tak s indexem napadení 11%, stala v rámci experimentu druhou nejlépe hodnocenou lokalitou. V tomto kraji, v roce 2014 panovaly lehce podprůměrné teploty a srážkově se zařadila mezi oblast nadprůměrnou (tab 8 a

9), což jsou podmínky vhodné pro rozvoj patogena. Což platí pouze pro odrůdu CWH 241, která na této lokalitě dosáhla největších hodnot indexu napadení, 44,4 % a tím získala status odrůdy nevhodné pro použití v dané lokalitě. Rezistence vůči patogenu *Plasmodiophora brassicae*, podle Chytilová a Dušek (2007), byla potvrzena u všech testovaných odrůd, kromě CWH 241, kde došlo k prolomení rezistence. Nejlepší předpoklady na úspěšné uchycení odrůd pro naše podmínky se jeví u odrůd RAP 1122 a SY Alister.

6.3 Detekce *Plasmodiophora brassicae*

Jak uvádí Diederischen (2009) podmínky prostředí nejsou jediným rozhodujícím faktorem pro rozvoj onemocnění, důležitou roli hrají jednotlivé patotypy patogena *Plasmodiophora brassicae*. Šlechtění jednotlivých rezistentních odrůd je zaměřeno proti nejčastěji se vyskytujícím patotypům v dané geografické oblasti (Habibur et al., 2011), tudíž nemusí dosahovat takové účinnosti pro jinou geografickou oblast. Detekce patogena probíhá jednak z půdních vzorků ale také z kořenů, kde může být detekován i přes to, že zatím nedošlo k viditelným projevům napadení. Tyto metody mohou být využity převážně k urychlení experimentu, nicméně se jedná o metodu finančně nákladnou, náročnou na technické vybavení pracoviště.

7. ZÁVĚR

Tento výzkum probíhal druhým rokem a vzhledem k výsledkům, i přes infekci, se většina odrůd v našich podmínkách osvědčily. Z výsledků jsou patrné odlišnosti napadení jednotlivých odrůd na jednotlivých lokalitách, rozdílný stupeň napadení byl očekáván a lze tedy potvrdit hypotézu. Dále došlo k potvrzení korelace mezi rozvojem onemocnění a podmínkami prostředí.

Nicméně musíme vzít v úvahu variabilitu patogena a jeho možnou proměnu v důsledku opakovaného pěstování, kdy může dojít k napadení, jako se tomu stalo u odrůdy Mendel v Německu a Velké Británii. Je třeba se řídit pravidly integrované ochrany při boji s patogenem *Plasmodiophora brassicae*. Je třeba apelovat na pěstitele, aby boj s tímto patogenem zahájili preventivními opatřeními, jako jsou dodržování osevního postupu, správná agrotechnika a v neposlední řadě likvidace brukvovitých plevelů, jakožto hostitelů. Závěrem lze říci, že odrůdy pěstované v zahraničí a vedené jako rezistentní najdou své uplatnění i v podmínkách České republiky.

8. SEZNAM LITERATURY

- Agrios, G. N. 1997. Plant pathology, 4th ed., Academic Press a division of Harcourt and Company, Sand Diego, ISBN 0-12-044564-6, 635 s.
- Arie, T., Namba, S., Yamashita, S., Doi, Y. 1998. Detecton of resting spores of *plasmodiophora brassicae* woron. From soil and root by fluroscent antibody technique. Annals of the Phytopathological Society of Japan. 54(2). 242-245
- Ayers, G. W. 1972. Races of *Plasmodiophora brassicae* infecting crucifer crops in Canada. Canadian Plant Disease Survey. 52. S 77-81.
- Baranyk, P., Fábry, A. 1999. History of the rapeseed (*Brassica napus* L.) growng and breeding from middle age Europe to Canberra. 10th International Rapeseed Congress. Canberra
- Baranyk, P., Ehrenbergrová, M. 2005. Možnosti využitířepky. Sborník – 22. Vyhodnocovací seminář Systém výroby řepky a Systém výroby slunečnice. Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin. Praha. 87- 90
- Baranyk, P. Pěstování a zpracování řepky olejné. Tisková konference „Řepkový olej- olej nad zlato“. 2013. Česká zemědělská univerzita v Praze.
- Bartoš, P. (1979). Ochrana rostlin. Odolnost zemědělských rostlin k chorobám. Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1- 122.
- Bártová, E. 2011. Izolace DNA. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. Fakulta veterinární hygieny a ekologie. Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat. Dostupné z (cit. 7.3.2015) <http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-izolace_dna&lang=cz>
- Bartůňková, J., Paulík, M., Hrušák, O., Smetana, K., Šedivá, A., Špišek, R., Šprongl, L., Vernerová, E. 2011. Vyšetřovací metody v imunologii. 2. Přepřacované a doplněné vydání. Praha. Grada Publishing a.s. 164 s. ISBN: 978-80-247-3533-7
- Bhattacharyya, T. K, Mandal, N. C. 2006. Managment of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) of rapeseed and mustard by Nitrogenous fertilizers. Annals of Plant Protection Sciences. Volume:14, Issue: 1. 260-261
- Bečka, D., Vašák, J., Zukalová, H., Mikšík, V. 2007. Řepka ozimá- Pěstitelský rádce. ČZU v Praze. ISBN 978-80-87111-05-5

- Bečka, D., Šimka, J., Prokinová, E., Mikšík, V., Vašák, J., Zukalová, H. 2013. Řepka ozimá, inovace pěstitelské technologie. ČZU v Praze. ISBN 978-80-213-2382-7
- Bečka, D., Šimka, J., Bokor, P., Prokinová, E., Bečková, L. 2012. Diagnostika hlízenky obecné (*Sclerotinia sclerotiorum*) u řepky ozimé pomocí odběru korunních plátků (Petal test). Prosperující olejniny 2012. Sborník z konference s mezinárodní účastí. ČZU v Praze. ISBN 978- 80- 213-2335- 3
- Buzacki, S. T., Ockendon, J. G., White, J. G. 1974. General studies. Rep Natn Veg Res. STN for 1974. S 113
- Buzacki, S. T, Toxopeus, H., Mattuscha, P., Johnston, G. R., Dixon, G. R., Hobolth, L.A. 1975. Study of physiological specialization in *Plasmodiophora brassicae* proposals for attempted rationalization though an international approach. Transaction of the British Mycological Society, 65: p. 295.303
- Cao, T., Tewari, J., Strelkov, E. S. 2007. Molecular Detection of *Plasmodiophora brassicae* causal agent of clubroot of crucifers, in Plant and Soil. Department of Agricultural, Food and Nutritional Science University of Alberta, Edmonton, AB T6G 2P5, Canada. Plant Dis. 91:80-87
- Cao, T., Rennie, D.C., Manolii, V.P., Hwang, S.F., Falak, I., Strelkov, S.E.: Quantifying resistance to *Plasmodiophora brassicae* in *Brassica* hosts. 2014. Plant Pathology. 63. 715-726.
- Craig, M.A., Dixon, G.R. 1993. The influence of boron on the growth of *Plasmodiophora brassicae* n Summer Cabbage. In: Proceedings crop protection in Northern Britain Scottish Crop Research Institute Dundee, pp 277-282. ISSN 0260-485X
- Černý 2012: Hybridní řepky Dekalb opět o krok vpřed. Úroda 4/12.
- ČHMÚ. 2014. Dostupné z:
<http://portal.chmi.cz/portal/dt?portal_lang=cs&menu=JSPTabContainer/P1_0_Home>
- Devos, S., Vissenberg, K., Verbelen, J.P., Prinsen, E. 2005. Infection of Chinese cabbage by *Plasmodiophora brassicae* leads to stimulation of plant growth: impacts on cell wall metabolism and hormone balance. New Phytol. 166(1): 241-250.
- Diederichsen, E., Frauen, M., Linders, E.G.A., Hatakeyama, K., Hirai, M. 2009. Status and perspectives of clubroot resistance breeding in crucifer crops. Journal of Plant Growth Regulation. Volume 28, Issue 3. 265-281.

