

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2014**

**Iveta Bělicová**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Studium účinků fungicidů vůči padlí čekankovému**  
**(*Golovinomyces cichoracearum*)**

**Bakalářská práce**

**Iveta Bělicová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Vedoucí práce: doc. RNDr. Barbora Mieslerová, Ph.D.**

**Olomouc 2014**

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Barbory Mieslerové, Ph.D., za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Iveta Bělicová

**Poděkování:**

Děkuji doc. RNDr. Barboře Mieslerové, Ph.D. za odborné vedení, užitečné rady a trpělivost při tvorbě bakalářské práce. Dále děkuji paní D. Vondrákové a V. Zoubkové za pomoc při pěstování pokusných rostlin a celému fytopatologickému oddělení Katedry botaniky PřF UP za vstřícnost a ochotu vždy pomoci.

## SOUHRN

V teoretické části bakalářské práce byla zpracována literární rešerše, jíž tvoří dvě části. V první z nich je popisován původce padlí čekankového, patogen *Golovinomyces cichoracearum*. Jednotlivé kapitoly jsou věnovány jeho taxonomickému zařazení, morfologii, příznakům napadení, životnímu cyklu a vlivu vnějších podmínek na něj, geografické distribuci a okruhu hostitelů. Důraz byl kladen především na interakce mezi *Golovinomyces cichoracearum* a *Lactuca* spp. Druhá část literárního přehledu je věnována fungicidním přípravkům, jejich historii, popisu, mechanismům účinku a především pak rezistenci patogenů vůči nim.

V experimentální části byla ověřována vhodnost použití modifikované metody listových disků pro studium účinků fungicidů prostřednictvím stanovení účinnosti 6 vybraných fungicidních přípravků vůči jednomu izolátu *Golovinomyces cichoracearum* na *Lactuca serriola*. Tato metoda byla doplněna modifikovaným skleníkovým (polním) pokusem a výsledky obou metod byly srovnány. Po aplikaci fungicidů byl také mikroskopicky sledován vývoj patogena.

Pomocí výše zmíněných metod tak byly vůči testovanému izolátu stanoveny jako vysoce efektivní přípravky Talent (účinná látka myclobutanil), Topas 100 EC (ú. l. penconazol) a Score 250 EC (difenoconazol). Sníženou účinnost vykazovaly přípravky Kumulus WG (ú. l. síra) a Ortiva (ú. l. azoxystrobin). Jako zcela neúčinný se pak ukázal přípravek Bioan (ú. l. lecitin a albumin + mléčný kasein).

## SUMMARY

In the theoretical part of the thesis was compiled literature review, which consists of two parts. In the first of these is described pathogen *Golovinomyces cichoracearum* which causes lettuce powdery mildew. Chapters are focused on the taxonomic classification, morphology, symptoms of the infection, life cycle and impact of external conditions on it, geographical distribution and host range. Emphasis was placed on the interactions between *Golovinomyces cichoracearum* and *Lactuca* spp. The second part of the literature review is focused on fungicidal products, their history, description, mode of action and especially resistance of pathogens against them.

In the experimental part there was verified suitability of using modified leaf disc bioassay to study effects of fungicides through determination the efficacy of 6 selected fungicides against one isolate of *Golovinomyces cichoracearum* on *Lactuca serriola*. This method was supplemented by a modified greenhouse (field) experiment and the results of both methods were compared. After application of fungicides was also microscopically observed development of the pathogen.

With using the above mentioned methods were the products Talent (active substance myclobutanil), Topas 100 EC (a. s. penconazole) and Score 250 EC (a. s. difenoconazole) against the tested isolate as highly effective identified. Reduced efficacy showed the products Kumulus WG (a. s. sulphur) and Ortiva (a. s. azoxystrobin). The product Bioan (a. s. lecithin and albumine + milk casein) was found as totally ineffective.

# OBSAH

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| 1         | ÚVOD.....   | 9  |
| 2         | CÍLE PRÁCE.....   | 10 |
| 3         | LITERÁRNÍ REŠERŠE .....   | 11 |
| 3.1       | Charakteristika patogena – <i>Golovinomyces cichoracearum</i> (DC.) VP<br>Gelyuta ..... | 11 |
| 3.1.1     | Taxonomie řádu Erysiphales a zařazení <i>Golovinomyces cichoracearum</i> .....          | 11 |
| 3.1.2     | Morfologická charakteristika patogena .....   | 12 |
| 3.1.3     | Příznaky napadení.....  | 13 |
| 3.1.4     | Životní cyklus a epidemiologie.....   | 13 |
| 3.1.5     | Vliv vnějších faktorů na rozvoj patogena.....   | 14 |
| 3.1.6     | Geografická distribuce a okruh hostitelů.....   | 15 |
| 3.1.7     | Výskyt a geografická distribuce <i>G. cichoracearum</i> na <i>Lactuca</i> spp. ....     | 16 |
| 3.1.8     | Variabilita interakcí mezi <i>G. cichoracearum</i> a <i>Lactuca</i> spp. ....           | 17 |
| 3.1.9     | Rezistence <i>Lactuca</i> spp. vůči <i>Golovinomyces cichoracearum</i> .....            | 19 |
| 3.2       | Chemická kontrola padlí.....  | 19 |
| 3.2.1     | Historie fungicidních přípravků.....  | 20 |
| 3.2.2     | Rozdělení fungicidních přípravků podle místa účinku .....                               | 21 |
| 3.2.2.1   | Kontaktní fungicidy.....  | 21 |
| 3.2.2.2   | Systémové fungicidy .....   | 21 |
| 3.2.3     | Přípravky používané vůči padlí .....  | 22 |
| 3.2.3.1   | Mechanismus účinku vybraných skupin fungicidů.....                                      | 22 |
| 3.2.3.2   | Studium účinku fungicidů vůči <i>Golovinomyces cichoracearum</i> .....                  | 23 |
| 3.2.4     | Rezistence vůči fungicidům .....  | 24 |
| 3.2.4.1   | Typy rezistence .....   | 25 |
| 3.2.4.1.1 | Kvalitativní rezistence.....  | 25 |
| 3.2.4.1.2 | Kvantitativní rezistence .....  | 25 |
| 3.2.4.1.3 | Křížová rezistence .....  | 25 |
| 3.2.4.1.4 | Mnohonásobná rezistence.....  | 26 |
| 3.2.4.2   | Molekulární mechanismy vzniku rezistence .....  | 26 |
| 3.2.4.2.1 | Molekulární mechanismy vzniku rezistence u vybraných skupin<br>fungicidů .....          | 26 |
| 3.2.4.3   | Vznik rezistence u celosvětově používaných fungicidů vůči padlí<br>tykvovitých .....    | 27 |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| 3.2.4.3.1 | Benzimidazolová skupina fungicidů .....  | 27 |
| 3.2.4.3.2 | DMI fungicidy .....  | 27 |
| 3.2.4.3.3 | QoI fungicidy .....  | 28 |
| 3.2.4.3.4 | Carboximidy .....  | 28 |
| 3.2.4.3.5 | Quinoliny .....  | 29 |
| 4         | MATERIÁL A METODY .....  | 30 |
| 4.1       | Rostlinný materiál .....   | 30 |
| 4.2       | Původ, charakteristika a uchovávání izolátu <i>Golovinomyces cichoracearum</i> .....   | 30 |
| 4.3       | Charakteristika použitých fungicidních přípravků .....   | 30 |
| 4.4       | Modifikovaná metoda listových disků .....  | 31 |
| 4.4.1     | Hodnocení intenzity sporulace .....  | 32 |
| 4.5       | Modifikovaný skleníkový (polní) pokus .....  | 33 |
| 4.5.1     | Hodnocení účinnosti fungicidů při modifikovaném skleníkovém (polním) pokusu .....  | 34 |
| 4.6       | Mikroskopické sledování vývoje <i>Golovinomyces cichoracearum</i> po aplikaci fungicidů .....                                | 35 |
| 5         | VÝSLEDKY .....   | 36 |
| 5.1       | Účinnost testovaných fungicidů vůči <i>Golovinomyces cichoracearum</i> GC 1/11 – modifikovaná metoda listových disků .....   | 36 |
| 5.2       | Účinnost testovaných fungicidů vůči <i>Golovinomyces cichoracearum</i> GC 1/11 – modifikovaný skleníkový (polní) pokus ..... | 41 |
| 5.3       | Mikroskopické sledování vývoje <i>Golovinomyces cichoracearum</i> po aplikaci .....  | 42 |
| 5.3.1     | Klíčivost patogena .....   | 42 |
| 5.3.2     | Počet klíčnicích vláken na konidiích .....   | 43 |
| 5.3.3     | Sporulace .....  | 44 |
| 6         | DISKUZE .....  | 45 |
| 7         | ZÁVĚR .....  | 48 |
| 8         | PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY .....   | 49 |
| 9         | PŘÍLOHA .....  | 57 |



# 1 ÚVOD

Jako téma bakalářské práce jsem si zvolila studium účinků fungicidů vůči padlí čekankovému (*Golovinomyces cichoracearum*).

*G. cichoracearum* je celosvětově rozšířený patogen (Braun, 1995), který napadá nadzemní části rostliny, především listy, a tak značně negativně ovlivňuje stav hostitelské rostliny, což v případě ekonomicky významných plodin vede k finančním ztrátám zemědělců. Je proto nezbytné hledat prostředky k ochraně pěstovaných rostlin. Stěžejní význam v tomto směru mají fungicidy. Ošetření plodin chemickými přípravky proti houbovým chorobám dnes patří k běžným agrotechnickým opatřením.

Ani fungicidy však neposkytují vždy spolehlivou ochranu. Ve světě (McGrath, 2001) i v České republice (např. Sedláková a Lebeda, 2008) byla zaznamenána rezistence některých druhů padlí k významným fungicidním přípravkům. Studium účinnosti fungicidů má tak zcela praktický význam, kdy napomáhá k vyloučení neúčinných přípravků, což vede k omezení vzniku rezistentních kmenů, a tak potažmo snížení ekonomických nákladů pěstitelů.

V teoretické části předložené bakalářské práce jsou shrnuty poznatky o původci padlí čekankového, patogenu *Golovinomyces cichoracearum*, fungicidních přípravcích a rezistenci vůči nim.

Ekonomicky nejvýznamnějším hostitelem *G. cichoracearum* jsou zástupci rodu *Lactuca* (Lebeda, 1994). V České republice však dosud nebyla účinnost fungicidů vůči *G. cichoracearum* na tomto rodu testována. Stěžejní oddíl experimentální části proto tvoří modifikovaná metoda listových disků. V předložené práci byla ověřována vhodnost této metody pro studium účinnosti fungicidů vůči *G. cichoracearum* právě na zástupci rodu *Lactuca*, konkrétně *L. serriola*. Výsledky byly srovnány s daty získanými prostřednictvím další metody, pomocí které je možné sledovat účinnost fungicidů, a to modifikovaného skleníkového (polního) pokusu. Experimenty byly doplněny také o mikroskopické sledování vývoje patogena po aplikaci fungicidů.

## 2 CÍLE PRÁCE

- rešerše na téma původce padlí čekankového – patogen *Golovinomyces cichoracearum*
- rešerše na téma fungicidní přípravky
- optimalizace a ověření vhodnosti použití modifikované metody listových disků pro studium účinnosti fungicidů vůči *Golovinomyces cichoracearum* na *Lactuca serriola*
- testování účinnosti fungicidních postřiků vůči *G. cichoracearum* na rostlinách *L. serriola* ve skleníku a srovnání výsledků s modifikovanou metodou listových disků
- mikroskopické sledování vývoje *G. cichoracearum* na *L. serriola* po aplikaci fungicidů

### 3 LITERÁRNÍ REŠERŠE

#### 3.1 Charakteristika patogena – *Golovinomyces cichoracearum* (DC.) VP Gelyuta

##### 3.1.1 Taxonomie řádu *Erysiphales* a zařazení *Golovinomyces cichoracearum*

V současné době je řád *Erysiphales* zařazován následovně (Wang et al., 2006):

Oddělení: *Ascomycota*

Pododdělení: *Pezizomycotina*

Třída: *Leotiomycetes*

Řád: *Erysiphales*

Čeleď: *Erysiphaceae*

Po mnoho let byla taxonomie padlí založena v první řadě na charakteristice teleomorf, především pak na počtu a tvaru přívěsků (apendixů) na chasmotheciu (syn. kleistotheciu). Výsledky pozorování pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) (Cook et al., 1997) a molekulárních studií (Takamatsu et al. 1998; Saenz a Taylor 1999a; Mori et al., 2000) však ukázaly, že pro taxonomii nabývá na významu stadium anamorfní, neboť teleomorfní znaky se mohly v rámci evoluce vyvinout postupně. Na základě získaných dat byla pro čeleď *Erysiphaceae* navržena tato klasifikace (Braun et al., 2002):

1. tribus *Erysipheae* - zahrnující rody *Brasiliomyces*, *Erysiphe*, *Microsphaera*,  
*Uncinula*, *Typhulochaeta*
2. tribus *Golovinomyceteae*
  - a) subtribus *Golovinomycetinae* - *Golovinomyces*
  - b) subtribus *Neoerysiphinae* - *Neoerysiphe*
  - c) subtribus *Arthrocladiellinae* - *Arthrocladiella*
3. tribus *Cystotheceae*
  - a) subtribus *Cystotheceae* - *Cystotheca*, *Podosphaera*, *Sphaerotheca*
  - b) subtribus *Sawadaeinae* - *Sawadeae*
4. tribus *Phyllactinieae* - *Leveillula*, *Phyllactinia*, *Pleochaeta*
5. tribus *Blumerieae* - *Blumeria*

Změny provedené v posledních letech v systematickém členění řádu *Erysiphales* (Braun et al., 2002) vedly k přejmenování některých druhů, např. druh *Erysiphe*

*cichoracearum* resp. *E. orontii* je nově uváděn jako *Golovinomyces cichoracearum* (DC.) V. P. Gelyuta.

Rod *Golovinomyces* náleží ke tribu *Golovinomyceteae*, který je považován na základě molekulární fylogenetické analýzy za skupinu hub odvozenou z jednoho společného předka. Monofylie kmene je podporována množstvím společných znaků, jako je ektofytický parazitismus, anamorfa typu *Euiodium* atd. (Matsuda a Takamatsu, 2003)

### 3.1.2 Morfologická charakteristika patogena

*Golovinomyces cichoracearum* je obligátní parazit, který pokrývá povrch svého hostitele bělavým myceliem, jež je hyalinní, septální a tenkostěnné. Hyfy mohou být jak rovné, tak zakřivené. Buňky hyf jsou jednojaderné, vakuolizované a dosahují šířky 4 – 8  $\mu\text{m}$  a délky 40 – 90  $\mu\text{m}$  (Braun, 1995). Na klíčnicích vláknecích a jako boční výrůstky vznikají infekční útvary, tzv. apresoria, na jejichž konci se tvoří penetrační hrot, který slouží k průniku do hostitelských buněk a tvorbě haustorií. Apresoria *G. cichoracearum* bradavčitého tvaru jsou jasně zřetelná (Cook a Braun, 2009). Jejich kompletní vývoj trvá 8 – 10 hodin (Schnathorst, 1959c).

Konidiofory vyrůstající z povrchových hyf jsou poměrně dlouhé. Po bazální buňce, která je dlouhá 40 – 140  $\mu\text{m}$  a široká 9 – 15  $\mu\text{m}$ , následují obvykle jedna až tři kratší buňky.

Konidie *G. cichoracearum* jsou bezbarvé, tenkostěnné, jednobuněčné a jednojaderné. Jejich délka se pohybuje v rozmezí 24 – 45  $\mu\text{m}$  a šířka dosahuje 14 - 22  $\mu\text{m}$ . Neobsahují fibrosinová tělíska. Konidie jsou produkovány v řetězcích a slouží k nepohlavnímu rozmnožování (Braun, 1987). Klíčení konidií je závislé na vlhkosti a teplotě. Klíčnicí vlákna, která se následně vyvíjejí v mycelium, vyrůstají apikálně (Braun et al., 2002).

Askokarpy se nazývají chasmothecia. Nemají póry, jejich barva je hnědá až černá a tvar vždy do jisté míry kulovitý. Průměrná velikost činí 85 – 160  $\mu\text{m}$ . Vnitřní buňky jsou uniformní. Přívěsky jsou dobře vyvinuté a variabilní v délce.

Vřečka jsou přisedlá nebo mají krátkou stopku. Jejich počet v askokarpu se pohybuje od 5 do 25 a velikost činí 50 – 80 x 25 – 45  $\mu\text{m}$ . Ve vřečku se nacházejí dvě jednobuněčné askospory bez fibrosinových tělísek (Braun, 1995).

### 3.1.3 Příznaky napadení

Ve většině geografických oblastí se příznaky napadení na rodu *Lactuca* spp. objevují od brzkého léta až po začátek podzimu. U hostitelských rostlin je nejdříve napadán povrch listu, a to jak na horní, tak později také na spodní straně. Za vhodných podmínek se nákaza může rozšířit také na řapík listu a stonek. *G. cichoracearum* napadá i sazenice (Lebeda a Mieslerová, 2011). Jako první podléhají infekci nejstarší listy a rostliny a jejich postižení je nejzávažnější (Koike et al., 2007). Infekce se projevuje vytvářením malých kruhovitých skvrn mycelia, tzv. pustulí. Ty se postupně zvětšují natolik, že splynou dohromady a pokryjí tak celý povrch napadené části rostliny. Infikované listy se stávají chlorotickými, deformují se, nekrotizují, následně mohou usychat a odumírat. Kvůli růstu mycelia, a tedy překrytí listu, dochází k fyziologickému omezení fotosyntézy, což vede ke zpomalení růstu rostliny a může vést až k jejímu úhynu (Jahn et al., 2002).

