

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra ochrany rostlin**



**Stanovení citlivosti populací houby *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.  
z vybraných produkčních výsadeb ke strobilurinovým fungicidům**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Pavlína Jaklová**

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

**© 2015 ČZU v Praze**

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Stanovení citlivosti populací houby *Venturia inaequalis* z vybraných produkčních výsadeb ke strobilurinovým fungicidům" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10.4. 2015

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala své vedoucí diplomové práce paní Ing. Janě Mazákové, Ph.D. a odborné školitelce Ing. Janě Kloutvorové za odborné rady, pomoc a trpělivost při spolupráci. Rovněž děkuji za jejich vstřícný přístup během zpracování diplomové práce a zlepšení mých znalostí v tomto tématu.

Také bych ráda poděkovala VŠÚO Holovousy s.r.o. za podporu a ochotu, že mě nechala pracovat v laboratoři a poskytla mi všechny materiál potřebný k napsání mé diplomové práce.

# **Stanovení citlivosti populací houby *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. z vybraných produkčních výsadeb ke strobilurinovým fungicidům**

## **Souhrn**

Houba *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. je závažným patogenem jabloní způsobující hospodářsky nejvýznamnější chorobu - strupovitost. Ošetření fungicidy je primárním nástrojem regulace tohoto patogena. Toto intenzivní používání fungicidů má za následek více či méně rychlý rozvoj rezistence a tím i pokles citlivosti patogena k několika používaným skupinám fungicidů. Cílem této práce bylo stanovení citlivost populací patogena *V. inaequalis* z vytipovaných lokalit k vybrané fungicidní látce kresoxim-methyl ze skupiny QoI inhibitorů. Citlivost byla hodnocena v *in vitro* (testy klíčivosti spor, růst mycelia na agaru) a *in vivo* (skleníkové testy na jabloňových semenáčcích) podmínkách a pomocí molekulárních metod detekovat gen rezistence u vybraných izolátů patogena. Bylo získáno celkem 20 vzorků populace *V. inaequalis* z odebraných infikovaných listů jabloně z vytipovaných lokalit. Výsledky testů prokázaly u čtyř vzorků populace *V. inaequalis* vznik rezistence. U osmi vzorků se projevila značně snížená citlivost populací *V. inaequalis*. Zbývající počet vzorků (6) lze označit jako populace houby se sníženou citlivostí k fungicidu Discus. Nejvyšší účinnost přípravku Discus a nejvyšší citlivost k účinné látce kresoxim-methyl se projevila u vzorku tzv. „divoké“ populace V6, která byla odebírána z neošetřovaného stromu. Pro potvrzení vzniku rezistence na základě jednobodové mutace v cytochromu b byly tři monosporické izoláty *V. inaequalis* ze vzorků populace V1, V2 a V4 testovány molekulární metodou přímé sekvenace mitochondriálního genomu. U všech tří monosporických izolátů *V. inaequalis* byla nalezena jednobodová mutace, při které dochází ke změně z glycinu na alanin v pozici 143 (G143A) a způsobuje tak rezistenci ke strobilurinovým fungicidům.

**Klíčová slova:** strupovitost jabloně, *Venturia inaequalis*, *Malus domestica*, strobilurin, kresoxim-methyl, rezistence, testování citlivosti

# Determination of sensitivity to strobilurin fungicides in populations of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. from selected production orchards

## Summary

The fungus *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. is an important pathogen of apple trees causing the most economically important disease – apple scab. Fungicide treatment is the primary tool to control this pathogen. The intensive uses of fungicides have consequence a more or less rapid development of resistance and thus decrease the sensitivity of the pathogen to several of groups used fungicides. The aim of this study was to determine the sensitivity of pathogen populations of *V. inaequalis* from selected localities for fungicidal substance kresoxim-methyl from group QoI inhibitors. Sensitivity was evaluated in in vitro (germination spores assays, mycelium growth on agar assays) and in vivo (greenhouse assays on apple seedlings) conditions and using molecular methods to detect resistance gene of selected isolates of the pathogen. A total number of 20 samples of the population *V. inaequalis* from infected leaves of apple collected from the selected locations. Assays results showed in the four samples of population *V. inaequalis* development of resistance. Eight samples of populations *V. inaequalis* demonstrated significant decrease of sensitivity. The remaining number of samples (6) can be described as the population of fungus with decrease of sensitivity to the fungicide Discus. Discus highest efficacy and the highest sensitivity to the kresoxim-methyl was demonstrated on the sample "wild" population V6, which was collected from non treatment tree. To confirm the development of resistance on the basis of a single point mutation in the cytochrome b, three monosporic isolates of *V. inaequalis* populations from samples V1, V2 and V4 were tested by direct sequencing the mitochondrial genome. In all three monosporic isolates of *V. inaequalis* was found single point mutation, involving a change from glycine to alanine at position 143 (G143A), causing the resistance to strobilurine fungicides.

**Keywords:** apple scab, *Venturia inaequalis*, *Malus domestica*, strobilurine, kresoxim-methyl, resistance, testing of sensitivity

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíl práce</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerže</b> .....	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>Patogen <i>Venturia inaequalis</i> – Původce strupovitosti jabloně</b> .....	<b>3</b>
3.1.1	Úvod .....	3
3.1.2	Původ a historie patogena .....	3
3.1.3	Taxonomické zařazení <i>V. inaequalis</i> .....	4
3.1.4	Rozšíření a ekologie <i>V. inaequalis</i> .....	6
3.1.5	Biologie <i>V. inaequalis</i> .....	7
3.1.6	Vývojový cyklus .....	9
3.1.7	Symptomy způsobené <i>V. inaequalis</i> .....	11
3.1.8	Rasy <i>V. inaequalis</i> .....	12
<b>3.2</b>	<b>Hlavní hostitelský druh – Jabloň (<i>Malus</i> spp.)</b> .....	<b>14</b>
3.2.1	Rod <i>Malus</i> spp.....	14
3.2.2	Systematické zařazení hostitelského druhu <i>Malus x domestica</i> Borkh. ....	15
3.2.3	Původ a historie rodu <i>Malus</i> spp. ....	16
<b>3.3</b>	<b>Možnosti ochrany</b> .....	<b>17</b>
3.3.1	Nepřímá ochrana - Agrotechnická opatření .....	17
3.3.2	Rezistence u rodu <i>Malus</i> spp. vůči <i>V. inaequalis</i> .....	18
3.3.3	Přímá ochrana - Chemická ochrana .....	20
3.3.4	Biologická ochrana .....	24
<b>3.4</b>	<b>Rezistence patogena vůči fungicidům</b> .....	<b>25</b>
3.4.1	Definice .....	25
3.4.2	Typy rezistence .....	25
<b>3.5</b>	<b>Qols (Quinone Outside Inhibitors) fungicidy</b> .....	<b>27</b>
3.5.1	Charakteristika .....	27
3.5.2	Princip rezistence ke Qol fungicidům .....	30
3.5.3	Antirezistentní strategie .....	33
<b>4</b>	<b>Materiál a metody</b> .....	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>Biologický materiál</b> .....	<b>36</b>
<b>4.2</b>	<b>Fungicid Discus®</b> .....	<b>36</b>
<b>4.3</b>	<b>Metodika</b> .....	<b>37</b>
4.3.1	Příprava inokula .....	37
4.3.2	<i>In vitro</i> testy klíčivosti spor .....	37

4.3.3	<i>In vivo</i> skleníkové testy .....	38
4.3.4	Monosporické izoláty .....	40
4.3.5	Metoda <i>in vitro</i> testů hodnocení rezistence na základě růstu mycelia na agaru s přidavkem fungicidu.....	40
4.3.6	Detekce rezistence pomocí molekulárních metod .....	41
4.3.7	Zpracování výsledků.....	43
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>45</b>
5.1.1	Sběr infikovaného rostlinného materiálu .....	45
5.1.2	<i>In vitro</i> testy klíčivosti spor .....	46
5.1.3	Skleníkové <i>in vivo</i> testy.....	50
5.1.4	Metoda <i>in vitro</i> testů hodnocení rezistence na základě růstu mycelia na agaru s přidavkem fungicidu.....	52
5.1.5	Detekce rezistence pomocí molekulárních metod .....	56
<b>6</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>Seznam literatury .....</b>	<b>64</b>
<b>9</b>	<b>Seznam v textu uvedených tabulek, grafů a obrázků .....</b>	<b>73</b>
9.1	<b>Tabulky.....</b>	<b>73</b>
9.2	<b>Grafy .....</b>	<b>73</b>
9.3	<b>Obrázky .....</b>	<b>73</b>
<b>11</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>74</b>
11.1	<b>Seznam příloh .....</b>	<b>74</b>



# 1 Úvod

Jako téma diplomové práce jsem si zvolila studium rezistence původce strupovitosti jabloně – *Venturia inaequalis* vůči strobilurinovým fungicidům.

Houba *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. je závažným patogenem jabloní způsobující hospodářsky nejvýznamnější chorobu - strupovitost. Ošetření fungicidy je primárním nástrojem regulace tohoto patogena a i přes pravidelně prováděnou chemickou ochranu, kterou bývá nutné během sezóny opakovat, dochází každoročně v některých výsadbách k výskytu tohoto onemocnění. Toto intenzivní používání fungicidů má za následek více či méně rychlý rozvoj rezistence a tím i pokles citlivosti patogena k několika používaným chemickým skupinám fungicidů. V České republice se k ochraně proti tomuto onemocnění využívá celá řada fungicidů z různých chemických skupin a různým mechanismem účinku. Jednou z těchto skupin jsou i tzv. QoI fungicidy - inhibitory respiračního řetězce. V relativně krátké době po jejich zavedení na trh však byl zaznamenán u různých houbových patogenů kulturních plodin vznik rezistence k těmto fungicidům. Jabloň, která je nejčastěji pěstovaným ovocným druhem mírného klimatického pásma, je v současné době závislá z velké části na chemické ochraně proti chorobám, což při výskytu rezistentních kmenů *V. inaequalis* ke strobilurinovým fungicidům, představuje značný problém, kterým je potřeba se zabývat.

## 2 Vědecká hypotéza a cíl práce

Vědecká hypotéza diplomové práce s názvem „Stanovení citlivosti populací houby *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. z vybraných produkčních výsadeb ke stobilurinovým fungicidům“ předpokládá, že existují kmeny patogena, které jsou rezistentní, případně existuje možnost vzniku a rozšíření těchto kmenů vůči běžně používaným fungicidním látkám ze skupiny QoI inhibitorů, konkrétně k přípravku na bázi strobilurinů, s účinnou látkou kresoxim-methyl, s obchodním názvem Discus.