- Dixon, G.R.2009. *Plasmodiophora brassicae* in its Environment. Journal of Plant Growth Regulation, vol. 28, issue 3, p212-228. DOI: 10.1007/s00344-009-9098-3. Dostupné z :
- Donald, C., Porter, I.: Integrated control of clubroot. J. Plant Growth Regul. 28: 289-303. Doi: 10.1007/s00344-009-9094-7
- Dreiseitl, A. (2010). Genetická rezistence rostlin a její význam v ochraně před původci chorob. Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o.
- Ernst, T. W., Stanton, D., Rennie, D. C., Falak, I., Hwang, S. F., Strelkov, S. E. 2013. *Plasmodiophora brassicae* resting spore load dynamics in clubroot- resistant canola (*Brassica napus*) cropping systems in Alberta, Canada.
- Fábry, A. 2007. Biologická charakteristika. In Baranyk, P., Fábry, A. (eds) 2007. Řepka- využití, pěstování, ekonomika. Profi Press. Praha. 208 s.
- Faggian, R., Bulman, S. R., Lawrie, A. C., Porter, I. J. 1999. Specific polymerase chain reaction primers for detection of *Plasmodiophora brassicae* in soil and water. Phytopathology. Mya 1999, volume 89, number 5. 392-397
- Faggian, R., Strelkov, S. E. 2009. Detection and Measurement of *Plasmodiophora brassicae*. Journal of Plant Growth Regulation. September 2009. Volume 28, Issue 3, 282-288.
- Friberg, H., Lagerlöf, J., Rämert, B. 2006. Usefulness of nonhost plants in managing *Plasmodiophora brassicae*. Plant Pathology. 55:690-695. Doi: 10.1111/j. 1365- 3059. 2006. 01408.x
- Habibur, R., Shakir, A., Hasan, M. J. 2011. Breeding for clubroot resistant spring canola (*Brassica napus* L.) for the Canadian prairies: Can the European winter canola cv. Mendel be used as a source of resistant? Canada Journal Plant Sci. 91: 447- 458. Doi: 10.4141/CJPS10073
- Hatakeyama, K., Fujimura, M., Ishida, M., Suzuki, T. 2004. New Classification Method for *Plasmodiophora brassicae* Field Isolates in Japan Based on Resistance of F₁ Cultivars of Chinese Cabbage (*Brassica rapa*. L.) to Clubroot. Breeding Science. Japan. 52:197-201
- Hirai, M. 2006. Genetic analysis of clubroot resistance in Brassica crops. Breeding Science. Volume 56, Issue 3. 223-229.

- Howard, R. J., Burke, D. A., Strelkov, D. E., Rennie, D. C., Pugh, C. A., Lisowski, S. L. I, Harding, M. W., Daniels, G. C. 2013. Evaluating methods for cleaning and desinfecting equipment contaminated with clubroot.
- Howard, R. J., Strelkov, S. E. , Harding, M. W. 2010. Clubroot of cruciferous crops- new perspectives on an old disease. *Can J Plant Pathol*, 32 (2010). 43-57.
- Honig, F. 1931. Der Kohlkropferreger (*Plasmodiophora brassicae* Wor.) Eine Monographie. *Gartenbauwissenschaft*, 5: 116-225
- Hwang, S.F., Ahmed, H.U., Zhou, Q., Strelkov, S.E., Gossen, B.D., Peng, G., Turnbull, G.D. 2014. Efficacy of vapam fumigant against clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) of canola. *Plant Pathology*.
- Hwang, S.F., Ahmed, H.U., Zhou, Q., Rashid, A., Strelkov, S.E., Gossen, B.D., Peng, G., Turnbull, G.D. 2013. Effect of susceptible and resistant canola plants on *Plasmodiophora brassicae* resting spore populations in the soil. *Plant Pathology*. 62, 404-412.
- Hwang, S.F., Strelkov, S. E., Feng, J., Gossem, B. D., Howard, R.J. 2012a. *Plasmodiophora brassicae*: a review of an emerging pathogen of the Canadian canola (*Brassica napus*) crop. *Molecular Plant Pathology*. Volume 13, Issue 2. 105-113
- Hwang, S. F., Ahmed, H.U., Zhou, Q., Strelkov, S. E., Gossen, B.D., Peng, G., Turnbull, G. D. 2012b. Assessment of the impact of resistant and susceptible canola on *Plasmodiophora brassicae* inoculum potential. *Plant Pathology* (2012) 61, p. 945-952. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2011.02582.x
- Chytilová, V., Dušek, K. 2007. Metodika testování odolnosti brukvovitých plodin k nádrovitosti. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. ISBN 978-80-87011-23-2
- Ito, S., Maehara, T., Tanaka, S., Kameya-Iwaki, M., Yano, S., Kishi, F. 1997. Cloning of single-copy DNA sequence unique to *Plasmodiophora brassicae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. Volume 50, Issue 5, May 1997. 289-300.
- Ikegami, H., Ito, T., Imuro, Y., Naiki, T. 1981. Growth of *Plasmodiophora brassicae* in the root and callus of Chinese cabbage. In: Talekar NS, Griggs TD (eds) Chinese cabbage. Asian Vegetable Research and Development Center, Taiwan, s 81-90
- Jędryczka, M., Kasprzyk, I., Korbas, M., Jajor, E., Kaczmarek, J. 2014. Infestation of Polish agricultural soils by *Plasmodiophora brassicae* along the Polish- Ukrainian border. *Journal of Plant Protection Research*. Vol. 54 Issue 3, 238,

- Jäschke, D., Dugassa- Gobena, D., Karlovsky, P., Vidal, S., Ludwig- Müller, J. 2010. Suppression of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) development in *Arabidopsis thaliana* by the endophytic fungus *Acermonium alternatum*. Plant Pathology. Volume 59, Issue 1. S 100-111
- Kageyama, K., Asano, T. 2009. Life cycle of *Plasmodiophora brassicae*. J Plant Growth Regul, 28 (2009). 203-221.
- Kammerich, J., Beckmann, S., Scharafat., Ludwig-Muller J. 2014. Suppression of the clubroot pathogen *Plasmodiophora brassicae* by plant growth promoting formulations in roots of two Brassicaceae species. Plant Pathology. 2014.63. 846-857
- Karling, J. S. 1968. The Plasmodiophales: including a complete host index, bibliography, and a description of diseases cause by species of this order. Hafner, New York, s.240
- Kazda, J., Škeřík, J., Baranyk, P., Herda, G., Nerad, D., Volf, M. 2008. Metodika integrované ochrany řepky. Praha: SPZO, 80 s. ISBN 978-80-87065-08-2
- Kazda, J., Mikulka, J., Prokinová, E. 2010. Encyklopedie ochrany rostlin. Profi Press. Praha. 399 s. ISBN 978-80-86726-34-2
- Kopecký, P., Doležalová I., Duchoslav, N., Dušek, K. 2012. Variability in resistance to clubroot in European cauliflower cultivars. Plant Protect. Sci., 48: 156-161.
- Kuginuki, Y., Yoshikawa, H., Hirai, M. 1999. Variation in virulence of *Plasmodiophora brassicae* in Japan tested with clubroot- resistant cultivars of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). European Journal of Plant Pathology 105: 327-332.
- Li, Xing-yu., Yang, Jing-jing., Mao, Zi-chao., Ho, Hon-hing., Wu, Yi-xing., et al. 2014. Enhancement of Biocontrol Activities and cyclic Lipopeptides Production by Chemical Mutagenesis of *Bacillus subtilis* XF-1, a Biocontrol Agent of *Plasmodiophora brassicae* and *Fusarium solani*. Indian Journal of Microbiology 54.4, 2014. 476-479
- Ludwig- Müller, J., Prinsen, E., Rolfe, S. A., Scholes, J. D. 2009. Metabolism and plant hormone action during clubroot disease. J. Plant Growth Regul. 28, s 229-244.
- Ludwig-Müller, J., Jülke, S., Geiss, K., Richter, F., Mithöfer, A., Šola, I., Rusak, G., Bulman, K., Bulman, S. 2014. A novel methyltransferase from the intracellular pathogen *Plasmodiophora brassicae* methylates salicylic acid. Molecular Plant Pathology.