### 3.1.4 Životní cyklus a epidemiologie

Životní cyklus a epidemiologie u *Golovinomyces cichoracearum* v dnešní době stále nejsou dostatečně známy. U tohoto patogena je známo jak pohlavní, tak nepohlavní rozmnožování. Nepohlavní rozmnožování je iniciováno klíčením konidií. Proces klíčení konidií, při kterém se vytváří klíčící vlákno s apresoriem, trvá 8 až 10 hod. Následující penetrační fáze trvá 10 až 17 hod. Poté se vyvíjí větvené mycelium a celý cyklus končí tvorbou konidioforů. Doba potřebná k proběhnutí celého infekčního cyklu je cca 120 hodin (Schnathorst, 1959c in Lebeda a Mieslerová, 2011).

*G. cichoracearum* patří mezi heterotalické houby, což znamená, že k pohlavnímu rozmnožování a následné tvorbě chasmothecií nemůže dojít bez kontaktu dvou fyziologicky rozdílných jedinců (Schnathorst 1959a in Lebeda a Mieslerová, 2011). Počátek pohlavního rozmnožování tedy představuje spojení samičího pohlavního orgánu askogonu a samčího antheridia, tzv. haplofáze. Jádro antheridia se přiblíží k askogonu, dojde k plasmogamii a poté k dikaryofázi. Následně se vytvoří plodnice (askokarp, chasmothecium), kde po splnutí jader vzniká vřecko, u *G. cichoracearum* se jejich počet pohybuje mezi 7 – 15 (Zlochová, 1990). Mladé vřecko je jediná diploidní buňka v celém životním cyklu. Kombinací meiotického a mitotického dělení v každém vřecku vzniká obvykle 8 haploidních askospor (Braun, 1995).

Šíření patogena je realizováno především pomocí konidií, ale také neporušených plodnic, či volných askospor. Všechny tyto částice jsou nejčastěji přenášeny větrem. Podle Schnathorsta (1959 in Lebeda a Mieslerová, 2011) mohou být konidie přeneseny

nejméně na vzdálenosti okolo 200 km. Při vyšší vlhkosti (nad 60 %) se často shlukují, přičemž šíření konidií v řetízcích se nejeví jako příliš výhodná strategie, neboť schopnost infikovat hostitele má pouze koncová, a tedy nejstarší konidie (Schnathorst, 1959 in Lebeda a Mieslerová, 2011).

### 3.1.5 Vliv vnějších faktorů na rozvoj patogena

Environmentální faktory hrají v rozvoji *G. cichoracearum* podstatnou roli, proto jim byla během výzkumů v posledních desetiletích věnována značná pozornost. Jak se ale zdá, pro stanovení optimálních podmínek pro rozvoj patogena je třeba vycházet z toho, zda je objektem studií *Golovinomyces cichoracearum* s. s., tedy padlí, které bylo popsáno na zástupcích čeledi Asteraceae, či *Golovinomyces cichoracearum* s. l. (dříve *G. orontii*), jež je patogenem také jiných rostlinných skupin (Lebeda a Mieslerová, 2011).

Zásadní význam pro rozvoj padlí má teplota a její kolísání. Zatímco byly konidie *G. cichoracearum* pocházející z rodu *Lactuca* spp. schopny klíčit v rozmezí teplot 5 – 33 °C, schopnost infikovat hostitele se neobjevila, dokud teplota nestoupla nad 10 °C. Stejně tak patogen nemohl infikovat hostitele, pokud byla teplota vyšší než 27 °C (Schnathorst, 1965). Při 6 °C byla výrazně pomalejší rychlost klíčení a maximální klíčivosti bylo dosaženo až pátý den. Ani po čtrnácti dnech nebylo dosaženo maximální klíčivosti při teplotě 30 °C, přestože rychlost klíčení byla vyšší než při 6 °C, procento klíčivosti bylo nejnižší (Schnathorst, 1960a in Lebeda a Mieslerová, 2011). Schnathorst (1965) dále uvádí, že optimální podmínky pro klíčení padlí se liší podle toho, zda zkoumaný izolát pochází z kulturně pěstovaného nebo planě rostoucího hostitele. Zatímco pro izolát z kulturního salátu je ideální teplota pro klíčení 18 °C, izolát z planě rostoucí lociky (*L. serriola*) vykazuje jistou variabilitu, a to od 18 do 27 °C. Stanovením teplotního optima pro klíčení konidií *G. cichoracearum* (izolát z *L. serriola*) se v nedávné době zabývala Sogelová (2007), která pro něj vymezila hodnoty teplot 15 – 25 °C.

Dalším vnějším faktorem pro rozvoj padlí je vlhkost. Konidie obvykle klíčí při nižší vlhkosti, tj. 50 – 75 %. 100% vlhkost a také přímý kontakt konidií s vodou působí inhibičně, ale v době, kdy již infekce započne, nemá vlhkost na růst (vývoj) a sporulaci patogena zřejmě žádný vliv (Schnathorst, 1965).

Faktorem, který ovlivňuje tvorbu mycelia, konidioforů a následně konidií, je světlo (Braun, 1987). Jak uvádí Schnathorst (1960b in Lebeda a Mieslerová, 2011),

intenzita světla ovlivňuje také rezistenci lociky k padlí. Během svých výzkumů zjistil, že *L. sativa* cv. Great Lakes je rezistentním vůči padlí při teplotě 13 °C a intenzitě světla 186 luxů. Na druhou stranu, při snížené svítivosti na 28 – 37 luxů vykazovaly rostliny silnou náchylnost k infekci.

Jak je z výše uvedeného patrné, vnější prostředí má na růst a vývoj *Golovinomyces cichoracearum* zcela zásadní vliv. Kromě teploty, vlhkosti a světla záleží také na stáří konidií, či fyzickém stavu hostitelské rostliny (Schnathorst, 1960a in Lebeda a Mieslerová, 2011). Zmíněné faktory na patogena nepůsobí izolovaně, ba právě naopak, mnohdy se prolínají vlivy hned několika z nich.

### 3.1.6 Geografická distribuce a okruh hostitelů

Nedávné studie založené na analýzách rDNA umisťují původ *Golovinomyces cichoracearum* na severní polokouli (Takamatsu et al., 2006). Jeho rozšíření je kosmopolitní, nejvýznamnější však zůstává v mírném pásmu (Braun, 1995).

Většina druhů čeledi *Erysiphaceae* se vyznačuje vysokou hostitelskou specifitou. Okruh hostitelů *Golovinomyces cichoracearum* byl v minulosti považován za poměrně široký především díky dřívějšímu rozdílnému pojetí klasifikace (Salmon, 1900 in Braun 1995). Protože byl tento druh považován za rozsáhlejší, zahrnoval i hostitelský okruh mnohem více zástupců, především z *Asteraceae*, ale také některých dalších čeledí (např. *Apocynaceae*, *Malvaceae*, *Violaceae*) (Braun, 1995).

Braun (1987) ve své monografii chápe *G. cichoracearum* v užším pojetí s okruhem hostitelů pouze v rámci čeledi *Asteraceae*. *G. cichoracearum* s. l. schopné infikovat zástupce z jiných čeledí Braun (1995) pojmenoval *Erysiphe orontii* (dnes *Golovinomyces orontii*).

Ve svých dřívějších studiích Braun (1999) uvádí, že se *G. cichoracearum* vyznačuje pěti různými varietami: var. *cichoracearum*, var. *fischeri*, var. *latisporus*, var. *poonensis*, var. *transvalensis*. Na základě důkladných morfologických srovnání a molekulárních analýz však byly některé z variet přeřazeny na úroveň druhu. Varieta *latisporus* se tak stala samostatným druhem *Golovinomyces ambrosiae* a var. *fischeri* *Golovinomyces fischeri*. Samostatným druhem se stalo také *Golovinomyces sonchicola*, tedy padlí vyskytující se na hostitelském rodu *Sonchus*, které bylo dříve považováno za *G. cichoracearum* s.s. (Cook a Braun, 2009).

Vnitrodruhové rozdíly v *G. cichoracearum* s.l. zkoumali Zeller a Levy (1995). V jejich širším pojetí zahrnuje hostitelské spektrum tohoto druhu přes 300 rostlinných

druhů z mnoha čeledí. Výsledky testování indikují výskyt hostitelsky specifických forem v rámci druhu, rozsah hostitelské specializace však nebyl dosud z velké části určen. Výsledky dále ukázaly, že je možné izoláty *G. cichoracearum* získané z různých hostitelů přiřadit k šesti RFLP haplotypům. Každý haplotyp je specifický k jedinému hostiteli nebo skupině příbuzných hostitelských druhů. Tyto výsledky korespondují s dřívějšími názory, podle kterých je *G. cichoracearum* komplexem morfologicky podobných, ale hostitelsky omezených forem.

Pro řešení problémů týkajících se hostitelské specializace se používají cross – inokulační testy. Například Koike a Saenz (1996), kteří popsali výskyt *G. cichoracearum* na *Cichorium endivia* a *C. intybus* na pobřeží Kalifornie, prováděli právě tyto testy. Protože v oblasti, kde se padlí objevilo, se hojně pěstuje salát (*Lactuca saliva* L.), byl izolát z *C. intybus* použit k inokulaci právě salátových rostlin (cvs Red Eye Cos a Salinas). Ani po čtyřech pokusech se však salát nepodařilo infikovat.

### **3.1.7 Výskyt a geografická distribuce *G. cichoracearum* na *Lactuca* spp.**

Ekonomicky nejvýznamnější plodinou, kterou napadá *G. cichoracearum*, je pěstovaný salát (*Lactuca sativa*) (Lebeda, 1994). Oblastí nejlépe zmapovanou, co se výskytu tohoto patogena týče, je nejspíše USA, kde jeho přítomnost potvrzuje hned několik autorů (např. Schnathorst a Bardin, 1958 in Lebeda a Mieslerová, 2011 nebo Koike a Saenz, 2006).

Výskyt padlí byl mnohokrát hlášen i v Evropě (např. Blumer, 1967 in Lebeda a Mieslerová, 2011; Crute a Burns, 1983; Lebeda, 1985a, b), kde však donedávna nebyl považován za zásadní faktor ovlivňující ekonomické ztráty. Nicméně klimatické změny v posledních letech jsou pravděpodobně jedním z důvodů, díky kterým vliv tohoto patogena roste (Garett et al., 2006). Za evropské druhy lociky (r. *Lactuca*), které jsou napadány *G. cichoracearum*, považuje Braun (1995) *L. muralis*, *L. perennis*, *L. quercina*, *L. serriola*, *L. saligna*, *L. sibirica*, *L. viminea* a *L. virosa*. Geografickou distribuci tohoto druhu padlí v Evropě znázorňuje Tabulka 1.

Některým evropským zemím byla věnována zvýšená pozornost, a tak výsledky podrobnějších studií ukázaly, že populace *L. serriola* rostoucí v suchých a teplých oblastech Itálie a Francie byly výrazně napadeny patogenem *G. cichoracearum*. Oproti tomu zasažení italské populace *L. saligna* nebylo příliš časté, u rostlin *L. saligna* a *L. virosa* ve Francii pak nebylo zaznamenáno vůbec (Lebeda et al., 2001). Častý výskyt padlí na *L. serriola* byl pozorován v Rakousku, a to v nížinách i horských oblastech



(Lebeda et al., 2001). Zjištěná přítomnost patogena na *L. serriola* během terénní expedice ve Slovinsku nebyla příliš častá (19 % lokací) a v případě napadení dosahovala infekce spíše nízkého stupně (Doležalová et al., 2001). Naopak v městských lokalitách Stockholmu (Švédsko) byl výskyt častý (75 % lokací) a infekce závažná (Doležalová et al., 2001).

Tabulka 1: Geografická distribuce *G. cichoracearum* na planých zástupcích rodu

*Lactuca* (upraveno podle Lebedy, 1999)

| <i>Lactuca</i> spp.                             | Země výskytu (abecední pořadí)   |
|---|--|
| <i>L. sativa</i>                                | Austrálie, Baltské státy, Česká republika, Ekvádor, Francie, Chile, Írán, Itálie, Jemen, Jordánsko, Libanon, Libye, Maroko, Německo, Peru, Rakousko, Rusko, Řecko, Saudská Arábie, Slovensko, Španělsko, Švýcarsko, Turecko, USA, Velká Británie, Venezuela              |
| <i>L. perennis</i>                              | Česká republika, Švýcarsko   |
| <i>L. quercina</i>                              | Rusko, Ukrajina  |
| <i>L. saligna</i>                               | Česká republika, Maďarsko, Rumunsko, Velká Británie  |
| <i>L. serriola</i>                              | Arménie, Austrálie, Bulharsko, Česká republika, Estonsko, Finsko, Francie, Chile, Irák, Izrael, Itálie, státy dřívější Jugoslávie, Kanada, Maďarsko, Německo, Polsko, Rumunsko, Rusko, Slovensko, Švédsko, Švýcarsko, Turecko, Ukrajina, USA, Uzbekistán, Velká Británie |
| <i>L. sibirica</i>                              | Česká republika  |
| <i>L. tatarica</i>                              | Česká republika  |
| <i>L. viminea</i>                               | Česká republika, Rakousko, Rusko, Ukrajina   |
| <i>L. virosa</i>                                | Česká republika, Francie, Itálie, Švýcarsko  |
| <i>Mycelis muralis</i><br>( <i>L. muralis</i> ) | Bulharsko, Česká republika, Dánsko, Finsko, Francie, Itálie, (dřívější) Jugoslávie, Německo, Norsko, Polsko, Rumunsko, Rusko, Švédsko, Ukrajina  |

### 3.1.8 Variabilita interakcí mezi *G. cichoracearum* a *Lactuca* spp.

Interakce mezi *G. cichoracearum* a kulturním salátem (*L. sativa*) byly obsahem studií mnoha autorů, (např. Schnathorst a Bardin, 1958; Knight et al., 1986 in Lebeda a Mieslerová, 2011; Matheron a Porchas, 2001, 2003; Lebeda, 1985a, b), přičemž většina kultivovaných odrůd salátu byla shledána náchylnou vůči tomuto patogenu. Rezistencí

se vyznačovalo pouze několik kultivarů, např. Amanda Plus nebo Bremex (Lebeda, 1985a).

Schnathorst a Bardin (1958 in Lebeda a Mieslerová, 2011) poukázali na rozpor ve výsledcích testování citlivosti salátových kultivarů vůči padlí za laboratorních podmínek a při růstu na poli. Kultivary, které byly na poli odolné, se ve skleníku nebo formou listových segmentů stávaly snadno infikovatelnými. Z toho důvodu by výsledky polních i laboratorních studií měly být pečlivě brány v úvahu.

Interakcemi mezi *Lactuca* spp. a *Golovinomyces cichoracearum* v podmínkách přirozené infekce se zabýval Lebeda (1985b). V jeho práci bylo prozkoumáno 29 genotypů z pěti planě rostoucích druhů rodu *Lactuca* a hybrid *L. serriola* x *L. sativa*. Výsledky ukázaly náchylnost většiny zkoumaných genotypů *L. serriola* a v menší míře také křížence *L. serriola* x *L. sativa*. Rezistence byla prokázána u několika genotypů *L. serriola*, dvou genotypů *L. saligna*, jednoho genotypu *L. aculeata*, dvou genotypů *L. virosa* a jednoho genotypu *L. dentata*.

Detailnější studie, která byla provedena později (Lebeda, 1994) zkoumala interakce vůči *G. cichoracearum* u 99 genotypů sedmi planých druhů rodu *Lactuca* (*L. serriola*, *L. saligna*, *L. virosa*, *L. viminea*, *L. perennis*, *L. tenerrima* a *L. tatarica*) a *Mycelis muralis* ve skleníkových podmínkách. Nejnáchylnějším k infekci byla z testovaných druhů shledána *L. serriola*. U *L. saligna* se objevila rezistence v různých stupních a cca 50 % vzorků nevykazovalo žádné příznaky napadení. *Lactuca viminea*, *L. virosa*, *L. perennis*, *L. tenerrima*, *L. tatarica* a *Mycelis muralis* byly také většinou prosty symptomů, pokud se však objevily, tak pouze v omezené míře.

V rámci ČR probíhá od roku 2005 širší průzkum výskytu *G. cichoracearum* na populacích *L. serriola* (např. Mieslerová et al., 2007a, 2009, 2013; Lebeda et al., 2012a, b). Izoláty sesbírané především na území Moravy a východních Čech byly studovány z morfologického hlediska a patogenity na genotypech *L. serriola* pomocí metody listových disků (Mieslerová et al., 2007a, 2009). Genotypy *Lactuca* spp., které vykazovaly nejvyšší variabilitu reakcí vůči izolátům *Golovinomyces cichoracearum*, byly selektovány a následně byl ze 13 genotypů (6 kultivarů *L. sativa*, po dvou genotypech *L. serriola*, *L. saligna*, *L. virosa* a jeden hybrid *L. sativa* x *serriola*) (Lebeda et al., 2012a) vytvořen diferenciační soubor, který dále sloužil pro studium variability virulence padlí *G. cichoracearum* (Lebeda et al., 2012b).

Během tohoto výzkumu, který stále probíhá, byly nalezeny důležité zdroje rezistence vůči *G. cichoracearum*, nicméně žádný z testovaných genotypů nebyl

rezistentní ke všem studovaným izolátům padlí. Nejvyšší stupeň rezistence byl nalezen u *L. virosa* (LVIR/50), *L. saligna* (09-H58-1013), *L. sativa* cv. Colorado a *L. serriola* (PI273617) (Mieslerová et al., 2007a, 2009).

V současné době je kladen důraz na lepší pochopení vnitrodruhové variability patogena a interakcí hostitel – patogen za kombinovaného použití metod klasické fytopatologie, genetiky a molekulární biologie. Tyto výzkumy jsou významné pro praktické šlechtění salátu (Lebeda a Mieslerová, 2011).

### **3.1.9 Rezistence *Lactuca* spp. vůči *Golovinomyces cichoracearum***

Mechanismus rezistence *Lactuca* spp. vůči *Golovinomyces cichoracearum* nebyl dosud probádán do takové hloubky, jako je tomu např. u rezistence k *Bremia lactucae* (Lebeda a Mieslerová, 2011).