Cílem diplomové práce bylo testování účinnosti vybrané fungicidní látky vůči patogenu *Venturia inaequalis* v *in vitro* a *in vivo* podmínkách a pomocí molekulárních metod detekovat gen rezistence u vybraných izolátů patogena.

## 3 Literární rešerže

### 3.1 Patogen *Venturia inaequalis* – Původce strupovitosti jabloně

#### 3.1.1 Úvod

Strupovitost je choroba, která se vyskytuje na rostlinách rodu jabloň (*Malus* spp.), jejímž původcem je houbový patogen jménem *Venturia inaequalis* (Cooke) G.Winter (1875) (anamorfa – konidiové stadium *Spilosea pomi* Fr., 1825). Je hospodářsky nejvýznamnějším a nejzávažnějším onemocněním jabloně, které je celosvětově rozšířené ve všech oblastech, kde se pěstují jabloně (*Malus x domestica* Borkh.) (MacHardy, 1996).

V případě napadení původcem strupovitosti, prvořadý negativní efekt na produkci jablek spočívá ve snížení kvality napadených plodů. Plody s příznaky napadení chorobou nejsou tržně realizovatelné jako konzumní ovoce. Dochází i ke snížení velikosti plodů, případně k jejich předčasnému opadu, při silném napadení dochází i k opadu listů a špatnému nasazení květních pupenů na příští rok, snižuje se doba skladování napadených plodů. Ztráty na výnosech zapříčiněné houbou *V. inaequalis* mohou činit až 70 i více %. Pokud není důsledně prováděna ochrana před strupovitostí, pak následkem toho se ve většině produkčních výsadb stává ovoce neprodejným (Agrios, 1997). Ochrana proti původci této choroby patří k nejdůležitějším a finančně velmi náročným opatřením, které určují zejména kvalitu sklizně, výši sklizně a mají tak značný vliv na rentabilitu produkce (Lánský et al., 2005).

#### 3.1.2 Původ a historie patogena

Původce choroby strupovitosti jablek se vyvíjel po dlouhou dobu ve vzájemném ekologickém vztahu s jeho hostitelským druhem – jabloní (*Malus x domestica* Borkh.). Nemoc je způsobena houbou *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint., anamorfním stadiem je *Spilocaea pomi* Fr. Nepohlavní stadium onemocnění bylo poprvé popsáno švédským botanikem Fries (1825), s pozdějšími dodatky (Fries, 1832). Pohlavní stadium bylo objasněno Cookem v roce 1866. Nejprve byla obě stadia považována za dva různé druhy hub, v roce 1887 je však Goethe je popsal jako jeden druh (Sandeskär, 2003).

Je známo, že strupovitost byla už v minulosti běžně se vyskytující a závažné onemocnění jabloní a předpokládá se, že toto onemocnění mělo vliv i na selekci odrůd jabloní. Jedno z nejstarších vyobrazení výskytu strupovitosti v historických dobách je zachyceno na obraze „Kristus a dva učedníci v Emauzích“ z roku 1600, který namaloval Michael Angelo

Caravaggio, kde je vyobrazen ovocný koš a v něm jsou jablka se skvrnami strupovitosti (MacHardy, 1996).

Až do roku 1800 byla strupovitost běžně se vyskytující se chorobou na jabloních, ale z fytopatologického hlediska ji nebyl přikládán velký význam. Ve středověku byly jabloně pěstovány především v okolí klášterů, v malých výsadbách, kde byly využívány odolné a genotypově rozmanité sazenice, což mělo za následek udržení infekce na nízké úrovni. V Evropě kolem roku 1800 byly jabloně pěstovány na rodinných farmách, zejména pro domácí použití, dále jako solitérní stromy na loukách, mezi poli a v okolí pastvin a cest. Jabloně byly vysazovány daleko od sebe a navíc se střídaly s jinými ovocnými stromy. Rozmanitost genotypů sazenic i to, že infikované listy bylo spásáno zvířaty, eliminovalo tak množství inokula a vznik primární infekce, což snižovalo závažnost této choroby. Po roce 1800 se začalo využívat ve větším měřítku řízené opylování a následně vegetativní množení, které vedlo k produkci geneticky uniformních stromů. Zvýšená poptávka po ovoci vedla ke změně systému pěstování jabloní, k založení sadů na loukách, předchůdců dnešních moderních výsadeb. Tímto způsobem pěstování se snížila vzdálenost askospor k hostiteli a zvýšil se zdroj primárního inokula. Byly položeny základy pro rozvoj epidemií strupovitosti v jabloňových sadech a tato choroba se stala hlavním problémem v moderní produkci jablek, proti které je nutné provádět pravidelné ochranné zásahy (MacHardy et al., 2001).

První zpráva o symptomech způsobených *V. inaequalis*, zaznamenaná na území USA, pochází z „Newton Pippins“ v New Yorku a z Pensylvánie v roce 1834. Další první zprávy o výskytu strupovitosti v jiných zemích, ukazují široký rozptyl zaznamenání prvního výskytu během několika let: Austrálie (1862), Anglie (1845), Indie (1830), Japonsko (1955), Norsko (1840), Jižní Afrika (1888) (MacHardy, 1996).

### **3.1.3 Taxonomické zařazení *V. inaequalis***

Taxonomie vřeckovýtrusých hub je založena na charakteristikách pohlavního rozmnožování, jeho průběhu a vzniklých strukturách. Prochází však neustále vývojem na základě nových poznatků vycházejících z molekulárně-genetických analýz (Juroch, 2010).

*V. inaequalis* náleží dle systematiky do oddělení *Ascomycota* (vřeckovýtrusné, vřeckaté houby, askomycety). Jednotícím a typickým znakem, který je společný pro všechny zástupce hub z této skupiny je tvorba vřecek (pl. asci, sg. ascus). Dále dle systematiky se *V. inaequalis* řadí do podkmenu *Pezizimycotina* (syn. *Ascomycotina*), toto pododdělení zahrnuje tzv. „pravé“ vřeckovýtrusné houby, což znamená, že je u nich vytvořena dikaryofáze

v podobě askogenních hyf a zároveň dochází k tvorbě plodnic (askomat, askokarpů). Toto pododdělení představuje nejpočetnější skupinu hub, zahrnující více než polovinu všech známých druhů hub. *V. inaequalis* dle systematického zařazení patří do třídy *Dothideomycetes*, která je největší a nejvíce variabilní třídou vřeckovýtrusných hub, do podtřídy *Pleosporomycetidae* a *V. inaequalis* náleží do řádu *Venturiales*, do čeledi *Venturiaceae* (strupatkovité) (Anonym 5, 2015).

Tabulka č. 1: Vědecké názvy *V. inaequalis*

Anamorfní stádium	<i>Spilocaea pomi</i> Fries, 1825
Teleomorfní stádium	<i>Venturia inaequalis</i> (Cooke) G. Winter, 1875
Synonyma	<i>Cladosporium dendriticum</i> Wallr., 1833
	<i>Endostigme inaequalis</i> (Cooke) Syd., 1923
	<i>Fusicladium dendriticum</i> (Wallr.) Fuckel, 1870
	<i>Fusicladium pomi</i> (Fr.) Lind, 1913
	<i>Sphaerella inaequalis</i> (Cooke), 1871
	<i>Spilocaea pomi</i> Fr., 1825
	<i>Spilosticta inaequalis</i> (Cooke) Petr., (1940)
Mezinárodní označení - EPPO kód: VENTIN	

(Anonym 4, 2015)

Tabulka č.2: Taxonomické zařazení houby *V. inaequalis*

Soustava	<i>Vitae</i>
Doména	<i>Eukaryota</i>
Říše	<i>Fungi</i>
Oddělení	<i>Ascomycota</i>
Podkmen	<i>Pezizomycotina</i>
Třída	<i>Dothideomycetes</i>
Podtřída	<i>Pleosporomycetidae</i>
Řád	<i>Pleosporales</i>
Čeleď	<i>Venturiaceae</i>
Rod	<i>Venturia</i>
Druh	<i>Venturia inaequalis</i>

(Anonym 4, 2015)

### 3.1.4 Rozšíření a ekologie *V. inaequalis*

Kromě hlavního hostitelského rodu *Malus* spp., tento patogen také napadá zástupce rodů *Sorbus* sp. – jeřáb, *Pyracantha* sp. – hlohyně, *Viburnum* sp. – kalina, dále *Eriobotrya japonica* – lokvát japonský, *Crateagus laevigata* (*oxyacantha*) – hloh obecný, *Cotoneaster integerrimus* – skalník celokrajný, (Juroch, 2010). Patogen je fakultativním parazitem. V průběhu vegetační sezóny parazituje na orgánech hostitele (hlavně listy a plody) a během vegetačního klidu dokončuje svůj životní cyklus a přezimuje v podobě plodnice (pseudoperithecia) na opadaném listí, větvičkách a šupinách pupenů (MacHardy, 1996). Velmi náchylné k napadení jsou například odrůdy „Gloster“, „Golden Delicious“, „Spartan“, „Starkrimson Delicious“, „Šampion“ a „Vista Bela“ (Ackermann et al., 2002).

Strupovitost jabloně je rozšířena celosvětově, především se vyskytuje v mírném klimatickém pásu, na území s chladným a vlhkým počasím v předjaří. V regionech, kde panují semiaridní klimatické podmínky, bývá počet lézí na napadených ovocných stromech tak malý, že bývá někdy i nezaregistrována po více let. V USA je její rozšíření nejzávažnější v severně-centrální části a na severovýchodě států (Agrios, 1997). Patogen *V. inaequalis* škodí především v oblastech s oceánským klimatem a v oblastech s kontinentálním klimatem škodí spíše v humidních a chladnějších podhorských lokalitách. Strupovitost jabloně se vyskytuje na celém území České republiky ve všech produkčních oblastech, její škodlivost se liší v jednotlivých ročnících podle průběhu počasí během vegetační sezóny. (Juroch, 2010).