- Martison, Matt. 2014. New clubroot strain found in resistant canola, Growers should be vigilant and use good machinery hygiene. The Mountaineer.
- Mazáková, J., Lebeda, A., Táborský, V. 2006. Protozoa a chromista. Česká fytopatologická společnost. Praha. ISBN 90-803545-1-3.45s
- Monteith, J. 1924. RElation of soil temperature and soil moisture to infection by *Plasmodiophora brassicae*. J.
- Naiki, T., Dixon, G. R. 1987. The effects of chemicals on developmental stages of *Plasmodiophora brassicae* (clubroot). Plant Pathology. 316-327.
- Nečas, O. (2000): Obecná biologie pro lékařské fakulty. HandH, Jinončany. 554s. ISBN 80-86022-46-3
- Ovesná, J., Hodek, j. 2007. Využití AFLP pro genotypizaci rostlin. Metodika pro praxi. Výzkumný ústav rostlinné výroby v. v. i. 21 s. ISBN 978-80- 87011-36-2.
- Peng, G., Lahlali, R., Hwang, S. f., Pageau, D., Hynes, R. K., Mcdonald, M. R., Gossen, B. D., Strelkov, S. E. 2014. Crop rotation, cultivar resistance, and fungicides/biofungicides for managing clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on canola. Can. J. Plant Pathology. Vol. 36, No, S1, s. 99-112, 7.3.2015 dostupné z <<http://dx.doi.org/10.1080/07060661.2013.860398>>
- Pícha, A. 2014. Výskyt a škodlivost *Plasmodiophora brassicae* na ozimé řepce v ČR. Česká zemědělská univerzita. Praha. 55s.
- Piterková, J., Tománková, K., Luhová, L., Petřivalský, M., Peč, P. 2005. Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. Chemické listy 99. 455-466 s
- Piterková, J., Luhová, L., Petřivalský, M. 2008. Signální dráhy oxidu dusnatého v rostlinách. Chemické listy. 102. 410- 416 s
- Prokinová, E. 2000 : Choroby řepky (223-232). In: Vašák, J. a kol (2000) Řepka. Agrospoj, 321s.
- Prokinová, E. 2003. Choroby řepky význam v ČR a ochrana proti nim. Řepka, Mák, Hořčice. Sborník referátů z konference. ČZU v Praze. ISBN 80- 213- 1007- 3
- Prokinová, E., Kazda, J., Grimová, L., Řičařová, V. 2013. Nádorovitost kořenů brukvovitých na řepce ozimé. Agromanuál.
- Rod, J. (1996). Zprávy- původce nádorovitosti brukvovitých plodin. Brno: ÚKZUZ, 37 květen, roč. 1996, zvláštní číslo. s. 45.

- Rod, J. 2012. Atlas chorob škůdců ovoce, zeleniny a okrasných rostlin. 4., doplněné a přepracované vydání Líbeznice. Víkend, 94 s. ISBN 978- 80- 7433- 051- 3
- Rozsypal, S. 2002. Úvod do molekulární biologie. 4 díl. Brno. 1200 s. ISBN 80-902562-4-4.
- Řičařová, V., Kazda, J., Prokinová, E., Grimová, L., Sandhu, S. K., Baranyk, P., Ryšánek, P. 2013. Clubroot on winter rape (*Brassica napus*) in the Czech Republic.
- Siemens, J., Keller, I., Sarx, J., Bulmans, S., In, O., Ludwig- Müller, J. 2006
- Siemens, J., Graf, H., Bulman, S., In, O, Ludwig- Muller, J. 2009. Monitoring expression of selected Plasmodiophora brassicae during clubroot development in *Arabidopsis thaliana*. Plant Pathology, Volume 58, Issue 1 s 130-136
- Slusarenko, A. J., Fraser, R. S. S., van Loon, L. C. 2000. Mechanism of Resistance to Plant Disease, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, ISBN 0-7923-6418-X, 620 s.
- Some, A., Manzanares, M. J., Laurens, F., Baron, F., Thomas, G., Rouxel, F. 1996. Variation for virulence on *Brassica napus* L. amongst *Plasmodiophora brassicae* collections from France and derived single- spore isolates. Plant Pathology. Volume 45, Issue 3, s 432- 439.
- Strelkov, S. E., Manolii, V.P., Cao, T., Xue, S., Hwang, S. F. 2007. Pathotype classification of *Plasmodiophora brassicae* and its occurrence in *Brassica napus* in Alberta, Canada. J. Phytopathol. 155. 706-712.
- Strelkov, S.E., Hwang, S.E., Howard, R.J., Haartman, M., Turkington, T.K. 2011. Progress towards the sustainable management of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) of canola on the Canadian prairies. Prairie Soils and Crops Journal, 4:114-121
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžicková, V., Kopítková. 2008. Metody molekulární biologie. 1. Vydání Brno. 188s. ISBN 978-80-210-3841-7
- Takahashi, K., Yamaguchi, T. 1987. An improved method for estimating the number of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* in soil. Annals of the Phytopathological Society of Japan 53, p 507- 515
- Tommerup, I.C., Ingram, D.S. 1971. Life cycle of *Plasmodiophora brassicae* Woron. In *Brassica* tissue cultures and in intact roots. New Phytol. 70, 327-332
- Toxopeus, H., Janssen A.M.P. 1975. Clubroot resistance in turnip II. The slurry screening method and clubroot races in Netherlands, Euphytica 24. 751-755 doi: 10.1007/BF00132914.