V 60. letech minulého století se problematikou rezistenčních mechanismů zabýval Schnathorst (1959b in Lebeda a Mieslerová, 2011), který zjistil, že za podmínek na poli padlí ohrožuje primárně dospělé hostitelské rostliny. Infekce nejzávažněji postihuje nejnižší položené listy a směrem k vrcholu symptomy ztrácejí na intenzitě. Další poznatek byl, že při souběžném napadení hostitelské rostliny virem salátové mozaiky (LMV) je míra infekce *G. cichoracearum* vyšší (Schnathorst 1959b in Lebeda a Mieslerová, 2011).

Na základě svých pozorování Schnathorst (1959b in Lebeda a Mieslerová, 2011) vyvodil závěr, že rezistence salátu k patogenu *Golovinomyces cichoracearum* souvisí s fyziologickým stavem listu. Faktorem ovlivňujícím rezistenci, se zdají být změny osmotického tlaku, a tento mechanismus by mohl být zodpovědný za šíření výskytu choroby na rostlinách.

Schnathorst (1959b in Lebeda a Mieslerová, 2011) také srovnával reakce kulturního salátu k různým izolátům padlí. První izolát pocházel z pěstovaného salátu, druhý pak z planě rostoucí rostliny rodu *Lactuca* spp. Tato studie ukázala, že rezistence zkoumaného salátu k izolátu pocházejícího z kulturně pěstovaných odrůd byla ovlivněna více faktory, jako je virová infekce hostitelské rostliny, teplotní rozdíly, intenzita světla, či minerální výživa, zatímco rezistence k izolátu z planě rostoucích rostlin se zdála být těmito faktory neovlivněna.

## **3.2 Chemická kontrola padlí**

Nejvhodnější metodou ochrany vůči chorobám je prevence. Vysazování rostlin k dané chorobě rezistentních, či vyhýbání se vysoce náchylným kultivarům při

pěstování, patří bezesporu mezi zásadní preventivní opatření (Matheron a Porchas, 2003). Nicméně ne vždy jsou tyto postupy dostačující. Právě naopak, v mnoha případech je zapotřebí použít před vypuknutím choroby některý z efektivních fungicidů, či jejich směsi.

### **3.2.1 Historie fungicidních přípravků**

Již dávno předtím než začaly být planě rostoucí rostliny zemědělci domestikovány, byly hostiteli různých chorob. První písemné zmínky o patogenech houbového původu, a tedy s největší pravděpodobností zahrnující i padlí, pocházejí již ze starověkého Řecka a Říma. Antičtí zemědělci také začali pro boj s rostlinnými nemocemi jako první používat elementární síru, která je důležitou součástí i dnešních fungicidních přípravků (Hollomon a Wheeler, 2002).

Právě síra je vůbec prvním pesticidem, o kterém se literatura zmiňuje, konkrétně tedy Homér ve svých eposech Ilias a Odysseia (McCallan, 1967), přesto však musela být pro své použití v ochraně rostlin znovuobjevena na začátku 19. století zahradníkem Williamem Forsythem v podobě polysulfidu vápenatého (McCallan, 1967). Výrazné zrychlení vývoje nových fungicidů přinesl rok 1934, kdy byly objeveny první organické fungicidní přípravky. Dalším milníkem v chemické kontrole padlí bylo antibiotikum griseofulvin. Přestože tato látka nebyla nikdy v zemědělství masivně rozšířena, ukázala potenciál systémového působení v kontrole chorob (Hollomon a Wheeler, 2002).

Až do 60. let minulého století byly vůči padlí používány protektanty a multi – site inhibitory. Přípravky s obsahem dithiokarbamátů, quinomethionátů a síry se používaly pouze na omezené spektrum plodin, protože musely být dávkovány ve vysokém množství a jejich aplikace se tak vyplatila pouze při vysoké ceně ovoce a zeleniny. Omezujícím faktorem pro použití těchto přípravků byla také potřeba dlouhé prodlevy mezi aplikací a sklizní. Situace se však zásadně změnila zavedením prvního úspěšného systémového produktu, benomylu, širokospektrálního fungicidu s dobrou aktivitou vůči některým druhům padlí. Krátce poté byl trh obohacen úspěšným zavedením morfolinů a 2 – aminopyridinů, následovaných v 80. letech triazoly, tzv. DMI fungicidy (inhibitory demethylace sterolů) a v 90. letech QoI strobilurinovými fungicidy (např. azoxystrobin) a anilinopyridiny (cyprodnil) (Hollomon a Wheeler, 2002).

Důsledkem započnutí užívání systémových fungicidů bylo snížení dávek potřebných pro kontrolu padlí. Např. quinoxifen za určitých podmínek dokáže zajistit

dostatečnou kontrolu již při dávce 30 g/ha oproti fungicidům používaným v 60. letech, jejichž dávky mnohdy převyšovaly i 5 kg/ha. Je tedy jasné, že pro zemědělce je chemická kontrola z ekonomického hlediska stále přitažlivější (Hollomon a Wheeler, 2002).

Vývoj fungicidů je stále intenzivní a trendem je snižování dávky pro efektivní kontrolu a potažmo ekonomické náročnosti.

### **3.2.2 Rozdělení fungicidních přípravků podle místa účinku**

#### **3.2.2.1 Kontaktní fungicidy**

Kontaktní fungicidy jsou takové, které se aplikují na povrch rostlin, obvykle ve formě postřiku, a tam také zůstávají. Jedná se o látky nesystémové. Protože působí přímo na patogena a zabraňují jeho průniku do rostlinného pletiva, používají se v rámci preventivních opatření nebo jako doplněk systémových fungicidů. Mnohé z kontaktních fungicidů jsou potencionálně fytotoxické a mohly by rostlinu poškodit, kdyby došlo k jejich vstřebání (McGrath, 2004).

#### **3.2.2.2 Systémové fungicidy**

Systémové neboli penetrační fungicidy jsou absorbovány do rostliny (McGrath, 2004). Jedná se o přípravky, které účinkují v jednom konkrétním bodě metabolické cesty patogena, jsou to tedy tzv. single – site fungicidy. Tyto látky se rostlinným pletivem mohou šířit dvěma cestami, a to apoplastickou (řízeno difúzí a rychlostí transpirace) nebo symplastickou (zahrnuje příjem a distribuci do sinku) (Neumann a Jacob, 1995).

Fungicidy systémové a translaminární jsou ve srovnání s kontaktními, tzv. multi – site fungicidy, náchylnější k vyvinutí rezistence právě z důvodu existence specifického místa účinku (McGrath, 2001).

Systémové fungicidy mají nicméně značnou výhodu především v tom, že ve srovnání s kontaktními fungicidy nemusí být rostlina tak důkladně ošetřena, a přesto je její ochrana dostatečná. Účinná látka je uvnitř rostliny transportována, a ta je tak chráněna také na místech, kde nebyla fungicidem ošetřena, jako je např. spodní strana listů (McGrath, 2001). Ze stejného důvodu vykazují některé systémové fungicidy také léčebné účinky, protože díky absorpci dané látky může dojít k působení na patogena i po propuknutí infekce (McGrath, 2004).

### 3.2.3 Přípravky používané vůči padlí

Jak již bylo zmíněno, registrované chemické přípravky pro kontrolu houbových chorob se na základě způsobu, jakým účinkují, rozdělují na dvě skupiny. Do první z nich patří kontaktní fungicidy s tzv. multi – site způsobem účinku, do druhé pak látky se specifickým způsobem účinku (benzimidazoly, DMI fungicidy – inhibitory demethylace, morfoliny, hydroxypyrimidiny, anilinopyriminidy, fosforothioláty, QoI fungicidy a quinoliny) (McGrath, 2001).

Aby byla určitá chemikálie použitelná jako účinný ochranný fungicid, musí dle Cremlyna (1985) splňovat následující kritéria:

- a) nízká fytotoxicita, aby aplikací nebyla hostitelská rostlina příliš poškozena
- b) látka musí být sama o sobě fungitoxická nebo musí mít schopnost přeměnit se v účinný fungitoxikant uvnitř spor hub, zároveň musí působit rychle, aby houbová infekce neměla čas proniknout skrz rostlinnou kutikulu
- c) fungicid musí být schopen průniku do spor houby a dospět k vlastnímu místu svého účinku v houbě
- d) z důvodu aplikace fungicidů ve formě postřiku musí mít schopnost vytvořit přilnavou vrstvu, která odolá vlivům počasí po dlouhou dobu.

#### 3.2.3.1 Mechanismus účinku vybraných skupin fungicidů

##### QoI fungicidy

QoI fungicidy jsou inhibitory mitochondriální respirace, kterou blokuje navázáním na tzv. cílové místo k cytochromu b komplexu III blízko Qo centra (Gisi a Sierotzki, 2008). Je tak zamezeno toku protonů, který je generován tímto komplexem a c oxidázou, což vede k redukci tvorby ATP. QoI fungicidy také zastavují klíčení konidií (Joseph-Horne a Hollomon, 2000). Mezi tuto skupinu fungicidů patří azoxystrobin, který je účinnou látkou v testovaném přípravku ORTIVA.

##### Inhibitory biosyntézy sterolů (SBIs)

Skupina inhibitorů sterolů se dále dělí na čtyři třídy, z nichž tři jsou používány v zemědělství. Jedná se o aminy, inhibitory keto-reduktázy (KRIs) a inhibitory demethylace (DMIs), které působí na sterol C 14-demethylázu (FRAC, 2014). Právě do poslední zmiňované třídy patří penconazol, což je účinná látka testovaného přípravku TOPAS 100 EC a difenoconazol, který je obsažen v přípravku SCORE 250 EC. Účinnou látkou v testovaném přípravku TALENT je myclobutanil, taktéž inhibitor demethylace.

### **Fungicidy na bázi síry**

Mechanismus účinku elementární síry vůči houbovým patogenům není stále zcela objasněn a již v 19. století byl předmětem mnoha dohadů (Tweedy, 1981). Hypotéza, která se zdá být nejpravděpodobnější, je postavena na tom, že buňky hub jsou propustné pro  $S^0$ , které se tak dostávají do cytoplazmy, kde ovlivňují mitochondriální dýchací řetězec (Williams a Cooper, 2004). Síra je účinnou látkou v testovaném přípravku KUMULUS WG.

#### **3.2.3.2 Studium účinku fungicidů vůči *Golovinomyces cichoracearum***

Na přelomu tisíciletí probíhal v Arizoně (USA) intenzivní výzkum interakcí mezi *G. cichoracearum* a *Lactuca* spp., který zahrnoval také studium účinnosti fungicidů vůči tomuto patogenu (Matheron a Porchas, 1998, 2001, 2003). Autoři použili širokou škálu fungicidů a ochranných složek s odlišnými mechanismy účinku. Fungicidy byly aplikovány formou postřiku na plodiny na poli, a to celkem pětkrát. Tento výzkum například ukázal, že fungicidy na bázi síry mohou ochránit salát vůči padlí čekankovému za předpokladu brzké a časté aplikace. Přípravky založené na síře však v roce 1998 vykazovaly nižší účinnost, než QoI fungicidy (hlavně strobiluriny): kresoxim – methyl, dimoxystrobin, pyraclostrobin, azoxystrobin a quinoxifen. Výzkum také ukázal, že některé fungicidy nejsou efektivní, pokud jsou aplikovány až po napadení padlím, jako je tomu například u bikarbonátu draslíku (Matheron a Porchas, 1998). O rok později (Matheron a Porchas, 1999) byl seznam účinných látek vůči *G. cichoracearum* rozšířen o myclobutanil, dithiokarbamát a pyraclostrobin v kombinaci s boscalidem. V této studii byla také zvláštní pozornost věnována nefungicidní látce acibenzolar-S-methylu, která nemá přímý vliv na patogena, ale funguje jako rostlinný aktivátor a indukuje získanou rezistenci. Během testů pak byl skutečně prokázán pozitivní vliv na odolnost rostlin k padlí. Protože se účinnost jednotlivých fungicidů mění a jsou známy případy rezistence, Matheron a Porchas (2003) důrazně doporučují střídání a kombinování přípravků různých chemických tříd, což vede k nejefektivnější možné ochraně plodin.

V České republice se problematikou účinnosti vybraných skupin fungicidních látek vůči padlí zabývá skupina pracovníků Katedry botaniky PřF UP pod vedením prof. Ing. Aleše Lebedy, DrSc. Tyto výzkumy jsou součástí dlouhodobého výzkumu populací padlí tykvovitých, jehož původcem je mimo *Podosphaera xanthii* (*P. fusca*) i *Golovinomyces cichoracearum* (*G. orontii*). Snahou je zjistit přítomnost rezistence, případně tolerance, k vybraným skupinám fungicidních látek, které patří v ČR

k nejpoužívanějším (Lebeda a Sedláková, 2004; Lebeda et al., 2010c; Sedláková a Lebeda, 2008, 2010).

Jak již bylo zmíněno, v České republice dosud nebyla zkoumána účinnost fungicidů vůči padlí čekankovému na rodu *Lactuca*, proto není v současné době k dispozici seznam povolených přípravků vůči padlí na salátu. Výběr fungicidních přípravků v experimentální části této práce tak vychází ze seznamu v ČR doporučených výrobků pro kontrolu padlí na tykvovitých rostlinách z důvodu příbuznosti původců obou chorob, a také pro kontrolu padlí rajčat, jelikož mnohé výrobky jsou doporučovány na obě tyto skupiny současně (Tabulka 2).

Tabulka 2 Seznam přípravků povolených v České republice pro rok 2014 proti padlí tykvovitých a padlí rajčat

(zdroj: Seznam registrovaných přípravků a dalších prostředků na ochranu rostlin 2014, ÚKZÚZ)

| Přípravek      | Účinná látka                 | Dávkování na ha |
|----------------|------------------------------|-----------------|
| COLLIS         | boscalid + kresoxim - methyl | 0,5 - 0,75 l    |
| KUMULUS WG     | síra                         | 2 - 3 kg        |
| ORTIVA         | azoxystrobin                 | 1 l             |
| SULFOLAC 80 WG | síra                         | 1,5 kg          |
| SCORE 250 EC   | difenoconazol                | 0,4 - 0,8l      |
| TALENT         | myclobutanil                 | 0,375 l         |
| TOPAS          | penconazol                   | 0,25 – 0,5 l    |

### 3.2.4 Rezistence vůči fungicidům

Fungicidy jsou v současné době zcela nezbytné pro udržení zdraví pěstovaných plodin a potažmo vysokých výnosů z jejich produkce. Jejich účinnost však významně narušuje vývoj rezistence u cílových patogenů (Brent a Hollomon, 2007). Patogeni způsobující padlí tykvovitých, tedy *Golovinomyces cichoracearum* (*G. orontii*) a *Podosphaera xanthii* (*P. fusca*), jsou podle terminologie McDonalda a Lindeho (McDonald a Linde, 2002) považovány za rizikové (Lebeda et al., 2007). Oba tyto druhy mají vysoký evoluční potenciál, což vede ke snadnějšímu překonání jak rezistence plodin k těmto patogenům, tak vývoji rezistence vůči fungicidním



přípravkům, než je tomu u rostlin s nízkým evolučním potenciálem (Kuck a Russel, 2006).

Rezistence je stabilní, dědičné přizpůsobení patogena k fungicidu, což má za následek snížení citlivosti k danému fungicidnímu přípravku. Schopnost překonat účinek aktivní látky fungicidu získává patogen vlivem genetické mutace jednoho, či více genů (McGrath, 2001).

#### **3.2.4.1 Typy rezistence**

##### **3.2.4.1.1 Kvalitativní rezistence**

Ke vzniku kvalitativní rezistence dochází v případě modifikace jednoho hlavního genu, která má za následek úplnou ztrátu kontroly nad chorobou, jež nejde zvrátit použitím vyšší dávky fungicidu nebo jeho častější aplikací. Příkladem může být rezistence k benzimidazolovým fungicidům (např. benomyl) (McGrath, 2001).

##### **3.2.4.1.2 Kvantitativní rezistence**

Pokud dojde ke vzniku rezistence modifikací hned několika interagujících genů, je citlivost patogena k fungicidu závislá na počtu takovýchto mutací. Variabilita v citlivosti uvnitř populace je kontinuální a unimodální a selekce se objevuje v určitém směru. Chemická kontrola choroby je tak rezistencí narušena, přesto ale může být choroba ovlivněna zvýšením dávek nebo častější aplikací fungicidního přípravku. Úplnou ztrátu kontroly choroby může způsobit až další selekce v genetické výbavě patogena. Tento typ rezistence je obvykle označován jako kvantitativní a příkladem může být rezistence k inhibitorům demethylace (DMIs) (McGrath, 2001).

##### **3.2.4.1.3 Křížová rezistence**

Mechanismus účinku fungicidů je v rámci každé chemické skupiny velmi podobný nebo dokonce stejný, proto je velmi pravděpodobné, že bude patogen, který vykazuje rezistenci k určitému přípravku, méně citlivý také k ostatním fungicidům dané skupiny, což vede ke sníženému účinku nebo zcela k jeho vymizení. Tento problém je pro kontrolu rezistence do značné míry limitující (Brown, 2002; McGrath, 2001). Přesto však může být křížová rezistence pouze částečná a nové látky jsou účinné, i když u starších látek téže skupiny došlo ke vzniku rezistence. Stupeň tohoto typu rezistence se liší také mezi jednotlivými izoláty (Brent a Hollomon, 2007).

Křížová rezistence byla zaznamenána u DMI fungicidů (např. myclobutanil) a také QoI fungicidů (např. azoxystrobin) (McGrath, 2001).

#### **3.2.4.1.4 Mnohonásobná rezistence**

O mnohonásobné rezistenci hovoříme tehdy, když patogen vykazuje sníženou citlivost k různým fungicidům. Na rozdíl od rezistence křížové se jedná o fungicidy z více než jedné chemické skupiny. K rozvoji tohoto typu dochází v případě intenzivního používání rizikových fungicidů bez sledování principů řízení rezistence. Příkladem může být Japonsko, kde se u padlí tykvovitých během dvou let intenzivního používání vyvinula rezistence až ke třem skupinám současně, které zahrnovaly také benzimidazoly, QoI a DMI fungicidy (Gallian et al., 2006).