Pro svůj vývoj a šíření potřebuje patogen deštivé a vlhké (mlhy) počasí. Zrání a prasknutí plodnice je podmíněno jejím ovlhčením, poté jsou askospory vystřelovány nad povrch listu a dále jsou rozšiřovány větrem. K vyklíčení askospory a k infekci je nezbytné rovněž ovlhčení pletiva. Také teplota významně ovlivňuje vývoj a růst patogena (infekce, inkubační doba, sporulace). Infekce mohou nastat v rozmezí teplot 0,5 – 30 °C. Optimální teploty jsou 17 – 24 °C. Čím příznivější teplota, tím kratší je potřebná doba ovlhčení k vyklíčení spory a ke vzniku infekce. V suchých periodách bez deště, resp. bez ovlhčení listů k infekci nedochází. Sekundární infekce mohou nastat v širokém rozmezí teplot, minimální teplota pro infekci konidii je 5 °C, optimální teploty jsou v rozmezí 14 – 24 °C, maximální teplota je 28 °C. K infekci konidii dochází na rozdíl od askospor ve dne i v noci (Ackermann et al., 2002).

Splnění podmínek pro infekci a intenzitu infekce lze stanovit na základě zjištěné doby ovlhčení povrchu listu a průměrné teploty vzduchu během ovlhčení (případně relativní vlhkosti vzduchu při přerušení ovlhčení povrchu pletiva). Vzájemný vztah mezi teplotou, dobou ovlhčení

povrchu pletiva a intenzitou infekcí je základem metod signalizace ochrany proti původci strupovitosti, kterou definoval Mills a později upravili jeho následovníci (tzv. „Millsova tabulka“) (Juroch, 2010).

### **3.1.5 Biologie *V. inaequalis***

#### **3.1.5.1 Vegetativní stélka**

Vegetativní stélka *V. inaequalis* je tvořena haploidním vláknitým, větveným, přehrádkovaným myceliem. Podstatnou část buněčné stěny tvoří chitin a beta-1,3(1,6)-glukan. U *V. inaequalis* se vyskytují i organely, které jsou specifické především pro hyfy lichenizovaných druhů hub, tzv. koncentrická tělíška. V polarizačním mikroskopu se tato tělíška jeví jako světélkující útvary, které jsou seskupeny do hroznovitých struktur v části cytoplazmy bez dalších organel, a které jsou oddělené od okolí membránovitou strukturou (Kalina et Váňa, 2005).

#### **3.1.5.2 Perfektní – Teleomorfní stadium**

Pohlavní stadium poprvé popsal Cooke v roce 1866. Houbu nazval *Sphaerella inaequalis*, druhové jméno odkazuje na nesouměrnou velikost buněk a charakterizuje tak typický tvar dvoubuněčných askospor (MacHardy, 1996).

##### **3.1.5.2.1 Plodnice**

Askomata jsou tvořena pletivem z haploidních hyf, které uzavírají askogenní hyfy a vřečka. U *V. inaequalis* je typ plodnice askolokulární. Základ pro plodnici je dán vznikem kulovitého až terčovitého myceliárního útvaru, tzv. stroma s pseudoparenchymatickou strukturou. Teprve v takto vytvořené plodnici (askostroma) dojde k diferenciaci pohlavních orgánů (gametangií). Askogenní hyfy potom vrůstají mezi již vytvořené pseudoparenchymatické pletivo. Vznikají sekundární lysigenní dutiny (lokuli), v nichž se vytvářejí vřečka. Z hlediska výsledného morfologického tvaru plodnice se u *V. inaequalis* vytváří pseudoperitheciium, což je peritheciu (kulovitá až hruškovitá plodnice s úzkým, kanálkovitým ústím – ostiolem vystlaným perifýzami) podobná plodnice, která obsahuje jednu nebo více dutin (Kalina et Váňa, 2005). Plodnice jsou tmavohnědé až černé, o velikosti 90 – 150  $\mu\text{m}$ , bývají částečně zanořené pod povrchem listu a negativně geotropicky orientované (MacHardy, 1996). V dutinách je vždy větší počet vřeček (obsahují 50 – 100 vřeček) uspořádaných v hymeniu nebo ve svazečcích (Kalina et Váňa, 2005).

### 3.1.5.2.2 Vřecko

Charakteristickým znakem, který je společný pro všechny zástupce z oddělení *Ascomycota* (vřeckovýtrusné, vřeckaté houby, askomycety) je tvorba vřecek (asci, jedn. č. ascus). U převážné většiny zástupců představuje mladé vřecko jedinou diploidní buňkou v celém procesu vývoje vřeckovýtrusých hub, nepředstavuje však strukturu trvalejšího charakteru. Vřecko rovněž reprezentuje meiosporangium, jelikož zde dochází k meiotickému dělení. Dochází zde k diferenciaci endogenně se tvořících askospor, obvykle následuje po proběhlé meioze ještě mitotické dělení a ve vřecku vzniká nejčastěji 8 askospor. Dikaryotická fáze se nachází pouze v plodnicích v podobě tzv. askogenních hyf. Vřecko je vždy jednobuněčné (Kalina et Váňa, 2005).

*V. inaequalis* má typ vřecka bitunikátní (fisitunikátní, „Jack-in-the-box“). Vřecka mají válcovitý tvar a jsou 60-70 x 7-12  $\mu\text{m}$  velká (MacHardy, 1996). Tento typ vřecka má dvouvrstevnou stěnu. Před dozráním askospor nejprve praskne vnější poměrně silná, ale křehká vrstva - exoaskus, vnitřní pružná vrstva - endoaskus vyhrězne a prodlouží se přibližně o délku vřecka. Teprve potom dojde k uvolnění askospor askoapikálním aparátem. Vřecka jsou inoperkulátní, což znamená, že jsou askospory z vřecka uvolňovány aktivně pórem či štěrbinou, které bývají umístěny v apikální části vřecka. K vymrštění askospor dochází většinou vlivem turgoru a to na poměrně značnou vzdálenost (Kalina et Váňa, 2005).

### 3.1.5.2.3 Askospory

Proces tvorby askospor se nazývá askosporogeneze, probíhá ve vřecku a má dvě fáze. V první fázi se diferencují části cytoplazmy obsahující jádro a obalují se dvojicí membrán. Ve druhé fázi se mezi oběma membránami vytváří stěna askospor. Část plazmy, která se neúčastní tvorby askospor, se nazývá epiplazma a pravděpodobně má vyživovací funkci. Ve vřecku vzniká simultánně 8 askospor. U *V. inaequalis* jsou zralé askospory dvoubuněčné, tzv. didymospory (Kalina et Váňa, 2005). Askospory jsou olivově hnědé barvy, o rozměrech 12-5 x 6-8  $\mu\text{m}$ , přepažené v horní třetině, kdy horní buňka je kratší a širší než ta spodní (MacHardy, 1996).

### 3.1.5.3 Imperfektní - anamorfní stadium

Konidiové stadium se nazývá *Spilosea pomi* Fr. V roce 1825 poprvé popsal rod *Spilosea* švédský botanik Fries (MacHardy, 1996).



Nepohlavní rozmnožování se uskutečňuje pomocí nepohlavně vzniklých spor - konidií, dále dělením a fragmentací stélky (Kalina et Váňa, 2005).

### **3.1.5.3.1 Konidie**

Konidiofory vyrůstají trhlinami v kutikule ze subkutikulárního nebo intraepidermálního mycelia hnědé barvy, které se rozrůstá radiálně na povrchu listů. Tvar konidioforu je jednoduše cylindrický, barvu má světlou až středně hnědou či olivě hnědou barvu. Na bázi bývají konidiofory zduřelé, jsou nechlánkované a jejich délka se pohybuje od 90  $\mu\text{m}$  a šířka 5 – 6  $\mu\text{m}$ . Tvorba konidií – konidiogeneze probíhá postupně během období sporulace na vrcholu konidioforů. Na konidioforech vyrůstá několik jednobuněčných nebo dvoubuněčných spor. Po opadu konidií zůstávají na konidioforech charakteristické jizvy. Konidie mají tvar opačně kyjovitý, hruškovitý a na konci zašpičatělý, barvy jsou světlé až olivové, hladké a o rozměrech 12 – 30 x 6 – 10  $\mu\text{m}$  v nejširší části konidie, se zkrácenou bází 4 – 5  $\mu\text{m}$  (MacHardy, 1996)

Konidie klíčí ve vlhkém prostředí tzv. klíčícím vláknem, z něhož vyrůstá penetrační hrot, který proniká skrz kutikulu listu a rozrůstá se v mycelium houby, které je subkutikulární, což znamená, že je umístěno mezi kutikulou a epidermálními buňkami listu (Agrios, 1997).

### **3.1.6 Vývojový cyklus**

Vývoj strupovitosti zahrnuje jak monocyklickou fázi, způsobenou askosporami a vznikem primární infekce, tak polycyklickou fázi, způsobenou konidiemi, které slouží k šíření patogena v sadu během vegetační sezóny a jsou příčinou sekundárních infekcí (Carisse et al., 2011). Tato houba přezimuje na napadených opadaných listech, kde se postupně vyvíjejí a na jaře dozrávají černé kulovité plodnice pseudoperithecia, které na povrchu tlejícího listu vypadají jako černé špendlíkové hlavičky. Houba může také přezimovat uvnitř na výhonech či v šupinách pupenů, ve formě konidií (MacHardy, 1996). Uvnitř plodničky se nacházejí vřecka, ve kterých se vytváří dvoubuněčné askospory. Askospory jsou na jaře zdrojem primárních infekcí (Kloutvorová, 2011 a Ackermann et al., 2002). Při dešti dochází k nabobtnání a praskání vřecek, askospory jsou vymrštěvány do vzduchu, čímž dochází k jejich roznášení do okolí (Kloutvorová, 2011). Askospory mohou být vymrštěvány a díky větru roznášeny až okolo 100 – 200 m od zdroje inokula (MacHardy, 1996). Askospory jsou šířeny zejména vzdušnými proudy, konidie převážně dešťovými srážkami (Ackermann et al., 2002). První askospory postupně dozrávají v období rašení