- Toxopeus, H., Dixon, G. R., Mattusch, P. 1986. Physiological specialization in *Plasmodiophora brassicae*: an analysis y international experimentation. Trans, Br. Mycol. Soc. 87, 279- 287.
- Vašák, J., Bečka, D., Mikšík, V., Zupalová, H. 2012. Agrární trh, ozimá řepka pro sklizeň 2013 a změny v pěst. technologii olejky. Prosperující olejniny 2012. Sborník z konference s mezinárodní účastí. ČZU v Praze. ISBN 978-80-213-2335-3
- Vašák, J., Bečka, D., Mikšík, V. 2013. Řešení začínajícího útlumu pěstování ozimé řepky. Prosperující olejniny 2013. Sborník z konference s mezinárodní účastí. ČZU v Praze. ISBN 978-80-213-2420-6
- Věchet, L. 2012. Mechanizmy interakcí hostitel- patogen a základy šlechtění na odolnost. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. ISBN: 978-80-7427-072-7.
- Voorrips, R. E. 1995. *Plasmodiophora brassicae*: aspect of pathogenesis and resistance in Brassica oleracea. Euphytica. Volume 83, Issue 2. S 139- 146.
- Voorrips R. E., Jongerius, M. C., Kanne, H. J. 1997. Mapping of two genes for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in popilation of doubled haploid lines of Brassica oleracea by means of RFLP and AFLP markers. Theoretical an Applied Genetics. Issue 1. 94: 75- 82.
- Webster, M. A. 1986. Ph and nutritional effects on infection by *Plasmodiophora brassicae* wor. And clubroot symptoms. University of Aberdeen. UK. 423s.
- Webster, M. A., Dixon, G. R. 1991. Calcium, pH and inoculum concentration influencing colonization by *Plasmodiophora brassicae*. Mycol. Res. 95: 64-73.
- Wallenhammer, A. C. 1996. Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in spring oilseed rape in central Sweden and factors influencing soil infestation levels. Plant Pathology. 45. S 710:719
- Zuzak, K. A., Hwang, S. F., Turnbull, G. D., Manolii, V., Strelkov, S. E. 2014. The use of Vapam as a soil fumigant for clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) control in *canola*. The American Phytopathological Society. [cit. 2015-04-03] Dostupné z: <http://www.usask.ca/soilscrops/conference-proceedings/2013%20pdf/Day_1_Room%202_Presentations/004-Krista_Zuzak.pdf>
- Anonym 2 .[cit. 2015-03-11] Dostupné z: <<http://www.agrofert.cz/?3246/%D8epka-po-letech-ustoupila-z-poli>>

- Anonym 5 .[cit. 2015-02-12] dostupné z:
<<http://www3.syngenta.com/country/cz/cz/syngenta/pruvodce-produkty/osiva/repka-ozimna/Pages/sy-alister.aspx>>
- Anonym 4.[cit. 2015-02-12] dostupné z:
<<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=1&typ=1&val=60157&ids=106>>
- Anonym 3 [online] .[cit. 2015-03-11] : dostupné z
<<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>>
- Anonym6.[cit. 2015-03-11] : dostupné z::
<<http://www.agriculture.gov.sk.ca/adx/asp/adxGetMedia.aspx?DocID=12453,14667,14661,14613,81,1,Documents&MediaID=15512&Filename=Clubroot+Management+Plan+-+June+2014+-+Printer+Friendly.pdf>>
- Anonym 7 .[cit. 2015-03-13]: dostupné z : <<http://zahradaweb.cz/nadorovitost-brukvovitych/>>
- Anonym 8. [cit. 2015-03-29]: dostupné z :
<http://www.rozhlas.cz/plus/ranniplus/_zprava/repka-olejka-jako-byznys-eu-ustupuje-od-jejeho-pestovani-pro-biopaliva--1465637>

9. SEZNAM PŘÍLOH

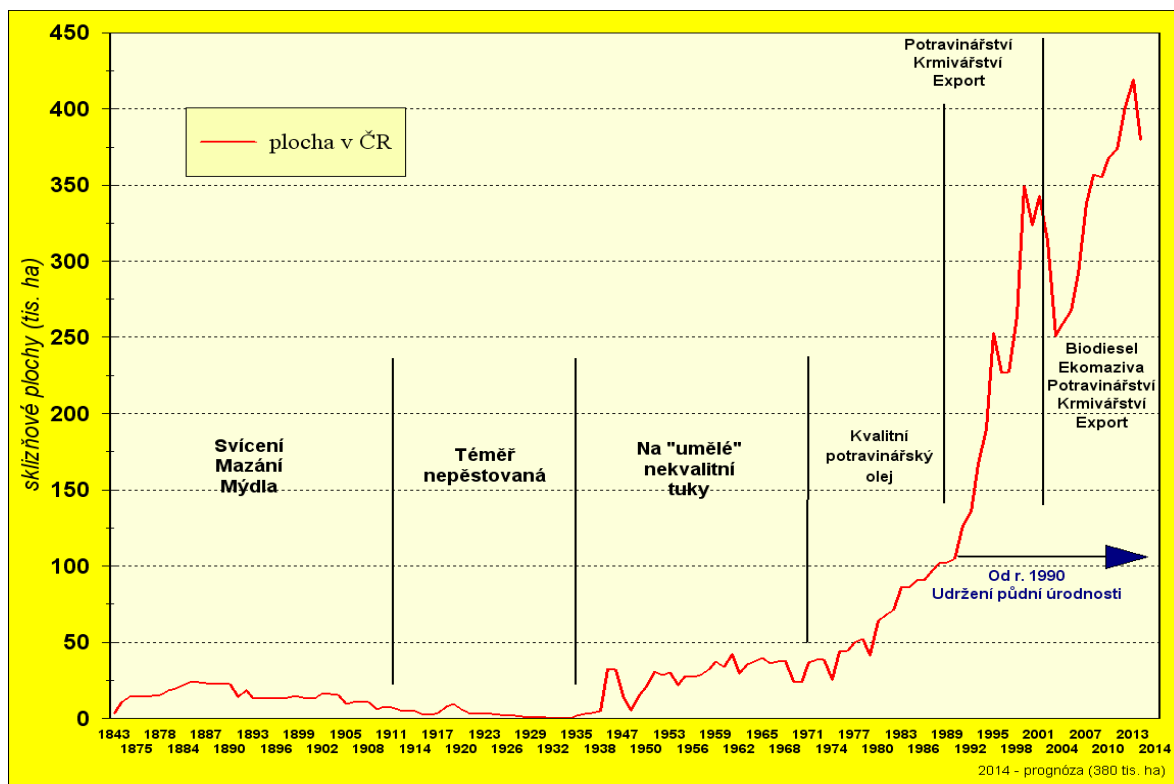
Uvedeno v textu:

- Obrázek 1 : Životní cyklus patogena *Plasmodiophora brassicae*.
- Obrázek 2: Mapa lokalit
- Obrázek 3: Pěstované rostliny řepky ozimé na infikované zemině
- Obrázek 4: Detekce *Plasmodiophora brassicae* z půd odebraných z testovaných lokalit.
- Obrázek 5: Detekce *Plasmodiophora brassicae* z kořenů odebraných z testovaných lokalit.
-
- Tabulka 1: Seznam lokalit pro odběr půdy odebraných v roce 2014.
- Tabulka 2: Rezistentní odrůdy a jejich distributoři.
- Tabulka 3: Použité primery.
- Tabulka 4: Hodnoty pH naměřené na lokalitách.
- Tabulka 6: Průměrný index napadení (DI %) u rezistentních odrůd na vybraných lokalitách.
- Tabulka 10: Kruskal- Wallisův test- porovnání hodnot
-
- Graf 1: Sklizňová plocha řepky olejky v Českých zemích (1843-2013).
- Graf 2: Počet vzrostlých rostlin na lokalitách 2-15.
- Graf 3: Počet napadených lokalit v rámci jednotlivých odrůd.
- Graf 4: Porovnání průměrného indexu napadení- DI (%), mezi kontrolou, RAP1122, SY Alister.
- Graf 5: Průměrný index napadení- DI(%) u nejlépe hodnocené rezistentní odrůdy SY Alister.
- Graf 6: Průměrný index napadení u rezistentních odrůd Mendel a Mendelson na vybraných lokalitách.
- Graf 7: Průměrný index napadení u rezistentních odrůd CWH 241. RAP 1122, SY Alister, X10W513C na vybraných lokalitách.