#### **3.2.4.2 Molekulární mechanismy vzniku rezistence**

Za vznik rezistence je odpovědných hned několik mechanismů. Jedná se o: 1) změnu cílového místa působení aktivní látky, což omezuje vazebnou schopnost fungicidu; 2) syntézu alternativního enzymu se schopností nahradit cílový enzym; 3) zvýšení syntézy cílových míst účinku fungicidu; 4) snížený příjem fungicidu; 5) metabolický rozklad fungicidu. Výčet těchto mechanismů však nemusí být konečný a není vyloučeno, že se na vzniku rezistence podílejí další, dosud neznámé, mechanismy (Ma a Michailides, 2005).

##### **3.2.4.2.1 Molekulární mechanismy vzniku rezistence u vybraných skupin fungicidů**

Rezistence k benzimidazolovým fungicidům byla detekována u mnoha skupin houbových patogenů. U většiny z nich byla způsobena bodovými mutacemi genu pro  $\beta$  – tubulin, což vede ke změnám aminokyselinových sekvencí ve vazebném místě pro benzimidazoly. Stupeň rezistence je ovlivněn tím, na kterém kodonu k mutaci dojde a také různými substitucemi na stejném kodonu (Ma a Michailides, 2005). Takové mutace mohou vést u některých patogenních druhů k pleiotropnímu efektu inhibujícímu růst mycelia při vysokých nebo nízkých teplotách. Díky tomu jsou tyto druhy v selekční nevýhodě. Znalost citlivosti rezistentních patogenů k teplotě je tak možno využít k vytváření strategie aplikace fungicidních přípravků (Ma a Michailides, 2005).

DMI fungicidy jsou inhibitory C-14- $\alpha$ -demethylace 24 – methyldihydrolanosterolu, který je prekurzorem ergosterolu u hub. Mutace genu CYP51 pro 14- $\alpha$ -demetylasu vede u některých patogenů ke vzniku rezistence k této skupině fungicidů. U některých rezistentních hub však nebyla mutace tohoto genu prokázána. Je tedy zřejmé, že ke vzniku rezistence vedou také další cesty. Jednou z nich je overexprese genu CYP51 (Ma a Michailides, 2005).

Rezistence vůči QoI fungicidům se u několika významných rostlinných patogenů objevila brzy po jejich uvedení na trh a je v největším počtu případů způsobena bodovou mutací v genu pro mitochondriální cytochrom b. Tato mutace vede k záměně aminokyseliny z fenylalaninu na leucin na kodonu 129 (F129L) nebo z glycinu na alanin na kodonu 143 (G143A) (Bartlett et al., 2002). Podobně, jako je tomu u benzimidazolových fungicidů, také u této skupiny je pro stupeň rezistence stěžejní, na kterém kodonu došlo k mutaci (Ma a Michaildes, 2005).

### **3.2.4.3 Vznik rezistence u celosvětově používaných fungicidů vůči padlí tykvovitých**

#### **3.2.4.3.1 Benzimidazolová skupina fungicidů**

O nejdéle známém případě rezistence fungicidů vůči padlí tykvovitých se dá hovořit v případě benomylu. Tato látka byla použita jako vůbec první fungicid se specifickým účinkem vůči padlí tykvovitých. V USA byl registrován v roce 1972 a problémy s jeho účinností se objevily hned následující rok (McGrath et al., 1996). V experimentálních podmínkách byla rezistence padlí vůči benomylu prokázána již dříve, a to při pokusech v roce 1967 (Schroeder, 1969 in McGrath, 2001). Výzkumy následujících let se ve svých výsledcích rozcházel. Účinnost benomylu se měnila v závislosti na čase i v rámci jedné zkoumané lokality, což zapříčinilo sníženou možnost predikce vývoje rezistence na základě výsledků výzkumů předchozích let. Na začátku 90. let byl tak v USA benomyl stále doporučován jako vhodný prostředek kontroly padlí, což se změnilo v letech 1996 – 1998, kdy byl výskyt rezistentních patogenů natolik častý, že byla úspěšná kontrola padlí pomocí tohoto přípravku znemožněna. Rezistence vůči benomylu byla hlášena také z dalších zemí, zmínky pocházejí z 80. let z Austrálie nebo z 90. let 20. století z Japonska a Nizozemí (McGrath, 2001).

Jiná látka z této skupiny, thiophanát – methyl, je stále k dispozici pro použití vůči padlí, nicméně není doporučována, protože rezistence vůči této látce je také široce rozšířená a běžně nalézána (McGrath, 2006; McGrath, 2012).

Rezistence k této skupině fungicidů je kvalitativní, takže patogen je buď citlivý nebo plně rezistentní (McGrath, 2012).

#### **3.2.4.3.2 DMI fungicidy**

Druhým fungicidem se specifickým účinkem, který byl použit v USA vůči padlí tykvovitých, byl triadimefon ze skupiny inhibitorů demethylace sterolu. Ve Spojených

státech byl registrován v roce 1984 a k prvnímu nálezu snížení citlivosti došlo o 2 roky později. První rezistentní kmeny se pak objevily na začátku 90. let. Frekvence rezistence v jedné dané lokalitě se rok od roku zásadně měnila, bylo proto obtížné předpovědět její další vývoj, podobně jako tomu bylo u benomylu (McGrath, 2001). Rezistence k triadimefonu byla v 90. letech hlášena také z dalších zemí, jako je Japonsko, Španělsko, Řecko, či Izrael (McGrath a Shishkoff, 2001).

Dalším vyvinutým fungicidem z této skupiny byl myclobutanil. V prvních experimentech byl ve vysokých dávkách účinný vůči patogenům, které byly plně rezistentní k triadimefonu. V USA byl registrován v roce 2000. V roce 2002 byl registrován další fungicid, triflumizol. Myclobutanil a triflumizol vykazovaly efektivní kontrolu padlí během studií provedených do roku 2010 (McGrath a Hunsberger, 2011). Žádný z fungicidů, které byly vyvinuty později, difenoconazol, tebuconazol a metconazol, ve svém účinku nepředčily tyto fungicidy registrované dříve (McGrath, 2012).

V případě DMI fungicidů se jedná o rezistenci kvantitativní, mezi jednotlivými patogeny se vyskytují různé stupně rezistence (McGrath, 2012).

#### **3.2.4.3.3 QoI fungicidy**

Významnou skupinou používanou pro boj s padlím jsou také QoI fungicidy. První z nich, azoxystrobin, byl v USA registrován na jaře roku 1999, ještě téhož roku následován trifloxystrobinem a v roce 2002 pyraclostrobinem. K rozvoji rezistence došlo u této skupiny velmi rychle, první případy se objevily již v roce 1999 v Japonsku, dále pak Tchaj – wanu, Francii, či Španělsku (McGrath, 2001). První americké rezistentní kmeny se objevily v roce 2002 a byly hlášeny hned z několika států USA (McGrath a Shishkoff, 2003). V současné době není tato skupina pro kontrolu padlí tykvovitých doporučována kvůli častému výskytu rezistentních patogenních kmenů, a také časté křížové rezistence v rámci této skupiny (McGrath, 2012).

#### **3.2.4.3.4 Carboximidy**

Čtvrtou skupinou mobilních fungicidů s aktivitou vůči padlí tykvovitých s rizikem vývoje rezistence, byly carboximidy. První přípravek byl registrován v roce 2003 a obsahoval kombinaci boscalidu a pyraclostrobinu. Plně rezistentní kmeny k boscalidu se objevily až v roce 2008 (McGrath, nepublikováno; McGrath, 2012). Je možné, že carboximidy registrované v blízké budoucnosti, budou chemicky natolik

odlišné od boscalidu, že jejich účinnost nebude ohrožena křížovou rezistencí k němu (McGrath, 2012).

#### **3.2.4.3.5 Quinoliny**

Zatím poslední skupinou používanou proti padlí tykvovitých jsou v USA quinoliny. První z nich, quinoxifen byl registrován v roce 2007 pro ošetření melounu (*C. melo*), v roce 2009 pak i pro ošetření tykví (*C. pepo*). Během prvotních pokusů byla prokázána jejich vysoká účinnost (McGrath a Fox, 2009). Několik dalších fungicidů z této skupiny je v současné době předmětem výzkumu a vývoje (McGrath, 2012).

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Rostlinný materiál

Pro testování byly použity listy lociky kompasové *Lactuca serriola* (LSE/57/15). Semena byla vyseta do plastových kelímků o průměru 7 cm naplněných perlitem. Po cca 2 týdnech byly sazenice s plně vyvinutými děložními listy přemístěny do plastových květináčů se směsí zahradní zeminy a zahradnického substrátu v poměru 1:1. Rostliny *L. serriola*, které sloužily k testování, byly pěstovány ve skleníku při teplotě 25 °C/15 °C (den/noc, 12hod fotoperioda), denně zalévány a 1x týdně hnojeny přípravkem Kristalon. Listy pro přípravu disků byly odebírány ze cca 10 týdnů starých rostlin.

### 4.2 Původ, charakteristika a uchování izolátu *Golovinomyces cichoracearum*

Na citlivost/rezistenci vůči fungicidům byl testován jeden izolát *Golovinomyces cichoracearum*, GC 1/11, pocházející z lociky kompasové *Lactuca serriola* (LSE/57/15) ze skleníku Katedry botaniky PřF UP v Olomouci – Holici.

Jako hostitelské rostliny pro udržování kultury tohoto izolátu sloužily semenáčky *L. serriola* (LSE/57/15). Ty byly před inokulací pěstovány ve skleníku při teplotě 25 °C/15°C (den/noc, 12hod fotoperioda). Kultura padlí pak byla udržována na těchto rostlinách ve fytotronu při teplotě 22 °C/18 °C (den/noc, 12hod fotoperioda) a intenzitě osvětlení 100 μmol/m<sup>2</sup>/s pod plastovými kryty, aby bylo zabráněno šíření konidií. V pravidelných 2 – 3 týdenních intervalech byla prováděna reinokulace přiložením listu s udržovanou kulturou izolátu na list nenapadené rostliny *L. serriola*.

### 4.3 Charakteristika použitých fungicidních přípravků

**BIOAN** (výrobce AgroBio Opava, Česká republika)

Bioan patří mezi kontaktní fungicidy s účinkem proti houbovým chorobám, především padlí na okurkách, rajčatech, angreštu, rybízu, růžích aj. Jeho účinnými látkami jsou lecitin a albumin + mléčný kasein.

**KUMULUS WG** (výrobce BASF SE, Německo)

Kumulus WG je fungicid s projektivním kontaktním účinkem. Jeho účinnou látkou je síra. Působí proti houbovým patogenům ze skupiny pravých padlí a vykazuje také vedlejší akaricidní účinek.

**ORTIVA** (výrobce Syngenta Limited, Velká Británie)

Ortiva je systémový protektivní širokospektrální fungicid, účinný proti původcům chorob ze skupin *Oomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* a *Deuteromycetes*. Účinná

látka je azoxystrobin ze skupiny strobilurinových derivátů se systémovými a translaminárními vlastnostmi. Inhibuje klíčení spor i růst mycelia. Přípravek působí dlouhodobě, a tak může zabránit vzniku nové infekce po dobu 3 – 8 týdnů.

**SCORE 250 EC** (výrobce Syngenta Crop Protection AG, Švýcarsko)

Score 250 EC je fungicidem se systémovým účinkem proti houbám z rodů *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* a *Deuteromycetes*. Jeho účinnou látkou je difenoconazol. Přípravek má dlouhotrvající preventivní, ale i kurativní účinek, který vykazuje 72 – 96 hodin po vzniku infekce.

**TALENT** (výrobce Dow AgroSciences s. r. o., Česká republika)

Talent obsahuje účinnou látku myclobutanil. Účinnost je preventivní, kurativní a částečně také eradikativní. Pohyb účinné látky v pletivech je omezený (lokálně systemický). TALENT působí proti celé řadě houbových chorob, především pak vůči původcům padlí a strupovitosti. Používá se především k ochraně ovocných dřevin a okrasných rostlin, ale také např. rajčat.

**TOPAS 100 EC** (výrobce Syngenta Crop Protection AG, Švýcarsko)

Topas 100 EC patří mezi základní fungicidy proti padlí, zejména pak na jabloních a vinné révě. Používá se ale také k ochraně rajčat, paprik a okurek. Je to systemický fungicid s účinnou látkou penconazolem, který působí především na mycelium, respektive hyfy. Použití je preventivní i kurativní.

#### **4.4 Modifikovaná metoda listových disků**

Pro detekci účinnosti fungicidů vůči *Golovinomyces cichoracearum* byla použita modifikovaná metoda listových disků (Anonymus, 1982; Lebeda, 1984).

Pro testování bylo vybráno 6 fungicidních přípravků: Bioan (účinná látka lecitin a albumin + mléčný kasein), Kumulus WG (ú. l. síra), Ortiva (ú. l. azoxystrobin), Score 250 EC (ú. l. difenoconazol), Talent (ú. l. myclobutanil) a Topas 100 EC (ú. l. penconazol). Všechny tyto fungicidy byly testovány v pěti koncentracích, přičemž jedna byla doporučená výrobcem, dvě nad a dvě pod touto hranicí, viz Tab. 3. Jako kontrola sloužila destilovaná voda. Protože v České republice neexistují přípravky, které by byly doporučovány přímo pro kontrolu padlí čekankového, jedná se o fungicidy s deklarovaným účinkem vůči padlí na tykvovitých rostlinách a rajčatech.

Tabulka 3 Testované koncentrace fungicidů pro metodu listových disků

| Fungicid     | Koncentrace přípravku [%] |       |       |       |       |
|--------------|---------------------------|-------|-------|-------|-------|
|              | I                         | II    | III*  | IV    | V     |
| BIOAN        | 0,5                       | 1     | 2     | 4     | 8     |
| KUMULUS WG   | 0,100                     | 0,200 | 0,450 | 0,900 | 1,800 |
| ORTIVA       | 0,050                     | 0,100 | 0,200 | 0,400 | 0,800 |
| TALENT       | 0,005                     | 0,010 | 0,020 | 0,040 | 0,080 |
| TOPAS 100 EC | 0,010                     | 0,025 | 0,050 | 0,100 | 0,200 |
| SCORE 250 EC | 0,005                     | 0,015 | 0,025 | 0,050 | 0,100 |

\* = koncentrace doporučená výrobcem

Listové disky o průměru 15 mm byly vyříznuty z listů cca 10 týdnů starých rostlin *Lactuca serriola* pomocí korkovrtu. Listové disky byly získány minimálně ze tří rostlin daného genotypu. Pro každou koncentraci daného fungicidu bylo použito pět disků ve třech opakováních. Listové disky byly následně ponořeny do plastových misek o průměru 9 cm s roztokem testovaného fungicidu příslušné koncentrace a máčeny po dobu 30 minut. Poté byly disky z roztoku vyjmuty a narovnány adaxiální stranou do plastových krabiček (4 cm x 7 cm x 10 cm), které byly vystlány tenkou vrstvou buničité vaty a filtračním papírem a navlhčeny destilovanou vodou. Následně byly krabičky uzavřeny víčkem na 24 hodin.

Po 24 hodinách byly disky inokulovány izolátem *Golovinomyces cichoracearum* GC 1/11 přiložením napadeného listu *L. serriola*, pokrytého sporulujícím myceliem. Inkubace probíhala ve fytotronu při teplotě 24 °C/18 °C (den/noc) při 12 hodinové fotoperiodě (Příloha, Obr. 1).

#### 4.4.1 Hodnocení intenzity sporulace

Intenzita sporulace na listových discích byla hodnocena ve 3 – 5 denních intervalech, přičemž první hodnocení bylo provedeno 5. a poslední 14. den po inokulaci, kdy byl také stanoven celkový stupeň napadení. K vyhodnocení byla použita kvantitativní metoda, vyjadřující plochu rostlinného pletiva postiženého chorobou (Příloha, Obr. 2 – 4), a také metoda kvalitativní, kdy je hodnocena přítomnost nebo absence choroby (Lebeda et al., 2012a, 2013).



### **Kvantitativní hodnocení**

0 – žádné symptomy napadení

1 – ojedinělé léze padlí

2 – vyvinuté mycelium, intenzivní sporulace, pokrývá <50 % povrchu disku

3 – vyvinuté mycelium, intenzivní sporulace, pokrývá >50 % povrchu disku

Následně byl vyjádřen celkový stupeň infekce v procentech (Towsend a Heuberger, 1943):

$$P = \frac{\sum(n \cdot v)}{x \cdot N} \cdot 100$$

P = celkový stupeň napadení

n = počet disků v každé kategorii napadení

v = stupeň napadení

x = maximální stupeň napadení

N = celkový počet hodnocených disků

### **Kvalitativní hodnocení**

Ke kvalitativnímu hodnocení se používá tříbodová stupnice:

- ..... senzitivní reakce, stupeň napadení 0 – 10 %

(-) ... tolerantní reakce, stupeň napadení 10,1 – 34,9 %

+ ..... rezistentní reakce, stupeň napadení  $\geq$  35 %

#### **4.5 Modifikovaný skleníkový (polní) pokus**

Další metodou, která byla použita pro sledování účinnosti fungicidních přípravků vůči *G. cichoracearum* byl tzv. modifikovaný skleníkový (polní) pokus. Pro tento experiment bylo použito 8 rostlin *L. serriola* (LSE/57/15) pro každý fungicid a 8 neošetřených, které sloužily jako kontrola. Na zdravých rostlinách o stáří cca 12 týdnů byl proveden postřik roztoky testovaných fungicidů o koncentracích doporučených výrobcem, viz Tab. 4. Po oschnutí byly rostliny randomizovaně rozmístěny ve skleníku a mezi ně byly rozmístěny již napadené rostliny *L. serriola*, jejichž listy byly silně pokryty sporulujícím myceliem *G. cichoracearum* (Příloha, Obr. 5).