jabloně, nejpozději ve fázi myšího ouška (BBCH 26). Askospory se uvolňují v závislosti na počasí daného roku do konce května až června. Masová zralost askospor a největší nebezpečí primárních infekcí nastává od fenofáze růžového poupěte (BBCH 56 – 57) a zpravidla trvá až do období 2 týdnů po odkvětu jabloní. V tomto relativně krátkém časovém úseku se obvykle uvolní 90 – 95 % askospor. Riziko vzniku primárních infekcí však trvá až do rozpadu zdroje askospor – do doby rozložení starých loňských listů (v ČR přibližně konec druhé dekády června). Konidie i askospory potřebují k vyklíčení vodu, rychlost klíčení a prorůstání do pletiv je ovlivněna teplotou. K infekci dochází teprve po splnění podmínky doby trvání vlhkosti při určité teplotě, např. při průměrné teplotě 12 °C, musí trvat ovlhčení nejméně 11 hodin, aby došlo ke vzniku infekce (Kloutvorová, 2011). Za vhodných podmínek – při vlhkém počasí a teplotě pohybující se v rozpětí od 6 do 26 °C, askospory klíčí a způsobují primární infekci listového pletiva. Ke vzniku infekce je zapotřebí soustavné ovlhčení listu po dobu 28 hodin, v případě, že teplota vzduchu je 6 °C, 14 hodin při teplotě vzduchu 10 °C a 9 hodin při teplotě 18 – 24 °C nebo 12 hodin při teplotě 26 °C. Penetrační hrot askospory pronikne skrz kutikulu a rozrůstá se mezi kutikulou a vnější stranou buněčné stěny epidermálních buněk (subkutikulární mycelium). Infekce jsou velmi hojné během vlhkého, chladného jara a na začátku léta a ustávají, když nastane horké letní počasí (Sandeskär, 2003). Na listech a napadených plodech se po uplynutí inkubační doby (v závislosti na průměrné denní teplotě za cca 9 – 18 dnů od vzniku infekce) Na listech a napadených plodech se po uplynutí inkubační doby (15 – 18 dnů od inokulace) objeví nejprve olivově zelené, později šedočerné skvrny. Z mycelia se začínají formovat konidiofory, na nichž dochází k produkci velkého množství konidií, které se poté uvolňují do okolí a jsou zdrojem sekundárních infekcí. Během deště či po dešti jsou konidie splachovány nebo odvány větrem na okolní listy či plody, kde mohou vyklíčit a způsobit tak sekundární infekci. Za vlhkého počasí konidie zajišťují infekci během celé vegetační sezony (Sandeskär, 2003). Období sekundárních infekcí pak trvá prakticky od okamžiku objevení se prvních vizuálních příznaků strupovitosti až do období sklizně. Listy mohou být infikovány i během vlhkého počasí na podzim (Kloutvorová, 2011). Na podzim infikované listy opadají, mycelium se zatáhne do vnitřku listu a zformují se pseudoperithecia, kterými houba přečkává zimní období (Sandeskär, 2003).

### 3.1.7 Symptomy způsobené *V. inaequalis*

*V. inaequalis* napadá především listy a plody, zcela výjimečně i letorosty nebo květy (Ackermann et al., 2002). Primárním symptomem jsou světlé, olivově zbarvené, nepravidelné skvrny na svrchní straně (později během vegetace i na spodní straně)–Brzy poté se barva lézí změzí na tmavě olivově zelenou, následně až na sazovitě šedočernou s matným, sametovým povrchem a skvrny plasticky vystupují z povrchu listu. Pletivo listu nakonec nekrotizuje a někdy může i vypadávat. Léze mohou být různě velké, setrvávají ohraničené, buď od sebe oddělené či mohou splynout v jednu větší. *V. inaequalis* napadá listy, květy a plody, zcela výjimečně i letorosty (Ackermann et al., 2002). Onemocnění strupovitostí se může vyskytovat na většině nadzemních orgánů rostlin, ale nejčastější a nejpatrnější jsou příznaky na listech a plodech. Primárním symptomem jsou světlé, olivově zbarvené, nepravidelné skvrny nejprve na spodní, poté i na svrchní straně mladých listů, květních pupenech či kališních lístcích. Brzy poté se barva lézí změzí na tmavě olivově zelenou, následně až na sazovitě šedočernou s matným, sametovým povrchem a skvrny plasticky vystupují z povrchu listu. Pletivo listu nakonec nekrotizuje a může vypadávat. Léze mohou být různě velké, setrvávají ohraničené, buď od sebe oddělené či mohou splynout v jednu větší. Léze na mladých listech se tvoří na spodní straně listu, ale na starších listech se tvoří především na svrchní straně listu. Infikované mladé listy zabrzdí svůj vývin, zůstávají zakrnělé a zkroucené, později opadávají. Příležitostně se skvrny způsobené *V. inaequalis* tvoří na výhonech a květech (Agrios, 1997). Okvětní plátky mohou být primárně infikovány askosporami brzy z jara a od nich můžou být sekundárně napadeny konidii mladé plody (Sandeskär, 2003).

Na infikovaných plodech se objevují pravidelné okrouhlé skvrny, které se s růstem plodu rozšiřují, jsou matné až sametově zelené, postupně tmavnou, korkovají, nekrotizují, případně i praskají a svým vzhledem připomínají strupy. Kutikula plodu na okrajích skvrn praská. Plody, infikované na počátku sezóny v rané fázi jejich vývoje jsou deformované, popraskané a často předčasně opadávají. Na plodech, které byly infikované během dozrávání, se formují jen malé léze, tzv. pozdní strupovitost, ačkoliv, během skladování se mohou rozvinout až do tmavých strupatých skvrn. Následně bývají postižené plody napadány původci hnilob. (Agrios, 1997). Rovněž může dojít k napadení plodů před sklizní a k projevům onemocnění při jejich uskladnění. Na plodech se toto pozdní napadení projeví drobnými šedočernými až tmavými, propadlými skvrnami (skládková strupovitost jablek) (Ackermann et al., 2002).

### 3.1.8 Rasy *V. inaequalis*

Všechny odrůdy *Malus x domestica* Borkh. jsou náchylné k napadení patogenem, ale ne všechny rasy této houby, jako např. „divoké“ populace *V. inaequalis*, jsou schopny vyvolat symptomy v podobě sporulujících lézí na listech hostitele (MacHardy, 1996). Ačkoliv je rod *Malus* spp. hlavním hostitelem patogena vyvolávajícího strupovitost jabloně, ne všechny druhy jsou jím napadány. Geneticky podmíněná rezistence jabloně, která je založená na účinku jednoho genu (monogenně) tzv. gen velkého účinku je patogenem překonávána vytvářením nových ras. Tyto rasy jsou schopné překonávat imunitu i u divoce rostoucích druhů rodu *Malus* spp. (Parisi et al., 1993; Bénaouf et Parisi 2000). *V. inaequalis* má vysoký stupeň genetické variability. U tohoto patogena dochází ke genetickým rekombinacím každý rok, čímž se zvyšuje možnost překonání rezistence jeho hostitele.

Šlechtění na rezistenci k chorobám je v současné době zaměřeno buď na kombinování několika zdrojů rezistence vůči chorobám nebo pomocí polygenních zdrojů rezistence (Sandeskär, 2003). Existuje jen několik komerčně pěstovaných odrůd jabloní představujících částečný podíl na celkové produkci v USA a Evropě, které jsou rezistentní vůči rasám *V. inaequalis* a také mohou být zároveň použity jako rostlinný materiál pro další šlechtění nových rezistentních odrůd jabloní.

Zájem o různé rasy původce strupovitosti začal velmi záhy, jelikož vědci zabývající se patogenem byli znepokojeni morfologickými rozdíly patogena a různými průběhy infekce. Bylo popsáno a označeno celkem 7 ras *V. inaequalis*. Tyto rasy jsou využívány šlechtiteli, jelikož jsou schopné vyvolat sporulující léze na druhích a šlechtěných odrůdách rodu *Malus* spp., které předtím byly považovány za rezistentní. Ve výzkumu k rozlišení rozdílů patogenity mezi konidiovými izoláty „divokých“ populací *V. inaequalis*, využívá metody RAPD markerů (MacHardy, 1996). Jiná metoda, která se používá k rozlišení monosporických izolátů *V. inaequalis* je PCR – RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism). Pro lepší pochopení populační biologie *V. inaequalis* je využíváno novější metody mikrosatelitů SSR markerů (Simple Sequence Repeat), které jsou více informativní. Mikrosatelitní markery mají několik výhod oproti RFLP nebo RAPD: snadno se s nimi technicky manipuluje, je zapotřebí malé množství DNA pro PCR amplifikaci, jsou jednoznačně vyhodnotitelné a výsledky jsou vysoce reprodukovatelné (Tenzer et al., 1999). Další využívanou analýzou, kterou je charakterizována variabilita monosporických izolátů je UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Averages) (Melounová et al., 2004).

Byly rozlišeny tři různé reakce hostitele na patogena, v závislosti na původu inokula a testované odrůdy. Získané inokulum konidií bylo složeno z izolátů *V. inaequalis* získaných z různých odrůd a poté jím byla infikována jiná odrůda. Bylo hodnoceno, zda se vytvořily: 1. sporulující léze; 2. objevily méně rozvinuté symptomy nebo za 3. nebyly viditelné žádné symptomy onemocnění. Každá testovaná odrůda byla infikována inokulem, které se skládalo ze stejného poměru 10 různých monosporických izolátů *V. naequalis*, následně byly vyhodnoceny objevené symptomy a byl určen izolát, který je způsobil. Některé izoláty nebyly zjištěny u žádné testované odrůdy, zatímco některé izoláty způsobily vyšší podíl lézí, než se očekávalo. Tento vzor testování byl použit celkem u 6 odrůd, ale jako nejvýrazněji náchylná se projevila odrůda „Golden Delicious“ (MacHardy, 1996).

Tato demonstrace různých reakcí mezi izoláty patogena a odrůdami hostitele poskytla 3 významné poznatky: přirozeně se vyskytující populace se skládá z fyziologických ras, které jsou určeny odolností odrůd a jsou tak zdrojem „divokého“ typu populace *V. inaequalis*. Za druhé, vztah mezi odrůdou rezistentní / citlivou a izolátem virulentním / avirulentním je v souladu s teorií gen proti genu. To dokazuje, že i odrůda hostitele působí selekčním tlakem na patogena, dochází tak k vývoji a vytváření nových alelických sestav ovlivňující jeho virulenci. Pokus nezahrnoval sexuální stadium patogena, ale pravděpodobně i vlivem sexuální reprodukce, dochází v průběhu askosporogeneze k rekombinaci genů, kterými je rovněž ovlivňována virulence patogena (MacHardy, 1996).