- Graf 8: Průměrný index napadení- DI(%) u nejhůře hodnocené rezistentní odrůdy.
- Graf 11: Testování normálního rozložení dat (SW-W- hodnoty Shapiro- Wilkova testu)
- Graf 12: Grafické znázornění Kruskal- Wallisova testu

Uvedeno v přílohové části:

- Tabulka 5: Souhrn: počet rostlin, stupeň napadení, index napadení ID (%)
- Tabulka 7: Souhrn: počet rostlin, stupeň napadení, index napadení ID (%) Porovnání rok 2013 a 2014
- Tabulka 8: Srážkové údaje pro rok 2014. (S- úhrn srážek, N- dlouhodobý normál, % - úhrn srážek v normálu)
- Tabulka 9: Teplotní údaje pro rok 2014. (T- teplota, N- dlouhodobý normál 1961-1990, O- odchylka od normálu)
- Graf 9: Index napadení, porovnání odrůdy SY Alister pro rok 2013 a 2014.
- Graf 10: Index napadení, porovnání odrůdy RAP 1122 pro rok 2013 a 2014.
- Obrázek 6: Mapa napadených lokalit, odrůda SY Alister, rok 2013 a 2014
- Obrázek 7: Mapa napadených lokalit, odrůda RAP 1122, rok 2013 a 2014.
- Obrázek 8: Detail nádorů u náchylné odrůdy.
- Obrázek 9: Detail nádorů u odrůdy Mendelson.
- Obrázek 10: Detail nádorů u odrůdy CWH 241.
- Obrázek 11: Detail nádorů u odrůdy Mendel.
- Obrázek 12: Detail nádorů u odrůdy RAP 1122.
- Obrázek 13: Detail nádorů u odrůdy SY Alister.
- Obrázek 14: Detail nádorů u odrůdy X10513C.



Obrázek 1. Sklizňová plocha řepky olejky v Českých zemích (1843-2013) a odhad pro rok 2014

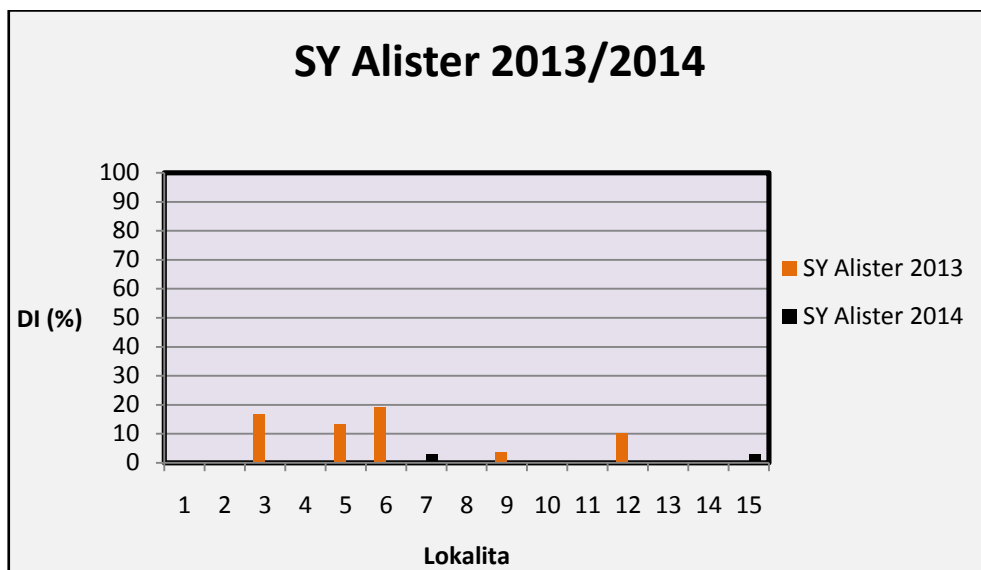
Lokalita	Odruda	n rostlin	Poškození:				ID %
			0	1	2	3	
1	Kontrola Ř	24	24	0	0	0	0,0
1	Mendelson	20	20	0	0	0	0,0
1	Mendel	26	26	0	0	0	0,0
1	CWH 241	32	32	0	0	0	0,0
1	X10W513	31	31	0	0	0	0,0
1	RAP 1122	28	28	0	0	0	0,0
1	Alister	24	24	0	0	0	0,0
2	Kontrola Ř	19	0	0	0	19	100,0
2	Mendelson	24	24	0	0	0	0,0
2	Mendel	30	30	0	0	0	0,0
2	CWH 241	22	14	0	0	8	36,36
2	X10W513	31	27	0	2	2	10,75
2	RAP 1122	32	32	0	0	0	0,0
2	Alister	25	25	0	0	0	0,0

Lokalita	Odrůda	n rostlin	Poškození:				ID %
3	Kontrola Ř	14	0	0	2	12	95,23
3	Mendelson	18	17	0	0	1	5,56
3	Mendel	20	20	0	0	0	0,0
3	CWH 241	18	12	0	0	6	33,33
3	X10W513	25	25	0	0	0	0,0
3	RAP 1122	20	19	0	0	1	5,0
3	Alister	20	20	0	0	0	0,0
4	Kontrola Ř	12	11	0	0	1	8,33
4	Mendelson	27	27	0	0	0	0,0
4	Mendel	30	30	0	0	0	0,0
4	CWH 241	32	32	0	0	0	0,0
4	X10W513	33	33	0	0	0	0,0
4	RAP 1122	37	37	0	0	0	0,0
4	Alister	33	33	0	0	0	0,0
5	Kontrola Ř	18	0	1	1	16	94,44
5	Mendelson	12	10	1	0	1	11,11
5	Mendel	25	22	1	0	2	9,33
5	CWH 241	15	9	2	2	2	26,67
5	X10W513	25	25	0	0	0	0,0
5	RAP 1122	23	22	0	0	1	4,35
5	Alister	12	12	0	0	0	0,0
6	Kontrola Ř	18	0	2	2	14	88,89
6	Mendelson	26	24	0	1	1	6,41
6	Mendel	31	29	0	0	2	6,45
6	CWH 241	21	12	0	0	9	42,85
6	X10W513	29	29	0	0	0	0,0
6	RAP 1122	33	33	0	0	0	0,0
6	Alister	30	30	0	0	0	0,0
7	Kontrola Ř	20	0	2	2	16	90,0
7	Mendelson	32	29	0	2	1	7,29
7	Mendel	20	20	0	0	0	0,0
7	CWH 241	18	16	0	0	2	11,11
7	X10W513	27	25	2	0	0	2,47

Lokalita	Odrůda	n rostlin	Poškození:				ID %
7	RAP1122	27	27	0	0	0	0,0
7	Alister	34	33	0	0	1	2,94
9	Kontrola Ř	17	0	0	1	16	98,03
9	Mendelson	25	25	0	0	0	0,0
9	Mendel	26	26	0	0	0	0,0
9	CWH 241	12	10	0	1	1	13,89
9	X10W513	23	23	0	0	0	0,0
9	RAP 1122	25	25	0	0	0	0,0
9	Alister	25	25	0	0	0	0,0
12	Kontrola Ř	20	0	0	2	18	96,67
12	Mendelson	24	24	0	0	0	0,0
12	Mendel	28	25	1	2	0	5,95
12	CWH 241	23	16	0	0	7	30,43
12	X10W513	33	30	3	0	0	3,03
12	RAP 1122	33	33	0	0	0	0,0
12	Alister	28	28	0	0	0	0,0
13	Kontrola Ř	30	18	1	5	6	32,22
13	Mendelson	25	25	0	0	0	0,0
13	Mendel	34	33	0	0	1	2,94
13	CWH 241	9	5	0	0	4	44,44
13	X10W513	27	27	0	0	0	0,0
13	RAP1122	28	28	0	0	0	0,0
13	Alister	30	30	0	0	0	0,0
14	Kontrola Ř	21	0	0	3	18	95,24
14	Mendelson	24	23	0	0	1	4,17
14	Mendel	25	23	1	0	1	5,33
14	CWH 241	23	16	0	0	7	30,43
14	X10W513	38	30	0	0	0	0,0
14	RAP1122	27	27	0	0	0	0,0
14	Alister	28	28	0	0	0	0,0
15	Kontrola Ř	15	0	0	0	15	100,0
15	Mendelson	22	19	2	1	0	6,06
15	Mendel	23	21	2	0	0	2,9