Tabulka 4 Testované koncentrace fungicidů při skleníkovém (polním) pokusu

| Fungicid     | Koncentrace přípravku [%] |
|--------------|---------------------------|
| BIOAN        | 2,000                     |
| KUMULUS WG   | 0,450                     |
| ORTIVA       | 0,200                     |
| TALENT       | 0,020                     |
| TOPAS 100 EC | 0,050                     |
| SCORE 250 EC | 0,025                     |

#### 4.5.1 Hodnocení účinnosti fungicidů při modifikovaném skleníkovém (polním) pokusu

Hodnocení bylo provedeno 7, 14 a 21 dní po aplikaci fungicidu. Kvantitativně byla vyhodnocena intenzita sporulace na jednotlivých listech a následně byl stanoven celkový stupeň napadení (Lebeda a Mieslerová, 1998).

##### Kvantitativní hodnocení

Pro toto hodnocení byla použita následující pětibodová stupnice intenzity sporulace (procento listové plochy pokryté sporulujícím myceliem houby – stupeň napadení) (Lebeda 1984, 1986):

0 – žádné příznaky

1 – stupeň napadení (SN) < 25 %

2 – SN 25 – 50 %

3 – SN 50 – 75 %

4 – SN > 75 %

Počet hodnocených listů na rostlině: 10

Počet hodnocených rostlin na jednu účinnou látku: 8

Celkový počet hodnocených listů: 80

Následně byl opět vyjádřen celkový stupeň infekce v procentech (Towsend a Heuberger, 1943):

$$P = \sum(n \cdot v) \cdot 100/x \cdot N$$

P = celkový stupeň napadení

n = počet listů v každé kategorii napadení

v = stupeň napadení

x = maximální stupeň napadení

N = celkový počet hodnocených listů

#### **4.6 Mikroskopické sledování vývoje *Golovinomyces cichoracearum* po aplikaci fungicidů**

Z cca 10 týdnů starých rostlin *Lactuca serriola* byly pomocí korkovrtu vyříznuty listové disky o průměru 15 mm. Disky byly získány z minimálně 3 rostlin daného genotypu. Listové disky byly následně zpracovány stejně, jako tomu bylo u modifikované metody listových disků, viz 4.4. Testovány byly koncentrace doporučené výrobcem (Tabulka 4). Pro každý fungicid/časový interval byl hodnocen vývoj patogena na 5 listových discích.

Po inokulaci byly disky v přesných časových intervalech odebírány (6, 48 a 168 hodin po inokulaci (hpi)). Odebrané listové disky byly vkládány do lahvíček naplněných ledovou kyselinou octovou, aby došlo k odbarvení chlorofylu. Po 48 hodinách byly přemístěny do glycerolu (Lebeda a Reinink, 1994) a po přenesení na podložní sklo byly barveny 1% roztokem Anilin blue pro zlepšení viditelnosti houbových struktur. Struktury na discích poté byly pozorovány pod světelným mikroskopem Olympus DP 70 při stonásobném zvětšení.

Na listových discích odebíraných 6 hodin po inokulaci (6 hpi) bylo určováno procento klíčících konidií. Celkový počet sledovaných konidií na 5 listových discích byl 100. U disků odebíraných 48 hpi byl stanovován počet klíčících vláken (1 - 3) na konidii, konkrétně jejich procento z celkového počtu sta klíčících vláken. Na discích odebíraných 168 hpi byla hodnocena sporulace semikvantitativní metodou. Na každém listovém disku bylo spočítáno množství konidioforů a rozděleno do čtyř kategorií:

0 - žádný výskyt konidioforů na disku

$10^1$  -  $10^2$  - více než deset a méně než sto konidioforů na disku

$10^2$  -  $10^3$  - více než sto a méně než tisíc konidioforů na disku

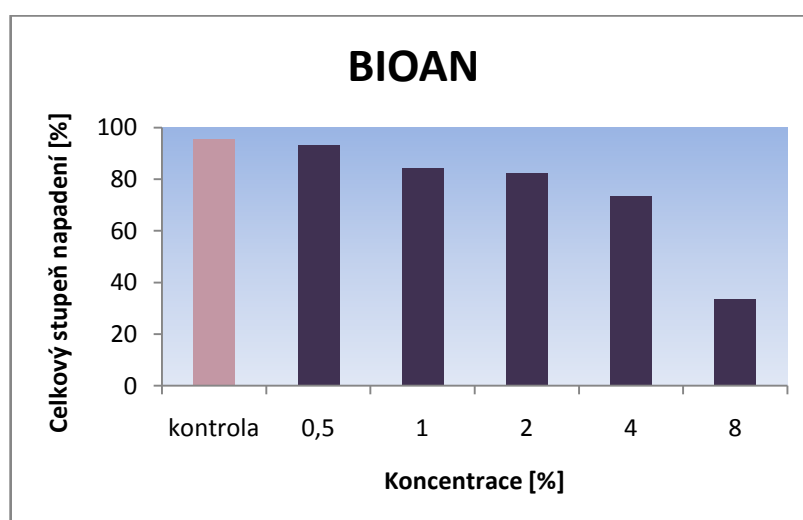
$> 10^3$  - více než tisíc konidioforů na disku

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Účinnost testovaných fungicidů vůči *Golovinomyces cichoracearum* GC 1/11 – modifikovaná metoda listových disků

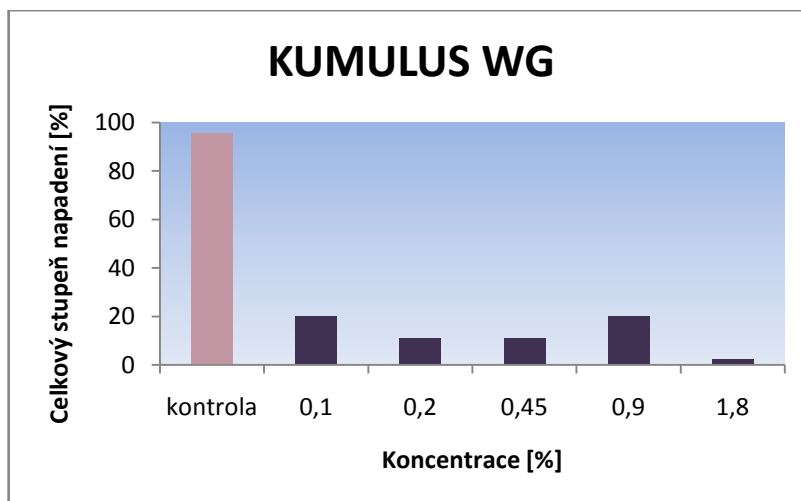
Modifikovaná metoda listových disků se pro zjišťování účinnosti fungicidů vůči houbovým patogenům používá již od 80. let (Anonymus, 1982; Lebeda, 1984). Dosud však nebyla použita pro testování účinnosti fungicidních přípravků vůči *Golovinomyces cichoracearum* na rodu *Lactuca*. V této práci se modifikovaná metoda listových disků ukázala jako vhodná pro toto testování.

Přípravek BIOAN (ú. l. lecitin a albumin + mléčný kasein) se projevil jako zcela neúčinný. Testovaný patogen vykazoval rezistentní reakci vůči čtyřem testovaným koncentracím, pouze při nejvyšší použité koncentraci došlo k reakci tolerantní (Graf 1, Tabulka 5).



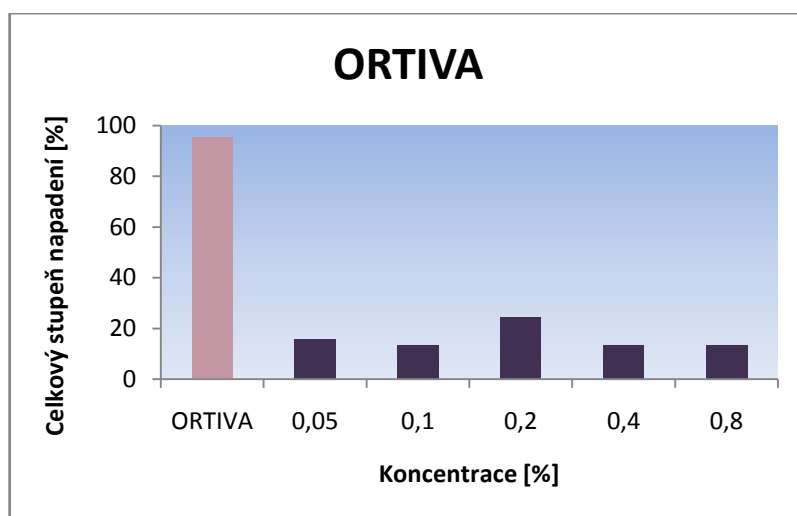
Graf 1 Srovnání celkového stupně napadení *G. cichoracearum* GC 1/11 u jednotlivých koncentrací přípravku Bioan

Přípravek Kumulus WG (ú. l. síra) byl účinný pouze při použití nejvyšší koncentrace. Ve všech nižších koncentracích patogen vykazoval tolerantní reakci, přičemž stupeň napadení neměl s rostoucí koncentrací klesající tendenci (Graf 2, Tabulka 5).



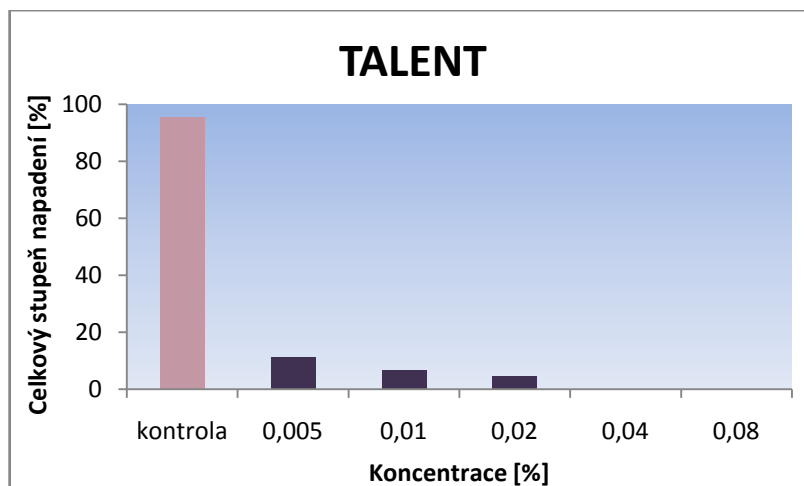
Graf 2 Celkový stupeň napadení u jednotlivých koncentrací přípravku Kumulus WG

U přípravku Ortiva (ú. l. azoxystrobin) byla zaznamenána tolerantní reakce vůči všem testovaným koncentracím (Tabulka 5). Jak je patrné z Grafu 3, stupeň napadení nekoreloval s použitou koncentrací, u koncentrace doporučené výrobcem byl dokonce nejvyšší.



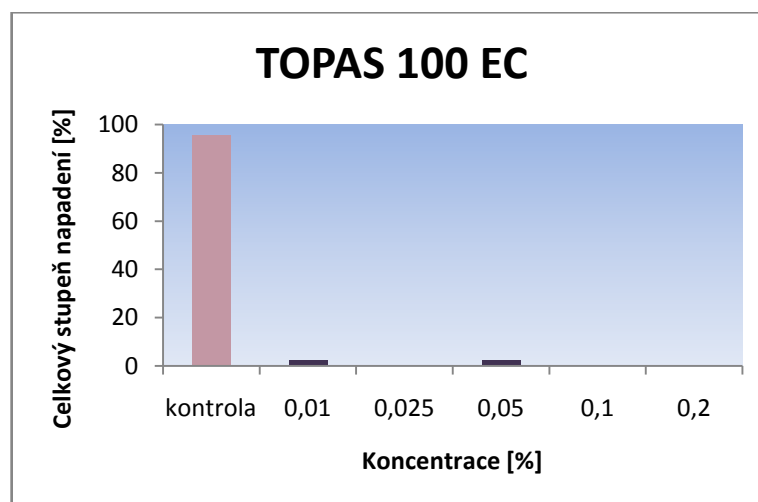
Graf 3 Srovnání celkového stupně napadení u jednotlivých koncentrací přípravku Ortiva

Přípravek Talent (ú. l. difenoconazol) se dá vůči testovanému patogenu považovat za účinný fungicid. Při použití nejnižší koncentrace se objevila tolerantní reakce. Při všech vyšších koncentracích byla však reakce senzitivní, přičemž u dvou nejvyšších koncentrací byl zaznamenán nulový stupeň napadení (Graf 4, Tabulka 5).



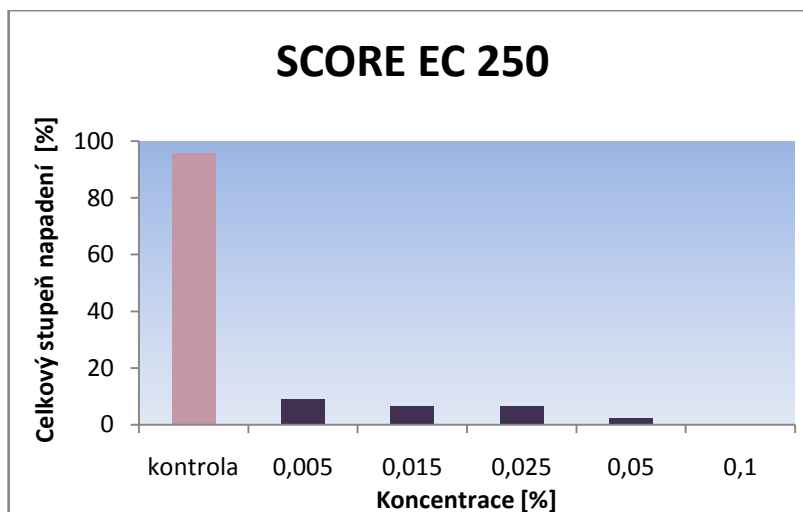
Graf 4 Srovnání celkového stupně napadení u jednotlivých koncentrací přípravku Talent

Přípravek Topas (ú. l. myclobutanil) vykazoval vysokou účinnost. Patogen byl senzitivní ke všem testovaným koncentracím. Na třech testovaných koncentracích dokonce nedošlo k žádnému napadení a přípravek tak byl 100% účinný (Graf 5, Tabulka 5).



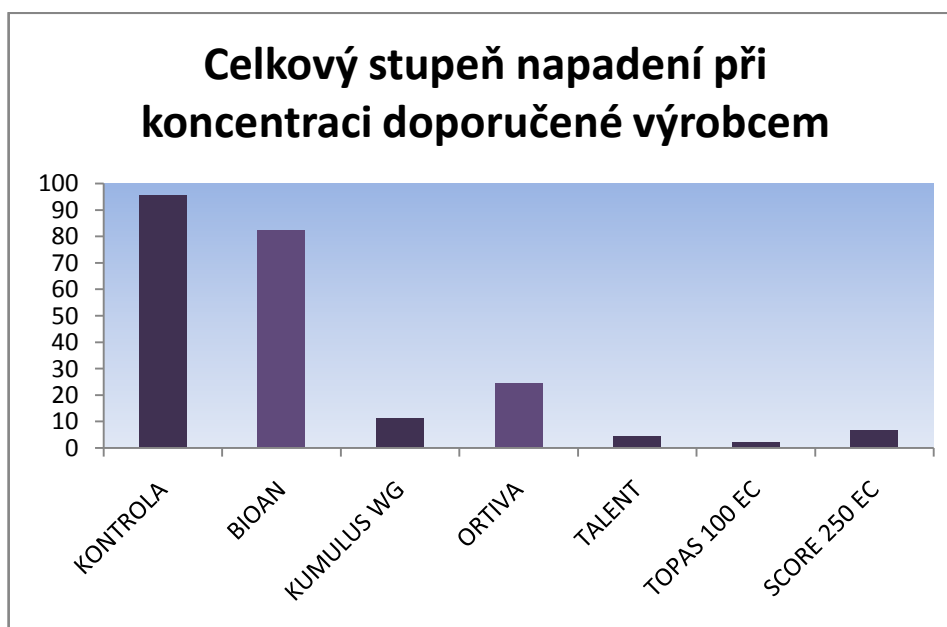
Graf 5 Srovnání celkového stupně napadení u jednotlivých koncentrací přípravku Topas 100 EC

Přípravek Score 250 EC (ú. l. penconazol) byl také velmi účinný. Patogen nevykázal rezistentní ani tolerantní reakci na žádné z testovaných koncentrací. Stupeň napadení klesal s rostoucí koncentrací, přičemž při nejvyšší použité nedošlo k napadení vůbec (Graf 6, Tabulka 5).



Graf 6 Srovnání celkového stupně napadení u jednotlivých koncentrací přípravku Score 250 EC

Pro testování bylo vybráno 6 fungicidů. Na základě výsledků se za účinné vůči patogenu *G. cichoracearum* GC 1/11 při koncentraci doporučené výrobcem dají považovat pouze 3 – Talent, Topas 100 EC a Score 250 EC, kdy nejefektivnější kontrolu vykazoval druhý zmiňovaný. K rezistentní reakci při doporučené koncentraci došlo pouze u přípravku BIOAN (Graf 7, Tab. 5 a 6).