#### **3.1.8.1 Fyziologické rasy 1, 2 a 3**

Rasa 1 se běžně vyskytuje na území USA a i v dalších zemích, způsobuje nekrotické a chlorotické léze, které však nesporelují. Tato rasa je avirulentní ke všem známým genům rezistence.

Rasa 2, která byla zjištěna v Jižní Dakotě, hojně tvoří sporulující léze na odrůdě „Dolgo“, některých segregátech ruské odrůdy R12740-7A a na odrůdě „Geneva“.

Rasa 3 byla zaznamenána na rezistentním okrasném kultivaru *M. niedywetzkyana* v Novém Skotsku. Infikuje odrůdu „Geneva“, na které způsobuje plně rozvinuté symptomy choroby (MacHardy, 1996).

#### **3.1.8.2 Fyziologické rasy 4, 5, 6 a 7**

Rasa 4 pocházející z Purdue v USA byla zjištěna u rezistentních sazenic *M. pumila* R12740-7A (Williams et Kuć, 1969).

Rasa 5 byla objevena v Anglii na *M. micromalus* a *M. astrosanguinea* a je charakterizována schopností infikovat rostliny, jejichž rezistence je založena na „pit gene“ typu (Vm) (Sandskär, 2003).

Rasa 6 má původ v Německu. V roce 1988 byly pozorovány léze způsobené původcem strupovitosti na semenáčcích odrůdy „Prima“ (Vf gen rezistence) pěstovaných ve skleníku, které byly selektovány jako rezistentní (MacHardy, 1996). Izoláty této rasy z Německa dokázaly infikovat i jiné Vf kultivary, ale *M. floribunda* 821 zůstala odolná (Parisi et Lespinasse, 1993). Parisi a Lespinasse (1993) zjistili, že velká část genetického pozadí rezistence vůči *V. inaequalis* u planě žijících druhů byla ztracena důsledkem šlechtitelského procesu. Proto byl následně ve šlechtění nových odrůd kladen důraz na význam nálezu polygenních zdrojů rezistence. Patogenita rasy 6 byla dále zkoumána Parisi a Lespinasse (1996) na dalších odrůdách. Rasa 6 vyvolala příznaky téměř na všech sedmatřiceti zkoušených odrůdách s Vf genem rezistence, ale odrůda "Granny Smith" a tři další kultivary s genem odlišným rezistence (Vbj, Vr a Va) nebyly infikovány.

Poslední rasa, která byla objevena je tzv. „anglická rasa“ nebo rasa 7, která byla popsána Robertsem a Crutem (1994). Izolát rasy získané 7 z přirozeně infikované *M. floribunda*, inicioval vznik lézím na *M. floribunda* 821 a na některých Vf kultivarech, zatímco některé jiné Vf kultivary nebyly infikovány. Později byl objeven druhý dominantní gen u *M. floribunda* 821 (Vfh). Bylo rovněž potvrzeno, že odrůda "Golden Delicious" (Vg) je rezistentní vůči rase 7 (Bénaouf et Parisi, 2000).

## **3.2 Hlavní hostitelský druh – Jabloň (*Malus* spp.)**

### **3.2.1 Rod *Malus* spp.**

Jabloň je v současnosti nejvýznamnějším a nejpěstovanějším ovocným druhem mírného pásma. Díky kombinaci pěstitelských technologií a podnoží lze tento druh pěstovat v různých klimatických a půdních podmínkách mírného pásma. Hranice možnosti pěstování jabloní leží mezi průměrnými ročními teplotami 6 – 9 °C a minimálním úhrnem srážek 500 mm / rok (Hluchý et al., 2008). Svými nároky na klimatické podmínky náleží jabloň mezi velmi plastické a nejméně náročné ovocné druhy, s úspěchem se tento druh pěstuje od subtropických pásem až k 55 rovnoběžce na úrovni oblasti jižní Skandinávie. V České republice se jí daří prakticky na celém území státu až do vyšších poloh s nadmořskou výškou kolem 600 m (Blažek et al., 2001).

Do tohoto rodu náleží asi 30 původních druhů a několik desítek hybridních druhů. Většina u nás pěstovaných kulturních odrůd se taxonomicky označuje jako druh jabloň domácí *Malus x domestica* Borkh. Pro ovocnářství jsou rovněž i další významné druhy, jako je jabloň zakrslá *M. pumila* Mill., od kterého je odvozena většina typových podnoží, *M. prunifolia* Borkh., využívaná především ve šlechtění mrazuvzdorných odrůd a jabloň mnohokvětá *M. floribunda* Sieb., ze které byly vyšlechtěny odrůdy odolné proti strupovitosti (Blažek et al., 1998). tvorbu nových odrůd byly použity jabloň drobnoplodá *M. bacata*, jabloň japonská *M. micromalus* Mak. Jabloň lesní *M. sylvestris* je využívána jako podnož a donor genů odolnosti ke škodlivým organismům (Juroch, 2010).

V současnosti se ve světě pěstuje více jak 10 000 odrůd jabloní a více jak 2000 různých klonů. V České republice je zapsáno v odrůdové knize, která je spravována ÚKZÚZ (k 15.6. 2014) 117 odrůd jabloní a 13 odrůd podnoží (Anonym 3, 2014). V intenzivních výsadbách jabloní hlavními pěstovanými odrůdami jsou „Idared“, „Golden Delicious“, „Jonagold“, „Gloster“, „Šampion“, „Rubín“ a další. V současnosti se začínají ve výsadbách prosazovat nové rezistentní a vysoce tolerantní odrůdy k chorobám, které byly vyšlechtěny v České republice ve VŠÚO v Holovousích, jako např. „Angold“, „Selena“, „Julia“ nebo v ÚEB AV ČR ve Střížovicích odrůdy „Topaz“, „Rubinola“ a „Goldstar“ (Anonym 13, 2015).

V roce 2013 celková produkce jablek v ČR činila 194,5 tisíc tun, z toho sklizeň z produkčních výsadeb dosáhla objemu 120,6 tisíc tun a průměrný výnos byl 13,78 t/ ha. Plocha plodných jabloňových sadů čítá 8 721 ha. Produkční výsadby jsou nejvíce zastoupeny ve středních, severních, východních Čechách a na jižní Moravě. Plocha intenzivních ovocných sadů v ČR v ekologickém režimu čítala 1 382,4 ha.

Produkce ovoce byla v zásadě ve srovnání s pětiletým průměrem průměrná. Sklizeň v zahrádkách a v extenzivních sadech byla v roce 2013 podprůměrná. Byla ovlivněna vysokou sklizní v roce 2012, neboť z důvodu alternace měla řada odrůd malou násadu. Kvalita plodů byla negativně ovlivněna vysokým výskytem strupovitosti, pro jejíž rozvoj bylo ve vlhkém jaru ideální počasí (Buchtová, I. 2014).

### **3.2.2 Systematické zařazení hostitelského druhu *Malus x domestica* Borkh.**

Z botanického hlediska jabloně náleží jabloně (rod *Malus* Mill.) do oddělení krytosemenných rostlin (*Magnoliophyta*), třídy dvouděložných (*Rosopsida*), do řádu růžotvarých (*Rosales*), čeledě růžovitých (*Rosaceae*) a rodu *Malus* Mill. Z pomologického hlediska se jabloně řadí do ovoce jádrového (Anonym 1, 2014).

### 3.2.3 Původ a historie rodu *Malus* spp.

Záznamy o původu a rozšíření pěstování jabloní jako ovocného druhu pocházejí z dob vzkvétajícího řeckého a římského impéria, již několik staletí před naším letopočtem. Jablono se rozšířila z jihozápadní Asie za doby římského impéria nejdříve do oblasti Malé Asie, následně do Řecka a přes Itálii do dalších evropských zemí v rámci obchodu či kolonizace nových území, tedy i do Čech, Moravy a Slezska (Vlk et al., 2008). V období středověku bylo pěstování, šlechtění, množení a zachování až stovek různých jabloní pod správou klášterů v tzv. klášterních zahradách (MacHardy, 1996). Pěstování ovoce má v České republice velmi dlouhou tradici. Až za vlády Karla IV. se na území Českého království rozšířilo pěstování jabloní do sadů a zahrad (Vlk et al., 2008). V 17. století vznikaly první ovocné školky. V souvislosti s tím se započalo se zakládáním zámeckých zahrad z tvarovaných jabloní (Anonym 14, 2015). Později okolo roku 1800 se tyto výsadby, které byly pod správou klášterů, staly hlavními zdroji rostlinného materiálu pro produkci podnoží v sadařství, které byly dále šlechtěny pro nové techniky záměrného křížení mezi pozitivními výběry (MacHardy, 1996). Velký rozvoj ovocnářství v České republice nastal v 18. století, kdy vznikali ovocnické spolky, které šířily nové poznatky. Od 19. století lze v České republice mluvit již o intenzivním ovocnářství. Vznikali specializované zahradnické školy, vycházela rozsáhlá pomologická díla a byly stanoveny vhodné odrůdy pro pěstování v jednotlivých oblastech České republiky. Po roce 1918 se rozvinul organizovaný ovocnářský výzkum, který zaváděl do velkovýroby nové formy pěstování ovoce. Po druhé světové válce se začala výroba koncentrovat do specializovaných podniků ve výhodných výrobních oblastech (Anonym 13, 2015).

*V. inaequalis* napadá především rostliny z rodu *Malus* spp. Přesně není známa geografická oblast, kde se patogen poprvé vyskytl, ale předpokládá se, že to bylo v oblasti původu a vývoje jeho hostitele, v tzv. genovém centru. Uvádí se tzv. 5 geografických center speciace/výskytu rodu *Malus* spp., jsou to: Východní Asie (Čína, Japonsko, východní Sibiř), střední Asie, Kavkaz (jihozápadní Asie), Evropa a Severní Amerika. Centrum původu či oblast s největší diverzitou rodu je v jihozápadní Asii. Je všeobecně přijímáno, že tento rod zahrnuje 25 – 30 druhů a několik dalších poddruhů.

Genetický původ planě rostoucích druhů rodu *Malus* spp., které jsou rezistentní proti původci strupovitosti a rovněž i původ této choroby, lze identifikovat do východoasijské oblasti. (MacHardy, 1996).