Lokalita	Odrůda	n rostlin	Poškození:				ID %
15	CWH 241	15	10	0	0	5	33,33
15	X10W	28	27	0	0	1	3,57
15	RAP1122	26	26	0	0	0	0,0
15	Alister	22	21	0	1	0	3,03

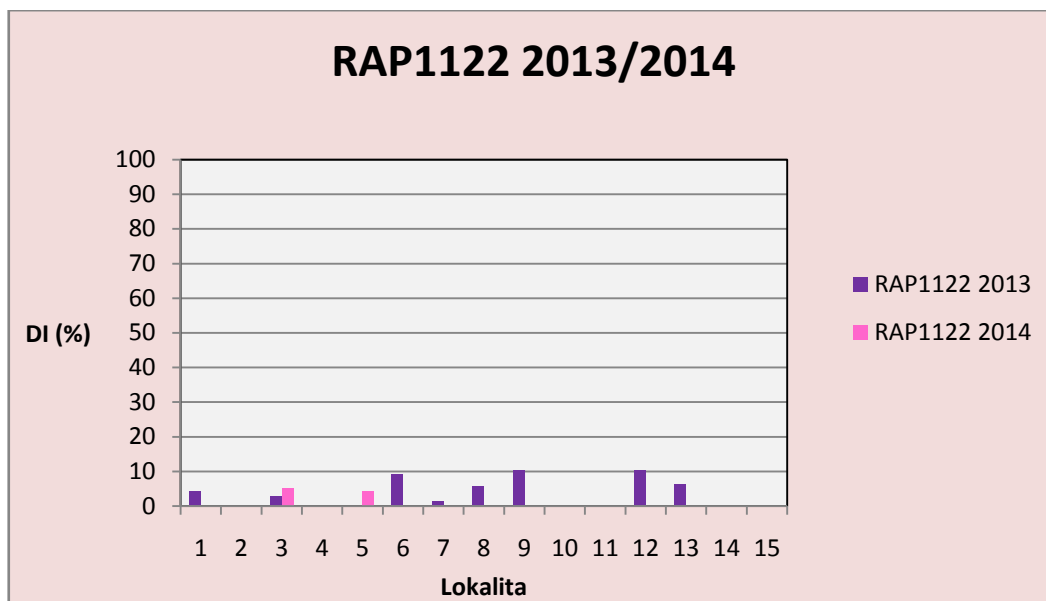
Tabulka 5. Souhrn: počet rostlin, stupeň napadení, index napadení ID (%)



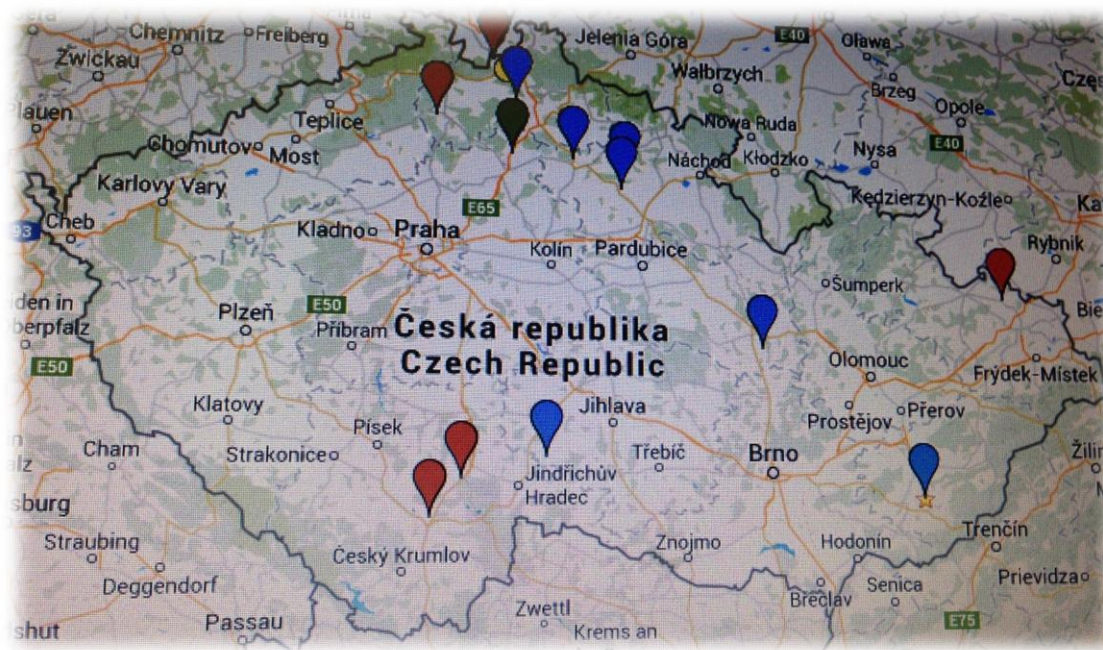
Graf 9. Index napadení, porovnání odrůdy SY Alister pro rok 2013 a 2014 (Pícha, 2014)



Obrázek 6. Mapa napadených lokalit, odrůda SY Alister, rok 2013 a 2014 (červené označení- negativní nález, modré- pozitivní nález rok 2013, zelené- pozitivní nález 2014)



Graf 10. Index napadení, porovnání odrůdy RAP 1122 pro rok 2013 a 2014 (Pícha, 2014)



Obrázek 7. Mapa napadených lokalit, odrůda RAP 1122, rok 2013 a 2014. (červené označení- negativní nález, modré- pozitivní nález v roce 2013, zelené- pozitivní nález v roce 2014, žluté- pozitivní nález oba roky)