Graf 7 Celkový stupeň napadení *G. cichoracearum* GC 1/11 při koncentraci doporučené výrobcem

Tabulka 5 Intenzita sporulace izolátu *G. cichoracearum* GC 1/11 14 dní po ošetření fungicidními přípravky

| Fungicid      | Intenzita sporulace [%] |      |       |      |      |
|---------------|-------------------------|------|-------|------|------|
|               | I.                      | II.  | III.* | IV.  | V.   |
| KONTROLA      | 95,6                    |      |       |      |      |
| BIOAN         | 93,2                    | 84,3 | 82,2  | 73,4 | 33,4 |
| KUMULUS<br>WG | 20                      | 11,1 | 11,1  | 20   | 2,2  |
| ORTIVA        | 15,6                    | 13,3 | 24,4  | 13,3 | 133  |
| TALENT        | 11,1                    | 6,7  | 4,4   | 0    | 0    |
| TOPAS 100 EC  | 2,2                     | 0    | 2,2   | 0    | 0    |
| SCORE 250 EC  | 8,9                     | 6,7  | 6,7   | 2,2  | 0    |

\* = koncentrace doporučená výrobcem

\*\* I., II., III., IV., V. = jednotlivé koncentrace přípravků, viz Tabulka 3

Tabulka 6 Typ reakce v závislosti na koncentraci fungicidu

| Fungicid     | Koncentrace fungicidů/<br>typ reakce |     |       |     |     |
|--------------|--------------------------------------|-----|-------|-----|-----|
|              | I.                                   | II. | III.* | IV. | V.  |
| KONTROLA     | +                                    |     |       |     |     |
| BIOAN        | +                                    | +   | +     | +   | (-) |
| KUMULUS WG   | (-)                                  | (-) | (-)   | (-) | -   |
| ORTIVA       | (-)                                  | (-) | (-)   | (-) | (-) |
| TALENT       | (-)                                  | -   | -     | -   | -   |
| TOPAS 100 EC | -                                    | -   | -     | -   | -   |
| SCORE 250 EC | -                                    | -   | -     | -   | -   |

\* = koncentrace doporučená výrobcem

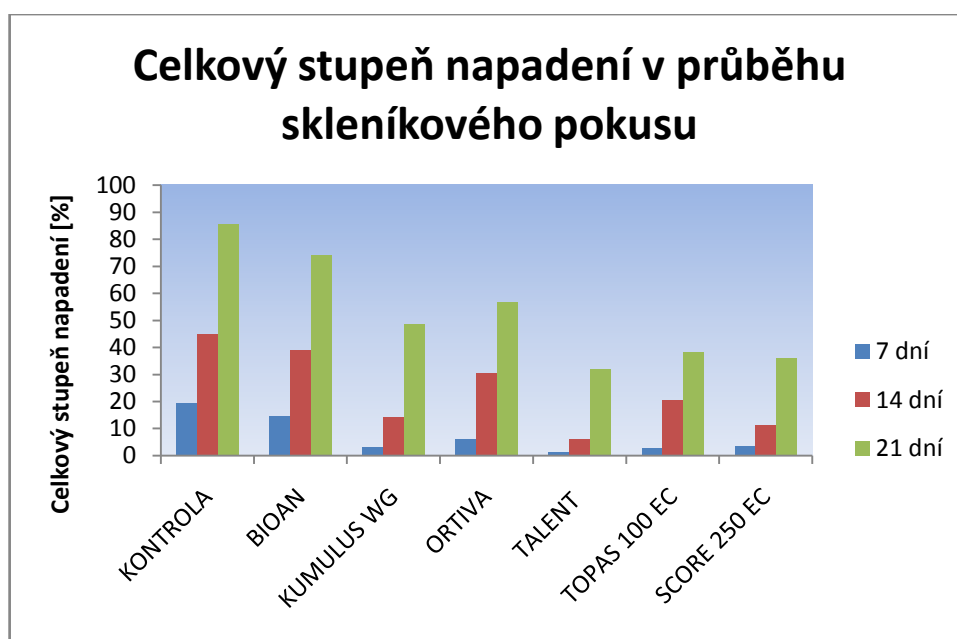
\*\* I., II., III., IV., V. = jednotlivé koncentrace přípravků, viz Tabulka 3

+ ... rezistentní reakce, (-) ... tolerantní reakce, - ... senzitivní reakce



## 5.2 Účinnost testovaných fungicidů vůči *Golovinomyces cichoracearum* GC 1/11 – modifikovaný skleníkový (polní) pokus

Během modifikovaného skleníkového (polního) pokusu byla testována účinnost 6 fungicidních přípravků o koncentracích doporučených výrobcem vůči jednomu izolátu *Golovinomyces cichoracearum* na *Lactuca serriola*. Jak je patrné z Grafu 8, všechny fungicidy vykazovaly ve srovnání s neošetřenými vzorky jistou míru kontroly, 100% účinnosti však nedosáhl žádný z nich. Jako nejúčinnější fungicidy se v tomto experimentu ukázaly přípravky Talent, Topas 100 EC a Score 250 EC. V prvním a druhém týdnu také přípravek Kumulus WG, po třech týdnech však celkový stupeň napadení rapidně vzrostl. Nižší míru účinnosti vykazoval přípravek Ortiva (Příloha, Obr. 6 a 7), vůbec nejnižší pak přípravek Bioan. Jak je patrné z Grafu 8 a Tabulky 7, celkový stupeň napadení v průběhu času výrazně rostl jak u neošetřených, tak i ošetřených rostlin. 3 týdny po aplikaci fungicidního postřiku byl celkový stupeň napadení poměrně vysoký u všech testovaných rostlin. Ukázalo se tedy, že by bylo pro lepší ochranu žádoucí aplikaci fungicidů opakovat v kratších intervalech, jak také doporučují někteří z výrobců.



Graf 8 Celkový stupeň napadení *G. cichoracearum* GC 1/11 v průběhu skleníkového (polního) pokusu

Tabulka 7 Intenzita sporulace 7, 14 a 21 dní po aplikaci fungicidů

| Fungicid     | Celkový stupeň napadení [%] |       |      |
|--------------|-----------------------------|-------|------|
|              | I.                          | II.   | III. |
| KONTROLA     | 19,35                       | 44,65 | 85,5 |
| BIOAN        | 14,5                        | 38,8  | 74   |
| KUMULUS WG   | 3,1                         | 14,1  | 48,5 |
| ORTIVA       | 5,9                         | 30,4  | 56,9 |
| TALENT       | 1,25                        | 5,95  | 31,9 |
| TOPAS 100 EC | 2,8                         | 20,3  | 38,2 |
| SCORE 250 EC | 3,4                         | 11,3  | 36   |

I. – 7 dní, II. – 14 dní, III. – 21 dní po aplikaci fungicidů

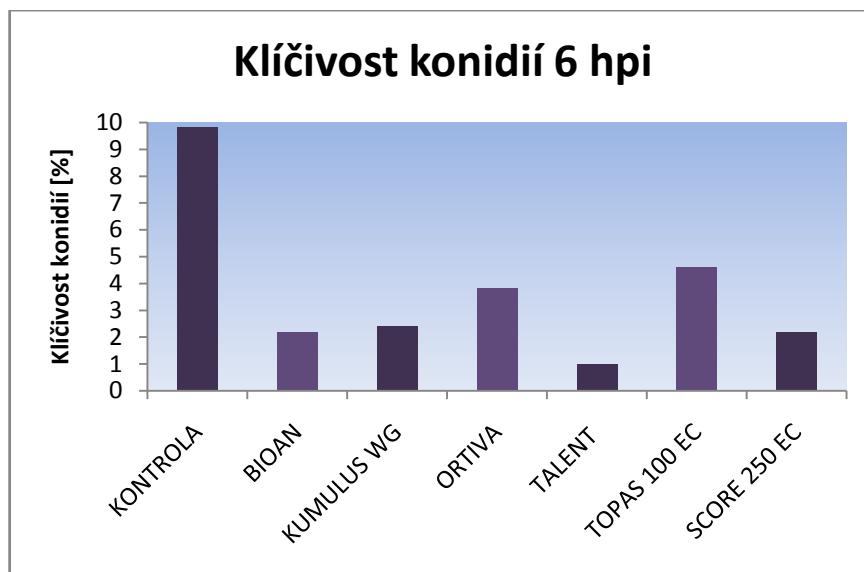
### 5.3 Mikroskopické sledování vývoje *Golovinomyces cichoracearum* po aplikaci fungicidů

#### 5.3.1 Klíčivost patogena

Klíčivost konidií *G. cichoracearum* byla zjišťována 6 hodin po inokulaci. Stupeň klíčivosti nebyl u žádného ze vzorků příliš vysoký, nepřekročil 10 % (Tabulka 8), přesto byla na discích máčených pouze ve vodě pozorována klíčivost výrazně vyšší, než tomu bylo u disků ošetřených fungicidy (Tabulka 8, Graf 9). V rámci testovaných fungicidů byl nejvyšší stupeň klíčivosti zaznamenán u přípravku Topas 100 EC – 4,6 %, o něco nižší pak u přípravku Ortiva – 3,8 % (Příloha, Obr. 8). Nejnižší, téměř nepatrné klíčení bylo zaznamenáno u přípravku Talent – 1 %.

Tabulka 8 Klíčivost konidií *G. cichoracearum* GC 1/11 6 hodin po inokulaci

| Fungicid     | Klíčivost [%] |
|--------------|---------------|
| KONTROLA     | 9,8           |
| BIOAN        | 2,2           |
| KUMULUS WG   | 2,4           |
| ORTIVA       | 3,8           |
| TALENT       | 1             |
| TOPAS 100 EC | 4,6           |
| SCORE 250 EC | 2,2           |



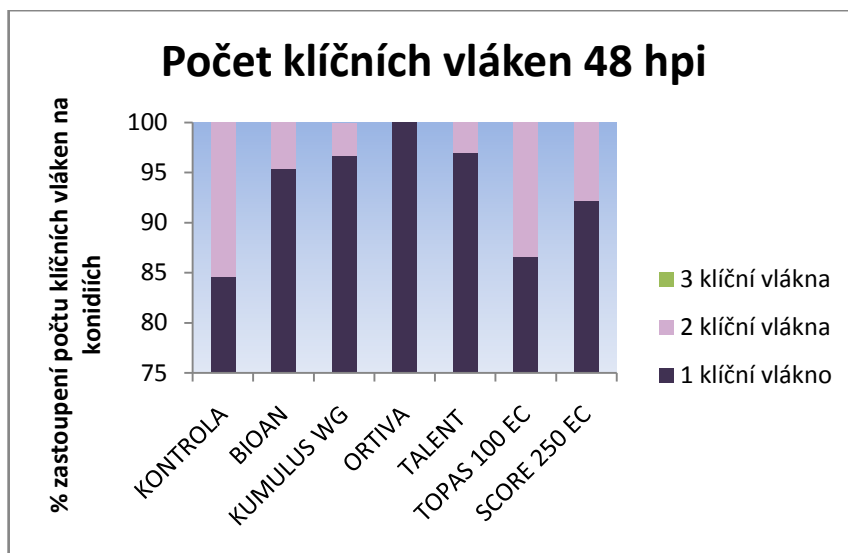
Graf 9 Srovnání klíčivosti konidií 6 hodin po inokulaci

### 5.3.2 Počet klíčících vláken na konidiích

48 hodin po inokulaci byl sledován vývoj klíčících vláken na jednotlivých konidiích. 3 klíčící vlákna nebyla nalezena u žádného z mikroskopovaných vzorků. Procento konidií s 2 klíčícími vlákny bylo variabilní (Tabulka 9, Graf 10), nejvyššího stupně dosahovalo v případě kontroly a přípravku Topas 100 EC (Příloha, Obr. 9), nejnižšího u přípravků Talent a Kumulus WG. U přípravku Ortiva měly všechny pozorované konidie pouze 1 klíčící vlákno.

Tabulka 9 Počet klíčících vláken na konidiích *G. cichoracearum* GC 1/11 48 hodin po inokulaci

| Fungicid     | 1 klíčící vlákno [%] | 2 klíčící vlákna [%] | 3 klíčící vlákna [%] |
|--------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| KONTROLA     | 84,6                 | 15,4                 | 0                    |
| BIOAN        | 95,4                 | 4,6                  | 0                    |
| KUMULUS WG   | 96,7                 | 3,3                  | 0                    |
| ORTIVA       | 100                  | 0                    | 0                    |
| TALENT       | 97                   | 3                    | 0                    |
| TOPAS 100 EC | 86,6                 | 13,4                 | 0                    |
| SCORE 250 EC | 92,2                 | 7,8                  | 0                    |



Graf 10 Počet klíčních vláken konidií *G. cichoracearum* 48 hodin po inokulaci

### 5.3.3 Sporulace

Stupeň sporulace byl zjišťován na discích odebíraných 168 hodin po inokulaci. Sporulace byla dle očekávání zaznamenána u kontrolních vzorků, a to v míře  $10^2 - 10^3$  (Příloha, Obr. 10). Nižší stupeň sporulace ( $10^1 - 10^2$ ) byl zaznamenán také na discích máčených v přípravku Bioan. U disků ošetřených ostatními fungicidy nebyla sporulace 168 hpi zaznamenána.

## 6 DISKUZE

V předložené bakalářské práci byla testována účinnost 6 vybraných fungicidních přípravků vůči jednomu izolátu *Golovinomyces cichoracearum* (GC 1/11) na *Lactuca serriola* jednoho genotypu. Modifikovaná metoda listových disků, která se pro podobné experimenty používá (Anonymus, 1982; Lebeda, 1984; Sedláková a Lebeda, 2008), se ukázala jako vhodná i pro toto testování. Jak poukázali Schnathorst a Bardin (1958 in Lebeda a Mieslerová, 2011) při testování citlivosti salátových kultivarů vůči padlí, výsledky laboratorních a polních studií se mohou lišit. Z tohoto důvodu byla disková metoda doplněna o modifikovaný skleníkový (polní) pokus, který měl za cíl simulovat reálnou situaci. Experimentální část byla také doplněna o mikroskopické sledování vývoje padlí, kdy byla ověřována inhibice klíčení spor a růstu mycelia, kterou deklarují výrobci.

Přípravek Bioan (ú. l. lecitin a albumin + mléčný kasein) se při testování na listových discích ukázal jako zcela neúčinný, stejný výsledek však přinesl i pokus ve skleníku, kdy tento fungicid vykazoval jen o málo menší stupeň napadení, než tomu bylo u neošetřených rostlin. Přestože 6 hodin po inokulaci vykazoval patogen pouze malé procento klíčivosti a po 48 hodinách mělo přes 95 % spor pouze 1 klíčící vlákno, po 168 hodinách byl tento přípravek jediným, u kterého došlo ke sporulaci. Protože je tento prostředek vyroben pouze z přírodních potravinářských surovin, je i výrobcem doporučován spíše k podpoře zdraví rostlin a prevenci.

Přípravek Kumulus WG (ú. l. síra) vykazoval vysokou účinnost pouze při nejvyšší použité koncentraci během modifikované metody listových disků. Při nižších koncentracích testovaný izolát reagoval tolerantně. Toto zjištění odpovídá výsledkům Matherona a Purchase (1998), kteří na *Lactuca* spp. zaznamenali nižší účinnost sirných fungicidů vůči *G. cichoracearum* ve srovnání s jinými chemickými skupinami. Klíčivost konidií 6 hpi byla nízká, stejně jako množství dvou klíčících vláken na konidiích. V modifikovaném skleníkovém (polním) pokusu se objevil stupeň napadení, který patřil k nejnižším 7 i 14 dní po aplikaci, při posledním hodnocení však rapidně vzrostl. Tato skutečnost poukazuje na nutnost opakování aplikace, jež výrobce doporučuje každých 5 – 10 dní.

Testovaný izolát vůči přípravku Ortiva (ú. l. azoxystrobin) vykazoval tolerantní reakci vůči všem použitým koncentracím při modifikované metodě listových disků. Ve srovnání s ostatními tento prostředek vykazoval nižší účinnost i během pokusu ve

skleníku a mírně vyšší klíčení konidií 6 hpi, přestože 48 hpi u něj jako u jediného nebyl zaznamenán výskyt konidií se dvěma vlákny. Účinná látka azoxystrobin patří mezi QoI fungicidy, má specifický způsob účinku, a tedy vysoké riziko vzniku rezistence v populaci patogena. Rezistence k této skupině je charakterizována jako kvalitativní, patogen by tak měl být vysoce citlivý, či vysoce rezistentní (McGrath, 2001). Toto však u testovaného izolátu nebylo potvrzeno. O rezistenci k azoxystrobinu v populacích *G. cichoracearum* zatím v zahraniční literatuře nejsou zmínky, v České republice však byla rezistence zaznamenána u příbuzného druhu *G. cucurbitacearum* (syn. *G. orontii*, dříve *G. cichoracearum*), v letech 2007-2008 měl dokonce počet rezistentních kmenů rostoucí charakter (Jeřábková, 2010). Paulík (2011) však zaznamenal zvýšení počtu kmenů senzitivních a naopak snížení počtu kmenů *G. cucurbitacearum* (pův. *G. cichoracearum*) zcela rezistentních k azoxystrobinu.

Přípravek Talent (ú. l. myclobutanil) se ukázal jako velmi účinný fungicid vůči testovanému izolátu, přestože při nejnižší koncentraci při testování na listových discích vykazoval tolerantní reakci, při vyšších koncentracích padlí účinně kontroloval, nejnižší stupeň napadení ze všech testovaných fungicidů se také objevil při skleníkovém pokusu. Klíčení konidií 6 hpi dosahovalo pouze 1 % a počet konidií se dvěma vlákny byl rovněž velmi nízký. Tato zjištění korelují s výsledky Matherona a Purchase (2000), dle kterých myclobutanil vykazoval vysokou efektivitu kontroly *G. cichoracearum* na *Lactuca* spp. Vysoká účinnost myclobutanilu vůči padlí obecně byla zaznamenána také během studií provedených do roku 2010 v USA, tedy 10 let od příchodu této látky na trh (McGrath a Hunsberger, 2011).

Přípravek Topas 100 EC (ú. l. penconazol) byl při modifikované metodě listových disků jednoznačně nejúčinnější. Byl vysoce efektivní při použití všech koncentrací, při 3 z nich dokonce nedošlo k žádné sporulaci. Mezi 3 nejúčinnější fungicidy se zařadil také v modifikovaném skleníkovém (polním) pokusu. U tohoto přípravku však byla objevena nejvyšší míra klíčivosti 6 hpi a také nejvyšší procento konidií se dvěma vlákny 48 hpi. Toto zjištění koresponduje s informací výrobce, který uvádí, že tento prostředek působí především na již vzniklé mycelium a brání tak sporulaci, ke které 168 hpi nedošlo.