### 3.3 Možnosti ochrany

#### 3.3.1 Nepřímá ochrana - Agrotechnická opatření

V nepřímé ochraně proti strupovitosti jsou významná preventivní pěstební agrotechnická opatření, která omezují vhodnost podmínek pro šíření onemocnění – výběr stanoviště, půdní podmínky, orientace výsadeb, soulad mezi stanovištěm a odrůdou – nevysazovat náchylné odrůdy na riziková stanoviště, výběr podnoží a odrůd, vhodný spon a pěstební tvar, optimální péče o korunu, vyvážené hnojení, doplňková závlaha (Ackerman et al., 2002). Tyto nepřímá ochranná opatření lze zahrnout do zásad tzv. „správné pěstitelské praxe“, které se prakticky využívají při zakládání a ošetřování ovocného sadu (Juroch, 2010). Vzhledem k tomu, že vývoj *V. inaequalis* je závislý na vlhkém a chladném klimatu, jsou pro rozvoj této choroby některé lokality vhodnější než ostatní, což je rozhodující při zakládání ovocného sadu. Také volba odrůdy je velmi důležitá. Lepší je zvolit směs odolných odrůd a vyvarovat se těm více náchylným což může snížit infekční tlak houby. Prořezávání a hnojení jsou další dva důležité faktory pro rozvoj onemocnění. Pokud jsou stromy dobře prořezávané, ovlhčené listy osychají rychleji a sníží se tak riziko infekce. Úroveň hnojení dusíkem během období růstu, je také důležitá, jeho nadbytek může vést k bujnému růstu výhonů, které jsou více náchylné k onemocnění. Doporučuje se také odstranit zdroj primární infekce – spadané listy mulčováním či drcením, případně je zapravit do půdy. Rovněž udržování krátkého zatravnění mezi řadami umožňuje saprofytickým organismům lépe rozložit organickou hmotu, a snížit tak množství primárního inokula (Sandskär, 2003). Také různé zdroje dusíkatých sloučenin se používají k urychlení rozkladu spadaneho listí, je vhodná například aplikace močoviny na listy těsně před opadem, na podzim, kdy je opadáno cca 95% listů a jarní aplikace před rašením (5% roztok močoviny, 1000 l vody na ha) (Kloutvorová, 2011). Využití této metody však může být problematické, jelikož je nutné dodržovat podmínky v rámci agroenvironmentálních opatření (nitratová směrnice) a také je zakázána v ekologické produkci. Jako vhodná substitute se jeví použití z hygienického hlediska neproblematických prostředků, např. hydrogenuhličitanu sodného (jedlá soda) nebo draselného, dolomitického vápence, různých rostlinných výluhů a dalších látek účinkujících přímo proti patogenu. Tato opatření, která omezují zdroje infekce, by se měla provádět nejlépe již na podzim, bezprostředně po opadu nebo případně v předjaří, před začátkem jarní vegetace a tvorby askospor ve vřeckách (Juroch, 2010).

### 3.3.2 Rezistence u rodu *Malus* spp. vůči *V. inaequalis*

Šlechtění nových odrůd jabloní na rezistenci proti *V. inaequalis* patří k jednomu z neúčinnějších nepřímých ochranných opatření proti této chorobě. Šlechtění na rezistenci a pěstování odrůd jabloní s geneticky podmíněnou rezistencí proti původcům chorob je součástí integrované ochrany rostlin, přispívá ke snížení množství používaných pesticidů, a tedy i ekonomických nákladů a zároveň tak i přispívá k ochraně životního prostředí. V nově zakládaných výsadbách a zejména v systému integrované produkce by měly být upřednostněny tolerantní odrůdy a zejména rezistentní odrůdy (Kocourek et al., 2001).

V současnosti se ovocnářský výzkum zaměřuje na šlechtění geneticky rezistentních odrůd a zabývá se jejich praktickým využitím v systému integrované produkce ovoce. Počátky šlechtění rezistentních odrůd se datují do 40. let 20. století v USA, kde se jím zabývala vědecká pracovní skupina PRI (univerzitní šlechtitelské týmy z Purdue, Rutgers, Illinois). V České republice první rezistentní odrůdy vznikly ve výzkumném ústavu ÚEB AV ČR ve Střížovicích a druhým výzkumným centrem, kde se zabývají šlechtěním rezistentních odrůd ke škodlivým organismům je VŠÚO v Holovousích. Tyto ústavy produkují kvalitní rezistentní odrůdy, které jsou ceněné a pěstují se po celé Evropě, zejména mají úspěch u pěstitelů ekologické produkce jablek (Juroch, 2010)

Geneticky založená rezistence rodu *Malus* spp. se vyskytuje u několika druhů, pocházející z východoasijského centra. Dva důležité druhy odolné proti strupovitosti jsou původem z východní Asie a to *M. floribunda* Sieb. a *M. baccata* Borkh., další rezistentní druhy jsou *M. hupehensis* (Pampan.) Rehd., *M. pumila* Mill. a *M. micromalus* Makino z Číny a *M. formosana* (Kaw. a Kodiz.) Kaw. z Thajska. Rezistence nebyla nalezena u divoce rostoucích druhů z rodu *Malus* spp. v oblasti střední Asie, Evropy a severní Ameriky (MacHardy, 1996).

Rezistenci jabloní vůči *V. inaequalis* můžeme rozdělit na dva základní typy. Prvním typem je monogenně založená rezistence což znamená, že se jen jeden gen podílí na rezistentní reakci, tzv. gen velkého účinku. Tento typ rezistence je charakteristický pro některé botanické druhy rodu *Malus* spp. Významným donorem genu tohoto typu rezistence je jablň mnohokvětá – *M. floribunda* Sieb. – klon 821 (Dvořák et al., 1976). A druhým nejčastěji používaným genem rezistence je *Vm* z *M. micromalus* Mak. (Melounová et al., 2004) Rezistence získaná z *M. floribunda* Sieb. 821 je nejvíce využívaným zdrojem rezistence ve šlechtitelských programech, je tvořena dvojicí komplementárních genů (geny *Vf* a *Vfh*) a každý je zodpovědný za jiný typ rezistence. Druhý dominantní gen *Vfh* je odpovědný

za hypersenzitivní reakci hostitele (Bénauf et Parisi, 2000). Rovněž bylo zjištěno, že v řadě rezistentních odrůd je přítomen pouze gen Vf (Parisi et Lespinasse, 1996). Ze světového sortimentu odrůd jabloní s monogenně založenou rezistencí lze uvést: Britegold, Dayton, Enterprise, Freedom, Goldrush, Jonafree, Liberty, Macfree, McShay, Moira, Murray, Nova Easygro, Florina, Nova Mac, Nova Spy, Priam, Prima, Priscilla, Redfree, Richelieu, Rouville, Sir Prize, Trent, William's Pride. V současné době je i v České republice prováděno šlechtění odrůd s monogenně založenou rezistencí vůči původci strupovitosti s využitím genů pocházejících z *M. floribunda* Sieb. Výsledkem tohoto šlechtitelského procesu jsou např. tyto rezistentní odrůdy českého původu: Angold, Goldstar, Hana, Jolana, Julia, Karmín, Lotos, Otava, Produkta, Rajka, Resista Rosana, Rubinola, Topaz, Vanda (Bednář, 2003). Ve šlechtitelských programech mohou být využity i jiné geny pro získání monogenně založené rezistence vůči strupovitosti, ale v porovnání s Vf genem jich je pouze několik, což poukazuje na to, jak málo zdrojů genů rezistence je využíváno. Jedná se např. o geny Va (Antonovka PI 172 623), Vb (*M. baccata* Borkh.), Vbj (*M. baccata jackii* Rehd.), Vm (*M. micromalus* Mak.), Vr (*M. pumila* Mill.) (Parisi et Lespinasse, 1996). V České republice pro tvorbu rezistentních odrůd vůči strupovitosti následnou selekcí byly získány např. rezistentní odrůdy Angold a Produkta. Donorem genu rezistence Va byla odrůda Antonovka (Blažek et Paprštejn, 1997).

Druhým typem rezistence je polygenně založená rezistence vůči strupovitosti, což znamená, že se podílí na rezistentní reakci několik genů, ale tento typ rezistence není plně využit v komerční produkci jablek (Xiangming et al., 2012). Tento typ vyskytuje se zejména u starších českých odrůd (Melounová et al., 2004).

Rasově specifická rezistence (nebo vertikální rezistence) je většinou monogenní a určují ji major geny. Rezistence je účinná proti určitým rasám, ale je neúčinná proti ostatním. Rezistence hostitele k *V. inaequalis* může být i rasově-nespecifická (horizontální) nebo částečná, kdy se na rezistenci podílí několik minor genů (Sandskär, 2003). V současnosti přibývá výsadeb odolných odrůd s prolomenou rezistencí. Důvodem prolomení rezistence je vznik a rozšíření ras houby *V. inaequalis*, které jsou schopné geny rezistence u těchto odrůd překonat (Kloutvorová, 2011). Celosvětově je zaznamenáno 7 ras překonávající různé geny rezistence použité ve vyšlechtěných odrůdách. Z toho šest ras se vyskytuje mimo Evropu a neovlivňují pěstování v České republice. V západní Evropě se objevily dvě rasy patogena překonávající Vf rezistenci (Vávra et al., 2009). Bénauf a Parisi (2000) zjistili, že došlo k prolomení genů rezistence z *M. floribunda* 821 (Vf a Vf<sub>h</sub>) vzniklými rasami houby 6 a 7. První výskyty prolomení rezistence byly zaznamenány v Ahrensburgu v Německu v roce 1984, v Kentu ve Velké Británii

v roce 1994 a v Wilhemínadorpu v Holandsku v roce 1997 (Tenzer et al., 1999). První výskyty strupovitosti na odrůdách nesoucí geny rezistence Vf a Vfh byly v České republice zaznamenány v roce 2006 v lokalitách Břasy a Spálené Poříčí na Plzeňsku, Žernov na Semilsku a Buková Lhota u Benešova ve středních Čechách. V roce 2008 byl výskyt strupovitosti na rezistentních odrůdách pozorován v lokalitách Rohozec u Brna a Branice u Bechyně. Další výskyt symptomů strupovitosti na rezistentních odrůdách byl zaznamenán na lokalitě u Mnichova Hradiště, Železného Brodu a Choustníkova Hradiště, slabé příznaky byly také hlášeny z lokality Střížovice u Trutnova. V roce 2009 byla objevena strupovitost na rezistentních odrůdách v lokalitě Milčice u Pačejova a v pokusné výsadbě VÚRV v Ruzyni. V lokalitách, kde došlo k prolomení Vf genu rezistence, je vhodné pěstovat odrůdy jabloní nesoucí jiný gen rezistence, jejich výběr je však velmi omezený, jsou to například Angold, Produkta, Reglindis (gen Va) a Regia, Reka a Realka (gen Vh4) (Vávra et al., 2009). Také byla prolomena rasou 5 *V. inaequalis* monogenně založená rezistence u odrůd kde byla donorem genu *M. micromalus* (Bénauf et Lespinasse, 1999).