Lok	Odrůda	n		Poškození:								DI %	
		rostl.	rostl.	0-13	0-14	1-13	1-14	2-13	2-14	3-13	3-14	2013	2014
1	Kontrola	8	24	2	24	1	0	2	0	3	0	58,33	0
1	Mendelso	16	20	13	20	2	0	0	0	1	0	10,42	0
1	Mendel	17	26	16	26	0	0	0	0	1	0	5,88	0
1	CWH 241	13	32	11	32	2	0	0	0	0	0	5,13	0
1	X10W513	10	31	10	31	0	0	0	0	0	0	0	0
1	RAP 1122	15	28	14	28	0	0	1	0	0	0	4,44	0
1	Alister	16	24	16	24	0	0	0	0	0	0	0	0
2	Kontrola	12	19	0	0	2	0	2	0	8	19	83,3	100
2	Mendelso	25	24	22	24	0	0	0	0	3	0	12	0
2	Mendel	24	30	24	30	0	0	0	0	0	0	0	0
2	CWH 241	13	22	6	14	4	0	0	0	3	8	33,33	36,36
2	X10W513	35	31	34	27	0	0	0	2	1	2	2,86	10,75
2	RAP 1122	21	32	21	32	0	0	0	0	0	0	0	0
2	Alister	20	25	20	25	0	0	0	0	0	0	0	0
3	Kontrola	6	14	0	0	0	0	0	2	6	12	100	95,23
3	Mendelso	11	18	10	17	1	0	0	0	0	1	3,03	5,56
3	Mendel	12	20	8	20	4	0	0	0	0	0	11,11	0
3	CWH 241	5	18	4	12	1	0	0	0	0	6	6,67	33,33
3	X10W513	9	25	8	25	1	0	0	0	0	0	3,7	0
3	RAP 1122	12	20	11	19	1	0	0	0	0	1	2,78	5
3	Alister	6	20	3	20	3	0	0	0	0	0	16,67	0
4	Kontrola	8	12	2	11	0	0	0	0	6	1	75	8,33
4	Mendelso	7	27	5	27	1	0	0	0	1	0	19,05	0
4	Mendel	17	30	13	30	1	0	1	0	1	0	13,73	0
4	CWH 241	17	32	14	32	3	0	0	0	3	0	17,65	0
4	X10W513	8	33	8	33	0	0	0	0	0	0	0	0
4	RAP 1122	6	37	6	37	0	0	0	0	0	0	0	0
4	Alister	6	33	6	33	0	0	0	0	0	0	0	0
5	Kontrola	5	18	0	0	0	1	0	1	5	16	100	94,44
5	Mendelso	13	12	12	10	1	1	0	0	0	1	2,56	11,11

Lok	Odrůda	n rostl.		Poškození:								DI %	
		2013	2014	0-13	0-14	1-13	1-14	2-13	2-14	3-13	3-14	2013	2014
5	Mendel	7	25	4	22	3	1	0	0	0	2	14,29	9,33
5	CWH 241	7	15	0	9	2	2	2	2	3	2	71,43	26,67
5	X10W513	10	25	6	25	4	0	0	0	0	0	13,33	0
5	RAP 1122	13	23	13	22	0	0	0	0	0	1	0	4,35
5	Alister	10	12	6	12	4	0	0	0	0	0	13,33	0
6	Kontrola	10	18	0	0	0	2	0	2	10	14	100	88,89
6	Mendelso	13	26	10	24	0	0	0	1	3	1	23,08	6,41
6	Mendel	12	31	12	29	0	0	0	0	0	2	0	6,45
6	CWH 241	9	21	4	12	2	0	0	0	3	9	40,74	42,85
6	X10W513	8	29	5	29	2	0	1	0	1	0	16,67	0
6	RAP 1122	11	33	8	33	3	0	0	0	1	0	9,09	0
6	Alister	7	30	5	30	1	0	0	0	0	0	19,05	0
7	Kontrola	13	20	0	0	0	2	1	2	12	16	97,44	90,0
7	Mendelso	20	32	20	29	0	0	0	2	0	1	0	7,29
7	Mendel	22	20	21	20	1	0	0	0	0	0	1,52	0
7	CWH 241	11	18	8	16	1	0	0	0	2	2	21,21	11,11
7	X10W513	20	27	18	25	0	2	0	0	2	0	10	2,47
7	RAP 1122	22	27	21	27	1	0	0	0	0	0	1,52	0
7	Alister	20	34	20	33	0	0	0	0	0	1	0	2,94
8	Kontrola	31		0				5		26		94,62	
8	Mendelso	25		14		6		1		4		26,67	
8	Mendel	23		16		6		0		1		13,04	
8	CWH 241	15		6		3		2		4		42,22	
8	X10W513	35		30		3		0		2		8,57	
8	RAP 1122	29		24		5		0		0		5,75	
8	Alister	33		33		0		0		0		0	
9	Kontrola	12	17	0	0	1	0	0	1	11	16	94,44	98,03
9	Mendelso	13	25	5	25	8	0	0	0	0	0	20,51	0
9	Mendel	11	26	5	26	5	0	0	0	1	0	24,24	0
9	CWH 241	5	12	1	10	0	0	0	1	4	1	80	13,89
9	X10W513	17	23	13	23	3	0	0	0	1	0	11,76	0

Lok	Odrůda	n rostl.		Poškození								DI %	
		2013	2014	0-13	0-14	1-13	1-14	2-13	2-14	3-13	3-14	2013	2014
9	RAP 1122	16	25	13	25	2	0	0	0	1	0	10,42	0
9	Alister	18	25	16	25	2	0	0	0	0	0	3,7	0
10	Kontrola	22		0		2		1		20		96,97	
10	Mendelso	22		20		1		0		1		6,06	
10	Mendel	23		22		1		0		0		1,45	
10	CWH 241	21		12		0		1		8		41,27	
10	X10W513	23		19		1		2		1		11,59	
10	RAP 1122	19		19		0		0		0		0	
10	Alister	25		25		0		0		0		0	
11	Kontrola	18		13		5		0		0		9,26	
11	Mendelso	20		19		1		0		0		1,67	
11	Mendel	23		22		1		0		0		1,45	
11	CWH 241	21		18		3		0		0		4,76	
11	X10W513	27		27		0		0		0		0	
11	RAP 1122	24		24		0		0		0		0	
11	Alister	23		23		0		0		0		0	
12	Kontrola	12	20	2	0	1	0	3	2	6	18	69,44	96,67
12	Mendelso	12	24	12	24	0	0	0	0	0	0	0	0
12	Mendel	13	28	13	25	0	1	0	2	0	0	0	5,95
12	CWH 241	8	23	7	16	0	0	0	0	1	7	12,5	30,43
12	X10W513	15	33	15	30	0	3	0	0	0	0	0	3,03
12	RAP 1122	13	33	11	33	1	0	0	0	1	0	10,26	0
12	Alister	13	28	11	28	1	0	0	0	1	0	10,26	0
13	Kontrola	25	30	0	18	0	1	7	5	18	6	90,67	32,22
13	Mendelso	31	25	24	25	0	0	2	0	5	0	20,43	0
13	Mendel	23	34	19	33	2	0	0	0	2	1	11,59	2,94
13	CWH 241	21	9	11	5	4	0	1	0	5	4	33,33	44,44
13	X10W513	26	27	13	27	6	0	2	0	5	0	32,05	0
13	RAP 1122	26	28	23	28	0	0	0	0	1	0	6,41	0
13	Alister	25	30	25	30	2	0	0	0	0	0	0	0
14	Kontrola	13	21	2	0	1	0	1	3	9	18	76,92	95,24

Lok	Odrůda	n rostl.		Poškození								DI %	
		2013	2014	0-13	0-14	1-13	1-14	2-13	2-14	3-13	3-14	2013	2014
14	Mendelso	27	24	25	23	0	0	2	0	0	1	4,94	4,17
14	Mendel	25	25	22	23	1	1	1	0	1	1	8	5,33
14	CWH 241	16	23	9	16	1	0	0	0	6	7	39,58	30,43
14	X10W513	26	38	18	30	2	0	1	0	5	0	24,36	0,0
14	RAP	30	27	30	27	0	0	0	0	0	0	0	0,0
14	Alister	24	28	24	28	0	0	0	0	0	0	0	0,0
15	Kontrola		15		0		0		0		15		100,0
15	Mendelson		22		19		2		1		0		6,06
15	Mendel		23		21		2		0		0		2,9
15	CWH 241		15		10		0		0		5		33,33
15	X10W513		28		27		0		0		1		3,57
15	RAP 1122		26		26		0		0		0		0,0
15	Alister		22		21		0		1		0		3,03