Posledním testovaným byl přípravek Score 250 EC (ú. l. difenoconazol). Tento fungicid byl rovněž vůči testovanému izolátu účinný. Při metodě listových disků došlo ke kontrole patogena při všech koncentracích, při použití nejvyšší koncentrace dokonce nebyl zaznamenán žádný stupeň napadení. Tento přípravek také patřil ke třem

nejúčinnějším fungicidům při testování ve skleníku. Klíčivost konidií byla 6 hpi nízká, procento konidií se dvěma klíčovými vlákny však bylo ve srovnání s ostatními přípravky druhé nejvyšší po přípravku Topas 100 EC, který působí podobně.

Jak je patrné z výše zmíněného, výsledky získané pomocí modifikované metody listových disků korelovaly s výsledky získanými pomocí modifikovaného skleníkového (polního) pokusu. Mikroskopické pozorování umožnilo sledování vývoje patogena po aplikaci fungicidů. Přestože bylo pozorování prováděno v jiných časových intervalech, je možné najít paralelu s výsledky získanými prostřednictvím modifikované metody listových disků a skleníkového (polního) pokusu, a to zejména při sledování vývoje 168 hodin po inokulaci, kdy došlo ke sporulaci pouze na discích kontrolních a ošetřených přípravkem Bioan, který byl na základě výsledků makroskopických metod označen za neúčinný.

## 7 ZÁVĚR

Předložená práce se zabývá studiem účinnosti vybraných fungicidů vůči padlí čekankovému (*Golovinomyces cichoracearum*), a to na hostitelském druhu locice kompasové (*Lactuca serriola*). Protože tomuto tématu bylo věnováno jen málo prostoru v zahraničí a žádný v České republice, má tato práce zejména metodický charakter.

Po studiu dané problematiky bylo pro testování jednoho izolátu *Golovinomyces cichoracearum* (GC 1/11) na jednom genotypu *Lactuca serriola* (LSE/57/15) vybráno následujících 6 fungicidů: **Bioan** (ú. l. lecitin a albumin + mléčný kasein), **Kumulus WG** (ú. l. síra), **Ortiva** (ú. l. azoxystrobin), **Talent** (ú. l. myclobutanil), **Topas 100 EC** (ú. l. penconazol) a **Score 250 EC** (ú. l. difenoconazol). U každého z těchto přípravků bylo testováno 5 koncentrací (jedna doporučená výrobcem, dvě nad a dvě pod touto hranicí). K testování byla použita modifikovaná metoda listových disků, která se ukázala jako vhodná pro tento typ experimentu. Další metodou byl modifikovaný skleníkový (polní) pokus, kdy byly použity postřiky o koncentraci doporučené výrobcem. Získané výsledky si navzájem odpovídaly.

Jako naprosto neúčinný se ukázal přípravek **Bioan**, ke kterému testovaný izolát vykazoval rezistenci při 4 z 5 použitých koncentrací, a rovněž ve skleníku došlo k vysokému stupni napadení. Sníženou účinnost vykazoval také přípravek **Ortiva**, k rezistentní reakci u něj však nedošlo. Podobných výsledků bylo dosaženo také pomocí přípravku **Kumulus WG**, který byl účinný pouze při nejvyšší použité koncentraci. Jako vysoce efektivní se ukázaly přípravky **Talent**, **Topas 100 EC** a **Score 250 EC**.

Experimentální část byla doplněna také o mikroskopické pozorování patogena po aplikaci fungicidů. Bylo tak zjištěno, že ve srovnání s neošetřenými rostlinami všechny fungicidy v jisté míře inhibují klíčení konidií a sporulaci.

Jelikož je rod *Lactuca* významným hostitelem patogena *G. cichoracearum* a fungicidy stále zůstávají zcela stěžejním prostředkem pro ochranu rostlin, a tudíž se podílejí na snižování ekonomických ztrát, je další studium této problematiky zcela nezbytné a mohly by k němu přispět i výsledky získané v této práci.



## 8 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- Anonymous (1982): FAO Method No. 30. FAO. Plant Protection Bulletin 30: 2.
- Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., Parr-Dobrzanski, B. (2002): The strobilurin fungicides. *Pest management science*, 58(7): 649 – 662.
- Blumer, S. (1967): Echte Mehltaupilze (*Erysiphaceae*). Stuttgart, Germany, Gustav Fischer. 254 pp. In: Lebeda, A., Mieslerová, B. (2011): Taxonomy, distribution and biology of lettuce powdery mildew (*Golovinomyces cichoracearum* sensu stricto). *Plant Pathology* 60/3: 400-415.
- Brown, M. K. J. (2002): Comparative genetics of avirulence and fungicide resistance 65 in the powdery mildew fungi. In: Bélanger, R. R., Bushnell, R.W.; Dik, A. J., Carver, W. L. T. (Eds.): *The Powdery Mildews. A Comprehensive Treatise*. APS Press, St. Paul, MN, USA: 55-65.
- Braun, U. (1987): A Monograph of the *Erysiphales* (Powdery Mildews). Stuttgart, Germany: E. Schweizerbart, *Beiheft zur Nova Hedwigia* 89: 1–700.
- Braun, U. (1995): The Powdery Mildews (Erysiphales) of Europe. Stuttgart, Germany: Gustav Fischer. 337 pp.
- Braun, U. (1999): Some critical notes on the classification and the generic concept of the Erysiphaceae. *Schlechtendalia* 3: 48-54.
- Braun, U., Cook, R. T. A., Inman A. J. Shin, H. – D. (2002): The taxonomy of powdery mildew fungi. In: Bélanger RR, Bushnell WR, Dik AJ, Carver TLW, eds. *The Powdery Mildews. A comprehensive Treatise*. St Paul, MN, USA: APS Press, 13 – 55.
- Brent, K. J., Hollomon, D. W. (2007): Fungicide resistance in crop protection: How can it be managed? FRAC Monograph No. 1 (2nd edn). *CropLife International*: 1-41.
- Cook, R. T. A., Braun, U. (2009): Conidial germination patterns in powdery mildews. *Mycological Research* 113: 616–36.
- Cook, R. T. A., Inman A. J., Billings C. (1997): Identification and classification of powdery mildew anamorphs using light and scanning electron microscopy and host range data. *Mycological Research* 101: 975–1002.
- Cremlýn, R. (1985): Pesticidy. 1. Praha: SNTL: 244
- Crute, I. R., Burns, G. (1983): Powdery mildew of lettuce (*Lactuca sativa*). *Plant Pathology* 32: 455-7.

- Doležalová, I., Lebeda, A., Křístková, E. (2001): Původ a variabilita kulturních forem salátu. *Živa* 1: 20-22.
- Gallian, J. J., Miller, J. S., Nolte, P. (2006): *Managing fungicide resistance*. University of Idaho Extension: 1-6.
- Garret, K. A., Dendy, S. P., Frank, E. E., Rouse, M. N., Travers, S. E. (2006): Climate change effects on plant disease: genomes to ecosystems. *Annual Review of Phytopathology* 4: 489-509.
- Gisi, U., Sierotzki, H. (2008): Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. *European Journal of Plant Pathology* 122: 157-67.
- Hollomon, D.W., Wheeler, I.E. (2002): Controlling powdery mildews with chemistry. In: Bélanger, R.R., Bushnell, R.W., Dik, A.J. & Carver, W.L.T. (Eds.): *The Powdery Mildews. A Comprehensive Treatise*. APS Press, St. Paul, MN, USA: 249-255.
- Jahn, M., Munger, H. M., McGreight, J. D. (2002): Breeding cucurbit crops for powdery mildew resistance. In: Bélanger, R. R., Bushnell, R. W., Dik, A. J., Carver, W. L. T. (Eds.): *The Powdery Mildews. A Comprehensive Treatise*. APS Press, St. Paul, MN, USA: 239 – 248.
- Jeřábková, H. (2010): Rezistence k fungicidům v populacích padlí tykvovitých v České republice. Olomouc, 2010. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci: 84 pp.
- Joseph-Horne, T., Hollomon, D. W. (2000): Functional diversity within the mitochondrial electron transport chain of plant pathogenic fungi. *Pest management science* 56: 24-30.
- Knight, C., Holland, R. W. K., Wright, I. R. (1986). Resistance of lettuce varieties to powdery mildew. *Test of Agrochemicals and cultivars* 7: 150-1. In: Lebeda, A., Mieslerová, B. (2011): Taxonomy, distribution and biology of lettuce powdery mildew (*Golovinomyces cichoracearum* sensu stricto). *Plant Pathology* 60/3: 400–415.
- Koike, S. T., Gladders, P., Paulus, A. O. (2007): *Vegetable Diseases. A Color Handbook*. San Diego, CA, USA: Academic Press
- Koike, S. T., Saenz, G. S. (1996): Occurrence of powdery mildew, caused by *Erysiphe cichoracearum*, on endive and radicchio in California. *Plant Disease* 80: 1080.
- Kuck, K., Russel, P. E. (2006): FRAC: Combined resistance risk assessment. *Aspect of Applied Biology* 78: 3.

- Lebeda, A. (1984): Screening of wild *Cucumis* species for resistance to cucumber powdery mildew (*Erysiphe cichoracearum* and *Sphaerotheca fuliginea*). *Scientia Horticulturae*, 24: 241-249.
- Lebeda, A. (1985a): Susceptibility of some lettuce cultivars to natural infection by powdery mildew. *Tests of Agrochemicals and Cultivars* 6: 158-9.
- Lebeda, A. (1985b): Differences in resistance of wild *Lactuca* species to natural infection of lettuce powdery mildew (*Erysiphe cichoracearum*). *Euphytica* 34: 521-3.
- Lebeda, A. (1986): Padlí okurkové. *Erysiphe cichoracearum*, *Sphaerotheca fuliginea* (Cucumber powdery mildew. *Erysiphe cichoracearum*, *Sphaerotheca fuliginea*). In: A. Lebeda (Ed.): *Methods of Testing Vegetable Crops for Resistance to Plant Pathogens*, VHI Sempra, Research Institute of Vegetable crops, Olomouc: 87-91.
- Lebeda, A. (1994): Evaluation of wild *Lactuca* species for resistance of natural infection of lettuce powdery mildew (*Erysiphe cichoracearum*). *Genetic Resources and Crop Evolution* 41: 55-7.
- Lebeda A. (1999): Powdery mildew on lettuce and wild *Lactuca* species. In: *Proceedings of the First International Powdery Mildew Conference, August 29-September 2, 1999, Avignon (France)*; Abstracts, 16-7.
- Lebeda, A., Mieslerová, B. (2011): Taxonomy, distribution and biology of lettuce powdery mildew (*Golovinomyces cichoracearum* sensu stricto). *Plant Pathology* 60/3: 400–415.
- Lebeda, A., Sedláková, B. (2004): Druhové spektrum, patogenní variabilita a rezistence vůči fungicidům u padlí tykvoovitých. *Rostlinolékař*, 6: 15-19.
- Lebeda, A., Reinink, K. (1994): Histological characterization of resistance in *Lactuca saligna* to lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 44: 125–139.
- Lebeda, A., Doležalová, I., Křístková, E., Mieslerová, B. (2001): Biodiversity and ecogeography of wild *Lactuca* spp. in some European countries. *Genetic Resources and Crop Evolution* 48: 153-64.
- Lebeda, A., Widrechner, M. P., Staub, J., Ezura, H., Zalapa, J., Křístková, E. (2007): Cucurbits (*Cucurbitaceae*; *Cucumis* spp., *Citrullus* spp.), Chapter 8. In Singh, R. (Ed.): *Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement series*. Volume 3-Vegetable crops. Boca Raton, FL, USA: CRC Press: 271-376.

- Lebeda, A., Sedláková, B., Pejchar, M., Jeřábková, H. (2010): Variation for fungicide resistance among cucurbit powdery mildew populations in the Czech Republic. *Acta Horticulturae*, 871, ISHS 2010: 465-475.
- Lebeda, A., Mieslerová, B., Petrželová, I., Korbelová, P., Česneková, E. (2012a): Patterns of virulence variation in the interaction between *Lactuca* spp. and lettuce powdery mildew (*Golovinomyces cichoracearum*). *Fungal Ecology* 5: 670-682.
- Lebeda, A., Mieslerová, B., Petrželová, I., Korbelová, P. (2012b): Host specificity and virulence variation in populations of lettuce powdery mildew pathogen (*Golovinomyces cichoracearum* s. str.) from prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Mycological Progress*: 1-13.
- Lebeda, A., Mieslerová, B., Petrželová, I., Korbelová, P. (2013): Host specificity and virulence variation in populations of lettuce powdery mildew pathogen (*Golovinomyces cichoracearum* s. str.) from prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Mycological Progress* 12: 533 – 545.
- Ma, Z., Michailides, T. J. (2005): Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*. 24(10): 853–863.
- Matheron, M. E., Porchas, M. (1998): Evaluation of new fungicides for management of downy and powdery mildew of lettuce in 1998. In: Oebker, N. F. (ed.). *Vegetable: A College of Agriculture Report for 1998*. Tuscon, AZ, USA: College of Agriculture, University of Arizona: 90-3.
- Matheron, M. E., Porchas, M. (1999): Assessment of fungicide performance of powdery mildew of lettuce in 1999. In: Byrne, D. N., Baciewicz, P. (eds.). *Vegetable: A College of Agriculture Report for 1999*. Tuscon, AZ, USA: College of Agriculture, University of Arizona: 15-7.
- Matheron, M. E., Porchas, M. (2001): Reaction of different cultivars of lettuce to development of powdery mildew in 2001. In: Byrne, D. N., Baciewicz, P. (eds.) *2001 Vegetable Report*. Tuscon, AZ, USA: College of Agriculture and Life Sciences, University of Arizona: 89-90.
- Matheron, M. E., Porchas, M. (2003): Evaluation of lettuce cultivar susceptibility to powdery mildew in 2003. In: Byrne, D. N., Baciewicz, P. eds. *2003 Vegetable Report*. Tuscon, AZ, USA: College of Agriculture and Life Sciences, University of Arizona: 112-3.

- Matsuda, S., Takamatsu, S. (2003): Evolution of host–parasite relationship of *Golovinomyces* (Ascomycete: Erysiphales) inferred from nuclear rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27: 314–27.
- McCallan, S. E. A. (1967): History of Fungicides. In: *Fungicides: and advanced treatise I*. Torgeson, D. C. eds.: 1 - 37.
- McDonald, B. A., Linde, C. (2002): Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40: 349-379.
- McGrath, M. T. (2001): Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew: Experiences and Challenges. *Plant Disease*, 85: 236-245.
- McGrath, M. T. (2004): What are fungicides? *The Plant Health Instructor*: 1-11.
- McGrath, M. T. (2006): Occurrence of fungicide resistance in *Podosphaera xanthii* and impact on controlling cucurbit powdery mildew in New York. In: Holmes, G. J. (Ed.): *Cucurbitaceae 2006*, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA: 473-482.
- McGrath, M. T. (2012): Challenge of Fungicide Resistance and Anti-Resistance Strategies in Managing Vegetable Diseases in the USA. In: Thind, T. (Ed.): *Fungicide resistance in Crop Protection: Risk and Management*: 191–207.
- McGrath, M. T., Fox, G. M. (2009): Efficacy of fungicides for managing cucurbit powdery mildew and treatment impact on pathogen sensitivity to fungicides, 2008. *Plant Disease Management Reports* 3, V125.
- McGrath, M. T., Hunsberger, L. K. (2011): Efficacy of fungicides for managing cucurbit powdery mildew and pathogen sensitivity to fungicides, 2010. *Plant Disease Management Report* 5: V104.
- McGrath, M. T., Shishkoff, N. (2001): Resistance to triadimefon and benzyl: dynamics and impact on control cucurbit powdery mildew. *Plant Disease* 85(2): 147–154.
- McGrath, M. T., Shishkoff, N. (2003): First report of the cucurbit powdery mildew fungus (*Podosphaera xanthii*) resistant to strobilurin fungicides in the United States. *Plant Disease*, 87(8): 1007.
- McGrath, M. T., Staniszewska, H., Shishkoff, N., Casella, G. (1996): Fungicide sensitivity of *Sphaerotheca fuliginea* populations in the United States. *Plant Disease*, 80: 697-703.
- Mieslerová, B., Lebeda, A. (1998): Variability in response of wild *Lycopersicon* species to *Oidium lycopersicum*. In: Húska, D.: *The First Horticulture Scientific*

- Conference with Foreign Participation. Acta Horticulturae et regiotecturae, 1/1998, Nitra, 23. – 24. září 1998: 207-208.*
- Mieslerová, B., Lebeda A., Česneková, E., Petrželová, I. (2007): Interactions between wild *Lactuca* spp. and lettuce powdery mildew (*Golovinomyces cichoracearum*). In: EUCARPIA *Leafy Vegetables 2007, Conference Abstracts, 18 - 20 April 2007, Warwick, UK.* 19.
- Mieslerová, B., Lebeda, A., Česneková, E. (2009): Study od interactions of *Lactuca* spp. and lettuce powdery mildew (*Golovinomyces cichoracearum*). In: Šafránková, I., Šefrová, H. eds. XVIII *Czech and Slovak Plant Protection Conference, Brno, 2 - 4 September 2009*, 98.
- Mieslerová, B., Lebeda, A., Petrželová, I., Korbelová, P. (2013): Incidence of Lettuce Downy Mildew (*Bremia lactucae*) and Powdery Mildew (*Golovinomyces cichoracearum*) in Natural Populations of Pricly Lettuce (*Lactuca serriola*). *Plant Protecion Science* 39 (Special issue): 24-32.
- Mori, Y., Sato, Y., Takamatsu, S. (2000): Evolutionary analysis of the powdery mildew fungi using nucleotide sequences of the nuclear ribosomal DNA. *Mycologia* 92: 74-93.
- Neumann, S., Jacob, F. (1995): Principles of uptake and systemic transport of fungicides within plant. In: Lyr, H., Braun, P. (Eds.): *Modern selective fungicides: properties, applications, mechanisms of action*, Jena; Stuttgart: Fischer: 53-73.
- Paulík, R. (2011): Porovnání účinnosti vybraných fungicidů vůči padlí tykvovitých (*Golovinomyces cichoracearum*, *Podosphaera xanthii*) v České republice. Olomouc, 2011. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci: 82 pp.
- Saenz, G. S., Taylor, J. W. (1999): Phylogeny of the Erysiphales (powdery mildew) inferred from internal transcribed spacer (ITS) ribosomal DNA sequences. *Canadian Journal of Botany* 77: 150-69.
- Salmon, E. S. (1900): A new species of *Uninula* from Japan. *Journal of Botany* 37: 426–427. In Braun, U. (1995): *The Powdery Mildews (Erysiphales) of Europe*. Stuttgart, Germany: Gustav Fischer. 337 pp.
- Sedláková, B., Lebeda, A. (2008): Fungicide resistance in Czech populations of cucurbit powdery mildews. *Phytoparasitica*, 36(3): 272-289.
- Sedláková, B., Lebeda, A. (2010): Temporal population dynamics of cucurbit powdery mildews (*Golovinomyces cichoracearum* and *Podosphaera xanthii*) in the Czech