Major geny rezistence hostitele jsou v interakci s odpovídajícími geny avirulence patogena. Je prokázáno, že ke gene-for-gen interakci také dochází mezi jabloní a *V. inaequalis* (Bénauf et Parisi, 2000). Pro detekci genů rezistence vůči strupovitosti se při šlechtění nových odrůd využívá DNA markerů. Základem selekce s využitím markerů (Marker Assisted Selection) jsou molekulárně genetické techniky založené na principu PCR (polymerázové řetězové reakce). Právě tyto techniky umožnily detekovat hlavní gen rezistence vůči strupovitosti způsobené houbou *V. inaequalis* – majorgen Vf u většiny rezistentních odrůd jabloní (Bednář, 2003).

### 3.3.3 Přímá ochrana - Chemická ochrana

Počátky chemické ochrany proti strupovitosti se datují do období 1880-1920. V tomto období byly používány chemické látky, jako je Bordeauxská jícha, a síran olovnatý. Některé z těchto směsí, například polysulfid vápenatý, byly fytotoxické. Tato sloučenina byla populární až do roku 1930, kdy byla nahrazena sírou, která ale byla méně efektivní a neměla tak vysokou eradikační účinnost ve srovnání s polysulfidem vápenatým (MacHardy, 1996). Další výzkum v oblasti životního cyklu patogena, závislosti mezi ovlhčením, teplotou a vznikem infekce a také chemický výzkum a vývoj nových chemických látek vedl po druhé světové válce k zavedení organických fungicidů do systému ochrany jabloní proti strupovitosti. Postupně se tak v praxi začaly uplatňovat účinné látky ze skupiny dithiokarbamátů (ferbam, zineb, maneb, thiram). V roce 1951 byl pak představen captan, o několik let později se začali uplatňovat i fungicidy s eradikativními účinky (dodine). Od sedmdesátých let minulého století se pak

objevily první přípravky se systémovými účinky (benomyl). Výzkum vedl v osmdesátých letech k rozšíření nové generace systémových přípravků založených na bázi inhibitorů biosyntézy ergosterolu (fenarimol, myclobutanil, troforine a další). Dostupnost pesticidů z různých chemických skupin s odlišným mechanismem účinku, vývoj v oblasti signalizační techniky i další poznatky vývoje patogena, ale i první informace o vzniku a vývoji rezistence houby k některým používaným přípravkům, vedly k vypracování a zavedení uceleného systému integrované ochrany jabloní proti strupovitosti (MacHardy, 1996).

Přesné posouzení intenzity onemocnění je základní součástí plánování ochrany proti chorobě. Pokud jsme schopni včas posoudit a odhadnout průběh onemocnění, dokážeme správně načasovat aplikaci fungicidu a zamezit chorobě, aby překročila ekonomický práh škodlivosti. Intenzita onemocnění může být posouzena buď jako incidence (definovaná jako počet napadených rostlin na ploše), intenzita (definována jako množství napadeného pletiva na rostlině/ploše) nebo hustotou lézí (definovaný jako počet lézí na rostlině). Byly navrženy různé parametry pro studium epidemie strupovitosti: náchylnost odrůdy, účinnost fungicidu, včetně incidence onemocnění, počet lézí nebo konidií na výhonku, počet konidií na lézi a počet lézí nebo konidií na jednotku plochy listů. Obecně je jednodušší a rychlejší měřit intenzitu onemocnění a hustotu lézí (Carisse et al., 2011). Ke vzniku infekce dochází, jestliže jsou současně naplněny tyto podmínky: v prostředí je přítomný infekční zdroj (tj. jsou přítomny zralé askospory nebo jsou vytvořené konidie na listech), rostlina má vyvinutá pletiva citlivá k infekci a tato pletiva nejsou chráněna fungicidním filmem a současně dojde ke splnění podmínek nutných pro vznik infekce (potřebná délka ovlhčení při dané teplotě).

Zahájení ochranných zásahů na počátku vegetace by mělo být podloženo monitoringem sledování průběhu dozrávání askospor ve věckách. Přítomnost zralých askospor lze stanovit přímou vizuální kontrolou. Při tomto postupu buďto odebereme na podzim z výsadby listy napadené strupovitostí a přes zimu je uchováme na chráněném místě na zemi v podmínkách odpovídajících podmínkám ve výsadbě nebo využijeme listy odebírané přímo na jaře z konkrétní výsadby. Z listů se vypreparují plodničky, rozmáčknu v kapce vody a mikroskopicky se hodnotí vývoj askospor (zralé askospory mají vytvořenou střední přepážku). Pro stanovení zralosti askospor lze rovněž využít předpovědní model založený na sumě efektivních teplot vyvinutý pro podmínky ČR (Vícha et Juroch, 1998; Juroch, 2010). Zralost askospor nastává při dosažení  $SET_{0,0} = 300 \text{ d}^\circ\text{C}$  od 1.1. Dle dlouholetých pozorování jsou askospory zralé a připravené k výletu vždy před rašením pupenů jabloně (Lánský et. al., 1999). Přítomnost sekundárního infekčního zdroje – tedy konidií se monitoruje přímým vizuálním

sledováním výskytu strupovitosti na listech. Přítomnost pletiv citlivých ke vzniku infekce se hodnotí sledováním vegetativní fáze rostliny (pletiva citlivá k onemocnění se vyskytují na rostlině okamžikem rašení – stádium objevení se zelených špiček listů, případně stadium tzv. myšího ouška) a pak následně se sleduje vývoj nových pletiv narůstajících listů, ev. plodů. Ke stanovení termínu ukončení ochrany je vhodné využít lapače spor, pomocí něhož se prokáže, zda během deště ještě dochází k výletům askospor a je tedy ve výsadbě ještě přítomný zdroj primárních infekcí (Juroch, 2010). Po skončení období primárních infekcí se současně vizuálně vyhodnotí výskyt strupovitosti ve výsadbě. Pokud je napadení stromů strupovitostí nízké (do 0,5 %), a tedy je i nízká nebo bezvýznamná přítomnost infekčního zdroje sekundárních infekcí, může pěstitel zvážit ukončení systému ošetřování (Kloutvorová, 2014).

Pro správné načasování aplikace přípravků na ochranu rostlin je vhodné používat metody prognóz nebezpečí infekce patogenem. Pro všechny metody prognóz jsou důležité vztahy mezi teplotou, úhrnem a délkou trvání srážek a dobou ovlhčení, a časem, který potřebuje patogen k rozvoji infekce. Přesnost a spolehlivost těchto modelů se liší v různých lokalitách (Agrios, 2005). Základem úspěšné chemické ochrany je zvládnutí primárních infekcí (duben, červen), které vyloučí potřebu dalších ošetření během léta (Ackermann et al., 2002; Kloutvorová, 2011). Období, kdy je infekční tlak nejsilnější trvá v ČR dle dlouhodobého sledování průměrně od poloviny dubna do konce II. dekády května, následně se výlety askospor začnou pozvolna snižovat a ke konci II. dekády června období primárních infekcí končí. První chemické ošetření by mělo být aplikováno od fenofáze BBCH 53 – 54 - fenofáze pukání pupenů – tzv. myší ouško (Kloutvorová, 2011). V praxi se využívají dva způsoby chemické ochrany a to před vznikem infekce – preventivní ošetření nebo postinfekčně, na základě sledování průběhu infekcí – kurativní ošetření, případně jako kombinace obou systémů (Ackermann et al., 2002; Kloutvorová, 2011).

Při preventivní ochraně se ošetření provádí průběžně po celou dobu trvání nebezpečí primárních infekcí. Podle lokality a podmínek jsou postřiky aplikovány v intervalu 6 – 8 i více dní. Interval mezi postřiky by měl zohlednit infekční tlak, intenzitu růstu (2 -3 listy týdně) a možnosti použitého fungicidu. Měl by být brán v úvahu rovněž průběh počasí, pokud nastanou suché periody, lze interval mezi ošetřeními prodloužit a ošetřit až při předpokládané změně počasí. Základem preventivního ošetření je aplikace kontaktních fungicidů, lze využít i systémových fungicidů, které mají vedle kurativní i preventivní účinnost. Kontaktní fungicidy se vyznačují dobrým účinkem již za nižších teplot, mají vícebodový („multi-site“) mechanismus účinku a jejich aplikace je vhodná při uplatňování antirezistentní strategie. Pokud

se v preventivním systému ochrany použijí i systémové fungicidy, sníží se riziko vzniku rezistence k těmto přípravkům a také v případě preventivního použití strobilurinových fungicidů se snižuje riziko rezistence k těmto přípravkům. Výhodami preventivní aplikace jsou vyšší jistota účinku a menší náročnost na vyhodnocování podmínek pro infekci. Nevýhodami při použití pouze kontaktních fungicidů je jejich možné smytí při silných srážkách. -V tom případě je nutné aplikaci fungicidu opakovat. Jelikož se tento typ fungicidů nerozvádí cévními svazky rostlin, může dojít rovněž „naředění“ na rostlinných pletivech v případě intenzivního nárůstu listové plochy a nově narostlých listů, které jsou nejnáchylnější k infekci a tak nejsou chráněny před infekcí. Pokud přijde neočekávaný déšť, který způsobí odložení plánovaného dalšího preventivního ošetření a jsou splněny podmínky infekce, je vhodné zvolit aplikaci systémových fungicidů a ošetřit kurativně. Pro preventivní ošetření upřednostňujeme kontaktní fungicidy na bázi captanu, mancozebu, methiramu, thiramu nebo dithianonu. K preventivnímu ošetřování lze využít i ostatní skupiny přípravků na bázi dodinu, anilinopyrimidinů nebo strobiluriny (Ackermann et al., 2002; Kloutvorová 2011).