Tabulka 7. Souhrn: počet rostlin, stupeň napadení, index napadení ID (%) Porovnání rok 2013 a 2014 (n- počet rostlin, lok- lokalita, DI- index napadení)

Kraj		Měsíc												Rok
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	
Česká republika	S	27	10	32	39	111	38	102	91	96	49	23	39	657
	N	42	38	40	47	74	84	79	78	52	42	49	48	674
	%	64	26	80	82	150	45	129	117	185	116	46	80	97
Praha a Středočeský	S	25	2	36	33	121	27	94	64	85	51	18	31	587
	N	32	30	36	43	70	75	72	73	46	36	40	35	590
	%	78	7	100	77	173	36	131	88	185	142	45	89	99
Jihočeský	S	26	7	30	35	126	33	120	104	93	53	17	32	676
	N	34	33	39	49	75	94	83	82	51	37	43	39	659
	%	238	148	82	37	161	200	53	111	94	116	74	36	115
Liberecký	S	29	6	54	49	117	35	110	69	81	55	14	64	683
	N	69	54	56	56	79	83	89	89	66	61	71	84	860

	%	42	11	96	88	148	42	124	78	123	90	20	76	79
Královéhradecký	S	30	5	49	37	116	39	77	68	78	43	16	49	607
	N	60	47	49	48	76	86	83	84	60	52	62	70	774
	%	50	11	100	77	153	45	93	81	130	83	26	70	78
Pardubický	S	26	8	49	44	110	43	96	93	103	33	18	45	668
	N	47	40	42	46	77	87	82	84	56	45	52	54	711
	%	55	20	117	96	143	49	117	111	184	73	35	83	94
Vysočina	S	26	12	36	33	116	35	90	104	112	34	27	35	660
	N	42	37	37	42	76	82	75	75	49	37	45	43	644
	%	62	32	97	79	153	43	120	139	229	92	60	81	102
Zlínský	S	34	32	25	57	96	49	118	99	109	57	37	45	758
	N	47	46	44	56	82	102	89	83	58	50	64	60	786
	%	72	70	57	102	117	48	133	119	188	114	58	75	96
Moravskoslezský	S	31	20	35	58	142	76	108	113	105	55	35	36	814
	N	42	44	43	59	94	108	105	98	63	50	58	52	816
	%	74	45	81	98	151	70	103	115	167	110	60	69	100

Tabulka 8. Srážkové údaje pro rok 2014. (S- úhrn srážek, N- dlouhodobý normál, % - úhrn srážek v normálu) (ČHMÚ, 2014)

Kraj		Měsíc												Rok
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	
Česká republika	T	0,5	2,1	6,2	9,8	12,1	16,0	19,2	15,7	14,1	10,0	6,0	1,6	9,4
	N	-2,8	-1,1	2,5	7,3	12,3	15,5	16,9	16,4	12,8	8,0	2,7	-1,0	7,5
	O	3,3	3,2	3,7	2,5	-0,2	0,5	2,3	-0,7	1,3	2,0	3,3	2,6	1,9
Praha a Středočeský	T	1,1	2,7	6,9	10,6	12,6	16,7	20,1	16,6	14,7	10,6	6,4	2,5	10,2
	N	-2,0	-0,4	3,4	8,1	13,0	16,3	17,8	17,2	13,6	8,6	3,3	-0,2	8,2
	O	3,1	3,1	3,5	2,5	-0,4	0,4	2,3	-0,6	1,1	2,0	3,1	2,7	2,0
Jihočeský	T	0,4	1,3	5,4	9,0	11,3	15,7	18,3	15,0	13,3	9,8	5,3	1,5	8,9

	N	-2,8	-1,3	2,3	6,9	11,8	15,1	16,7	16,0	12,5	7,5	2,4	-1,2	7,1
	O	3,2	2,6	3,1	2,1	-0,5	0,6	1,6	-1,0	0,8	2,3	2,9	2,7	1,8
Liberecký	T	0,1	1,8	5,5	9,1	11,4	14,9	18,7	15,2	13,6	9,9	6,0	1,2	9,0
	N	-3,3	-1,9	1,4	5,8	11,1	14,3	15,7	15,2	11,6	7,3	2,1	-1,6	6,4
	O	3,4	3,7	4,1	3,3	0,3	0,6	3,0	0,0	2,0	2,6	3,9	2,8	2,6
Králové- hradecký	T	0,5	2,2	6,1	9,7	12,1	15,7	19,6	15,8	14,2	9,9	6,4	1,4	9,5
	N	-3,2	-1,6	1,9	6,6	11,8	14,9	16,1	15,8	12,3	7,8	2,4	-1,4	6,9
	O	3,7	3,8	4,2	3,1	0,3	0,8	3,5	0,0	1,9	2,1	4,0	2,8	2,6
Pardubic ký	T	0,5	2,2	6,3	9,7	12,2	15,9	19,5	16,0	14,2	9,8	6,4	1,5	9,5
	N	-3,1	-1,4	2,2	7,1	12,2	15,3	16,6	16,3	12,7	8,0	2,5	-1,3	7,2
	O	3,6	3,6	4,1	2,6	0,0	0,6	2,9	-0,3	1,5	1,8	3,9	2,8	2,3
Vysočina	T	0,0	1,4	6,0	9,3	11,6	15,8	18,9	15,4	13,6	9,6	5,6	1,1	9,0
	N	-3,3	-1,5	2,1	7,0	12,0	15,2	16,7	16,2	12,6	7,7	2,3	-1,5	7,2
	O	3,3	2,9	3,9	2,3	-0,4	0,6	2,2	-0,8	1,0	1,9	3,3	2,6	1,8
Zlínský	T	1,0	3,3	6,6	9,7	12,7	16,3	19,4	16,3	14,4	10,1	7,0	1,4	9,9
	N	-2,5	-0,5	3,3	8,2	13,1	16,1	17,4	17,0	13,4	8,7	3,5	-0,6	8,1
	O	3,5	3,8	3,3	1,5	-0,4	0,2	2,0	-0,7	1,0	1,4	3,5	2,0	1,8
Moravsko - slezský	T	0,0	2,9	6,0	9,3	12,1	15,4	19,0	15,8	14,0	9,7	6,2	0,9	9,3
	N	-3,2	-1,7	1,9	6,7	11,9	15,0	16,3	15,9	12,5	8,0	2,7	-1,4	7,0
	O	3,2	4,6	4,1	2,6	0,2	0,4	2,7	-0,1	1,5	1,7	3,5	2,3	2,3

Tabulka9. Teplotní údaje pro rok 2014. (T- teplota, N- dlouhodobý normál 1961-1990, O- odchylka od normálu) (ČHMÚ,2014)



Obrázek 8. Detail nádorů náchylné odrůdy. Foto: Veronika Řičařová (2014)



Obrázek 9. Detail napadení u odrůdy Mendelson. Foto: Veronika Řičařová (2014)



Obrázek 10. Detail napadení u odrůdy CWH 241. Foto: Veronika Řičařová (2014)



Obrázek 11. Detail napadení u odrůdy Mendel Foto: Veronika Řičařová (2014)



Obrázek 12. Detail napadení u odrůdy RAP1122. Foto: Veronika Řičařová (2014)



Obrázek 13. Detail napadení u odrůdy SY Alister. Foto: Veronika Řičařová (2014)



Obrázek 14. Detail napadení u odrůdy X10W513C. Foto: Veronika Řičařová (2014)