- Republic. In: Thies, J. A., Kousik, S., Levi, A. (Eds.): *Proceedings of Cucurbitaceae 2010*, Charleston, SC, USA, November 14-18, 2010: 244-247.
- Schnathorst, W. C. (1959a). Heterothallism in the lettuce strain of *Erysiphe cichoracearum*. *Mycologia* 51: 708 – 11. In: Lebeda, A., Mieslerová, B. (2011): Taxonomy, distribution and biology of lettuce powdery mildew (*Golovinomyces cichoracearum* sensu stricto). *Plant Pathology* 60/3: 400–415.
- Schnathorst, W. C. (1959c). Spread and life cycle of lettuce powdery mildew fungus. *Phytopathology* 49: 464–8. In: Lebeda, A., Mieslerová, B. (2011): Taxonomy, distribution and biology of lettuce powdery mildew (*Golovinomyces cichoracearum* sensu stricto). *Plant Pathology* 60/3: 400–415.
- Schnathorst, W. C. (1960a). Effect of temperature and moisture stress on the lettuce powdery mildew fungus. *Phytopathology* 50: 304–8. In: Lebeda, A., Mieslerová, B. (2011): Taxonomy, distribution and biology of lettuce powdery mildew (*Golovinomyces cichoracearum* sensu stricto). *Plant Pathology* 60/3: 400–415.
- Schnathorst, W. C. (1960b): Relation of microclimates to the development of powdery mildew of lettuce. *Phytopathology* 52: 41-6. In: Lebeda, A., Mieslerová, B. (2011): Taxonomy, distribution and biology of lettuce powdery mildew (*Golovinomyces cichoracearum* sensu stricto). *Plant Pathology* 60/3: 400–415.
- Schnathorst, W. C. (1965). Environmental relationship in the powdery mildew. *Annual Review of Phytopathology* 3: 343–66.
- Schnathorst, W. C., Bardin, R. (1958): Susceptibility of lettuce varieties and hybrids to powdery mildew (*Erysiphe cichoracearum*). *Plant Disease Report* 42: 1273-4. In: Lebeda, A., Mieslerová, B. (2011): Taxonomy, distribution and biology of lettuce powdery mildew (*Golovinomyces cichoracearum* sensu stricto). *Plant Pathology* 60/3: 400–415.
- Schroeder, W. T., Provvidenti, R. (1969): Resistance to benzyl in powdery mildew of cucurbits. *Plant Disease Report* 53: 271–275. In: McGrath, M. T. (2001): Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew: Experiences and Challenges. *Plant Disease*, 85: 236-245.
- Sogelová, I. (2007): Studium teplotních nároků padlí (hub řádu *Erysiphales*). Bakalářská práce. PřF Univerzita Palackého v Olomouci.
- Takamatsu, S., Hirata, T., Sato, Y. (1998): Phylogenetic analysis and predicted secondary structures of the rDNA internal transcribed spacers of the powdery mildew fungi (*Erysiphaceae*). *Mycoscience* 39: 441-53.

- Takamatsu, S., Matsuda, S., Ninomi, S., Havrylenko, M. (2006): Molecular phylogeny and evolution of the genus *Neoerysiphe* (*Erysiphaceae*, *Ascomycota*). *Mycological Research* 110: 1093–101.
- Towsend, G. R., Heuberger, W. (1943): Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Report* 27: 340 – 343.
- Tweedy, B. G. (1981): Inorganic sulphur as a fungicide. *Residue Reviews* 78: 43–68.
- Wang, Z., Johnston, P. R., Takamatsu, S., Spatafora, J. W., Hibbet D. S. (2006): Toward a phylogenetic classification of the *Leotiomyces* based on rDNA data. *Mycologie* 98: 1967-1075.
- Williams, J. S., Cooper, R. M. (2004): The oldest fungicide and newest phytoalexin-a reappraisal of the fungitoxicity of elementar sulphur. *Plant Pathology* 53: 263–279.
- Zeller, K. A., Levy, M. (1995): Intraspecies differentiation in the powdery mildew *Erysiphe cichoracearum* determined with rDNA RFLPs. *Molecular Ecology* 4: 227–83.
- Zlochová, K. (1990): Autoreferát dizertácie k získanie vedeckej hodnosti kandidáta biologických vied. Botanický ústav SAV, Bratislava, 17 pp.

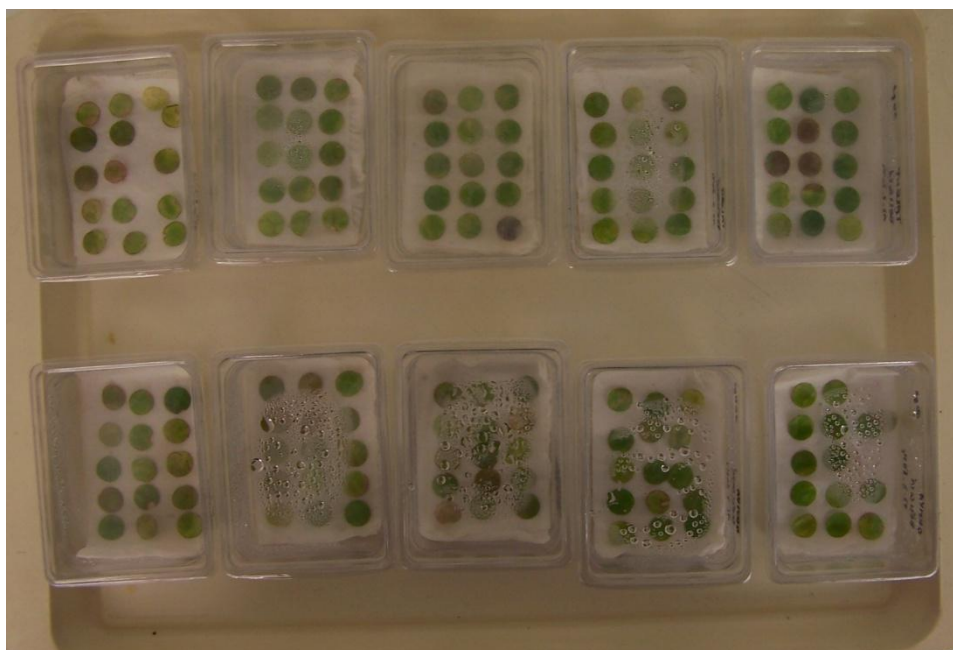
**Internetové odkazy:**

<http://frac.info/publication/anhang/2014%20FRAC%20Code%20List.pdf>

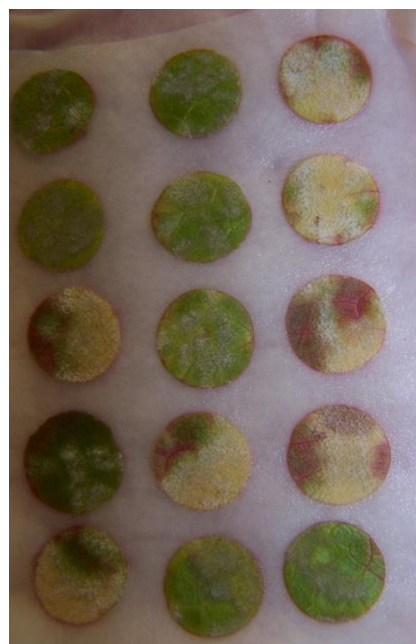
[http://eagri.cz/public/app/eagriapp/POR/Files/VESTNIK\\_2014\\_LEDEN.pdf](http://eagri.cz/public/app/eagriapp/POR/Files/VESTNIK_2014_LEDEN.pdf)



## 9 PŘÍLOHA



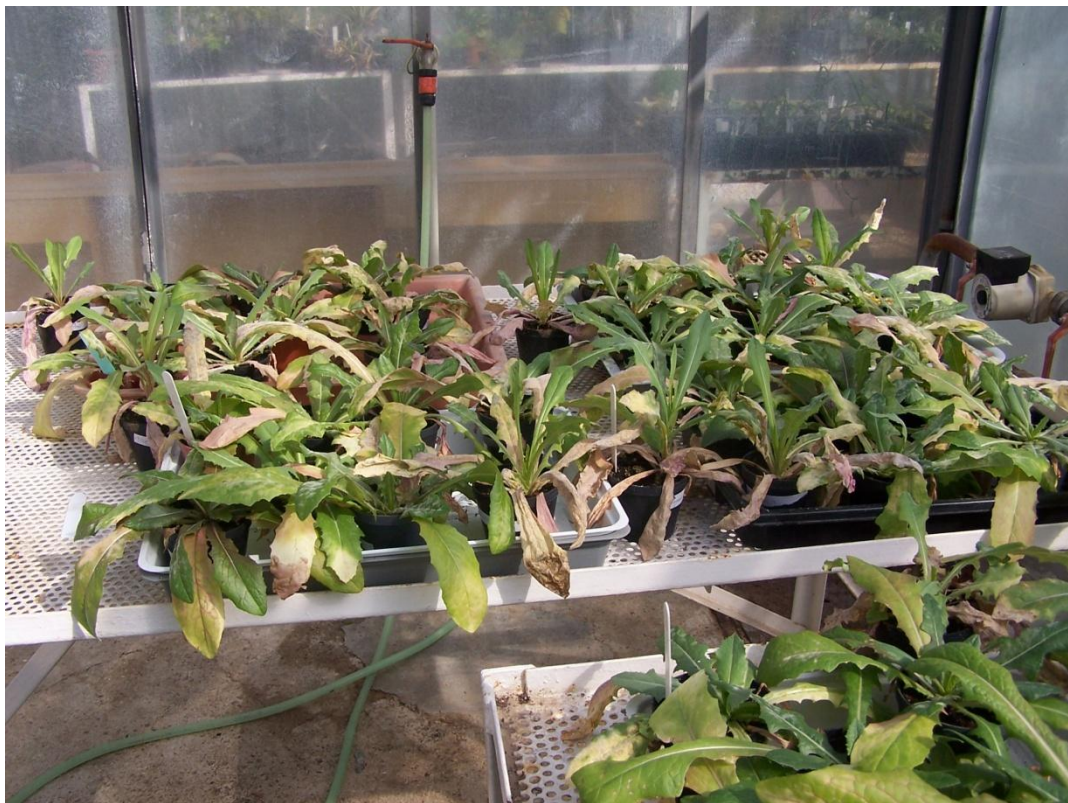
Obr. 1 Ukázka provedení modifikované metody listových disků  
(autorka fotografie: Bělicová I.)



Obr. 2 a 3 Sporulace na listových discích 14 dní po inokulaci při koncentraci fungicidů doporučené výrobcem (vlevo – přípravek Topas 100 EC, vpravo – přípravek BIOAN)  
(autorka fotografií: Bělicová I.)



Obr. 4 Jednotlivé stupně napadení (0 – 3) při modifikované metodě Isitových disků  
(autorka fotografie: Bělicová I.)

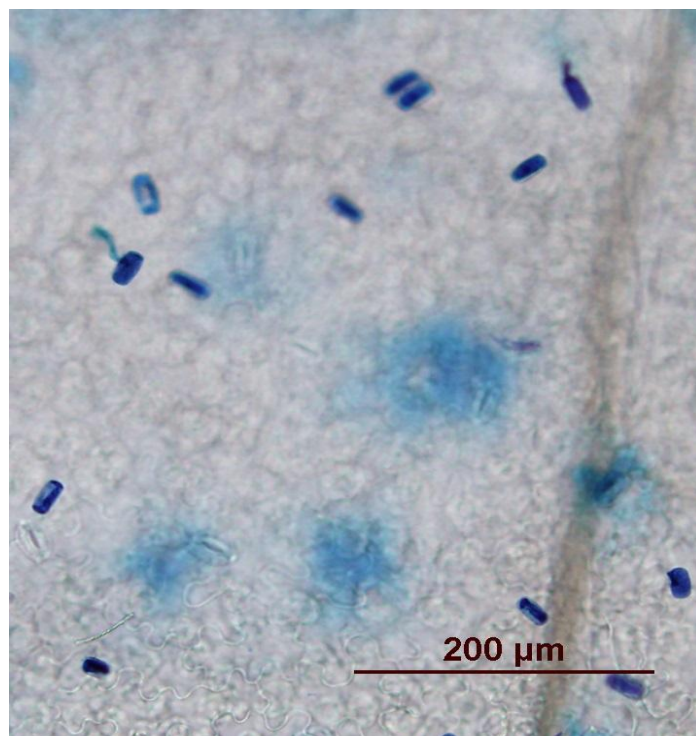


Obr. 5 Pohled na rostliny ve skleníku během modifikovaného skleníkového (polního)  
pokusu (autorka fotografie: Bělicová I.)

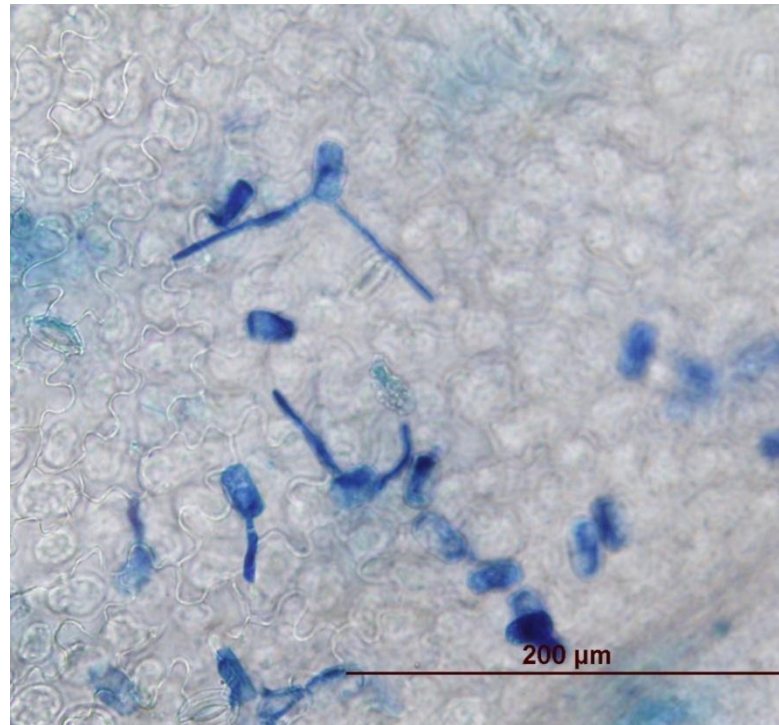




Obr. 6 a 7 List zdravé rostliny (nahore) a list se stupněm napadení 3 (přípravek Ortiva – 3 týdny po aplikaci) (autorka fotografií: Bělicová I.)

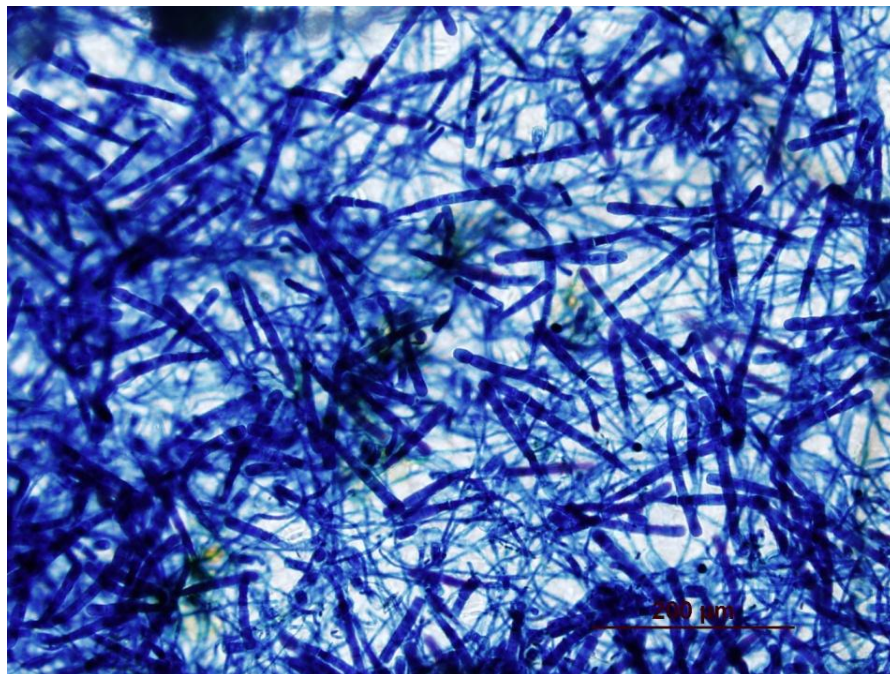


Obr. 8 Klíčení konidií 6 hpi po ošetření přípravkem Ortiva  
(autorka fotografie: Bělicová I.)



Obr. 9 Klíčení konidií 48 hpi po ošetření přípravkem Topas 100 EC

(autorka fotografie: Bělicová I.)



Obr. 10 Tvorba konidioforů na neošetřeném disku 168 hpi

(autorka fotografie: Bělicová I.)