Při postinfekční ochraně ošetřujeme až po splnění podmínek pro infekci. Tento systém vychází z poznání vztahu mezi dobou ovlhčení, teplotou a infekcí (Juroch, 2010). V posledních 15 letech bylo dosaženo značného pokroku ve vývoji počítačových modelů předpovědi vývoje strupovitosti pro plánování fungicidní ochrany. Všechny tyto modely jsou založeny na vzájemném působení teploty, množství a trvání srážek, ovlhčení listů a doby potřebné pro iniciaci infekce (Agrios, 1997). K ošetření jsou vhodné systémové fungicidy, při důsledném respektování doby kurativní účinnosti. Kurativní účinnost znamená, že tyto fungicidy inhibují růst mycelia uvnitř listu. Tato účinnost trvá pro různé pesticidy různou dobu, např. Chorus 75 WG - cca 48 hodin, Score 250 EC - 72 hodin (výrobce udává až 96 hod.), to znamená, že ošetření musí být učiněno nejpozději do uvedeného počtu hodin po vzniku infekce. Následné ošetření se poté signalizuje pro infekci, která vznikla nejdříve šestý den po předchozím ochranném zásahu. Výhodami aplikace systémových fungicidů je, že pronikají do rostlinných pletiv a jsou rozváděny cévními svazky, proto nehrozí jejich smyv při silných srážkách. Pokud je v průběhu jara sucho a tím pádem malý počet infekcí tak je v případě této cílené ochrany většinou aplikován menší počet přípravků než při paušálním preventivním systémem ošetřování. Nevýhodami systémových fungicidů je jejich náročnost na vyhodnocování podmínek pro infekci, pro jejich aplikaci musí být vytvořena dostatečně velká listová plocha a vyšší průměrná denní teplota (nejméně 12 °C). Tyto fungicidy jsou také ohroženy rizikem vzniku a vývoje rezistence houby (triazoly, strobiluriny). Vnikající rezistence se projeví nižší účinností

těchto přípravků a tím i klesá jejich spolehlivost v ochraně před *V. inaequalis* (Kloutvorová, 2011).

V kombinovaném systému ochrany se obvykle ošetřuje před květem preventivně (méně intenzivní růst, nižší teploty). Postřikový sled je možné při rašení zahájit aplikací měďnatého fungicidu (např. Kuprikol 50, Funguran OH - WP aj.) a následně některého z kontaktních fungicidů (např. Dithane DG Neotec, Captan 80 WP, Delan 750 WDG, Thiram Granuflo a další). V následujícím období po vyrašení a vytvoření určité listové plochy se ošetřuje kombinacemi kontaktů s přípravky s kurativní účinností (při nižších teplotách Chorus-50 WG, Mythos 30 SC; při vyšších teplotách pak DMI fungicidy jako např. Score 250 EC, Talent a další). Tam, kde nedošlo ke vzniku rezistence ke strobilurinům je možné použít i kombinace strobilurinových a kontaktně působících účinných látek. Použití kombinovaných fungicidů nebo tank-mix kombinací (systémová + kontaktní účinná látka) je vhodné zejména pro ošetřování v období pravidelných (opakovaných) infekcí a v období nesilnějšího infekčního tlaku. Tato kombinace spojuje výhody odlišných mechanismů účinku fungicidů, zvyšuje se tak spolehlivost ochranného zásahu a oddaluje se vznik rezistence houby k rizikovým účinným látkám (Kloutvorová, 2011). U většiny systémových fungicidů ze skupiny inhibitorů demetylase (DMIs) byl ve světě prokázán pokles účinnosti na původce strupovitosti jabloně a tím i nástup rezistence k těmto přípravkům. Je proto nezbytné důsledně dodržovat opatření k omezení vzniku rezistence, především tyto přípravky nepoužívat vícekrát než 3x za vegetaci a střídát je s fungicidy s jiným mechanismem účinku. U DMI fungicidů vzniká křížová rezistence, vzájemné střídání přípravků z této skupiny nezabrání vzniku rezistence. Vzhledem ke vzniku a vývoje rezistence je nutno respektovat doporučené počty ošetření i u anilinopyrimidinů a strobilurinů (Ackermann a kol., 2002). Vznik a vývoj ras *V. inaequalis* se sníženou citlivostí ke klíčovým fungicidům, které jsou používány v ochraně před strupovitostí, jako jsou například benomyl, dodin, DMI fungicidy (flusilazol, myclobutanil, bitertanol aj.) a ke strobilurinům mohou vést k selhání chemické ochrany (Kloutvorová et al., 2009).

### 3.3.4 Biologická ochrana

Řada hub má antagonistický vztah k *V. inaequalis*, houbě způsobující strupovitost. Použití biopreparátů (antagonistických druhů hub *Athelia bombacina*, *Microsphaeropsis ochracea*, *Chaetomium* spp., aj.) je stále ve fázi experimentálního ověřování. Takovým antagonistou je například houba *Microsphaeropsis* spp. (kmen P130A), který může proniknout přímo skrze buněčnou stěnu patogena, tudíž je snížen růst a indukována jeho buněčná smrt



(Sandeskär, 2003). Bylo prokázáno, že produkce askospor se snížila až o 85 až 98% za kontrolovaných podmínek, a 75 až 85% v polních podmínkách po aplikaci tohoto biopreparátu na spadané listí (Carisse et al., 2000). Účinnost testovaných biopreparátů je nepřímo úměrná k termínu podzimní aplikace (pozdní aplikace byly méně účinné) (Juroch, 2010). Prozatím, ale nebyla objevena žádná efektivní forma biologické ochrany před strupovitostí (Agrios, 1997). S různým úspěchem byly ověřovány i biopreparáty urychlující rozklad opadaných infikovaných listů (enzymy) (Juroch, 2010)

### **3.4 Rezistence patogena vůči fungicidům**

#### **3.4.1 Definice**

Rezistence k fungicidu je stabilním, dědičným přizpůsobením patogena vznikající během evolučních procesů, které vede ke snížení citlivosti k fungicidu. Vznik a rozvoj rezistence je evoluční proces, který je důsledkem genetické mutace jednoho nebo několika genů současně, která dává patogenu schopnost překonat účinek fungicidu (McGrath, 2001). Opakované použití fungicidu vyvíjí selekční tlak na populaci patogena který zahubí původní citlivé jedince („divoký“ typ), ale nezahubí přizpůsobené (mutantní) jedince v populaci, což má za následek jejich rozšíření v populaci. Fungicid ztratí účinnost a v praxi takovou situaci označíme jako rezistenci patogena k přípravku (Anonym 12, 2014). Systémové a translaminární fungicidy jsou obecně náchylnější ke vzniku rezistence více než kontaktní fungicidy, jelikož mají specifické místo účinku, což znamená, že působí pouze na jeden proces v metabolismu patogena (McGrath, 2001).

#### **3.4.2 Typy rezistence**

##### **3.4.2.1 Kvalitativní rezistence**

Je-li rezistence patogena k některým fungicidům zapříčiněna modifikací jednoho major genu, dochází k úplné ztrátě kontroly nad chorobou. Poté nejsou účinné ani vyšší dávky fungicidu či jeho častější aplikace. Tento typ rezistence se vyskytuje například k benzimidazolovým fungicidům (účinné látky benomyl, thiophanate-methyl) nebo u látek ze skupiny QoI. Kvalitativní rezistence nastává v důsledku konformační změny cílového místa fungicidu u patogena (McGrath, 2001, 2005; Wyenandt et al., 2008). Tato tzv. jedenbodová mutace způsobuje jedinou aminokyselinou změnu v cílovém proteinu, která je zodpovědná za vysokou úroveň rezistence (Brent et Hollomon, 2007).

### 3.4.2.2 Kvantitativní rezistence

Pokud je vznik rezistence důsledkem modifikace několika interagujících genů, patogen vykazuje různý rozsah citlivosti k fungicidu v závislosti na počtu změněných genů (mutací). Rozdíly v citlivosti v rámci populace jsou kontinuální nebo unimodální, a selekce se vyskytuje v určitém směru. Rezistence je v tomto případě vnímána jako narušení kontroly pomocí fungicidů nad chorobou. Účinnost fungicidů se může opět obnovit buď použitím vyšších dávek či jejich častější aplikací. Tento typ rezistence je častý u tzv. „multi-site“ fungicidů, která zasahují více míst v metabolických drahách patogena, pokud se u něj objeví současně několik mutací. Tento typ rezistence se vyskytuje například u skupiny DMI fungicidů (inhibitory demethylace) (McGrath, 2001).

### 3.4.2.3 Cross rezistence

Fungicidy, které mají stejný biochemický mechanismus účinku a náleží do stejné chemické skupiny fungicidů, jsou náchylné ke vzniku tzv. cross (křížové) rezistence. Když dva různé fungicidy mají stejný mechanismus účinku, patogen fungicidy nerozlišuje, to i v případě obsahuje-li každý jinou účinnou látku a jejich chemická struktura je odlišná, patogen je biochemicky považuje za tutéž účinnou látku. Tudíž když je patogen rezistentní k jednomu fungicidu z určité chemické skupiny, je rezistentní ke všem fungicidům oné chemické skupiny. V mnoha případech rezistentní kmeny patogenů ke QoI fungicidům bývají rezistentní ke všem QoI fungicidům. Cross rezistence se vyskytuje pouze v rámci dané chemické skupiny. Z tohoto důvodu QoI-rezistentní subpopulace musí být regulována jinými fungicidy nevyskytujícími se ve třídě QoI inhibitorů (Vincelli, 2002). Proto se ve vývoji nových fungicidů stalo rutinním krokem biologické testování reprezentativní kolekce izolátů cílových původců chorob, u kterých je známo, že se u nich projevila rezistence k některému z dosud existujících fungicidů a k chemickým látkám, které úzce souvisí s chemickou strukturou nebo způsobem účinku nově vyvíjeného fungicidu (Brent et Hollomon, 2007).

Je známa také „negativní křížová rezistence“, jejímž důsledkem je, že v případě změny citlivosti / rezistence k jednomu fungicidu dochází automaticky ke změně citlivosti k jinému fungicidu. Tento jev se vyskytuje poměrně vzácně, byl popsán například u účinných látek karbendazim a diethofencarb (Brent et Hollomon, 2007).

### 3.4.2.4 Mnohonásobná rezistence

Některé kmeny patogenů si vyvinuly zvláštní mechanismy rezistence mezi dvěma nebo více fungicidy z různých chemických skupin. Ty vyplývají z nezávislých mutací, které jsou selektovány expozicí ke každému z použitých fungicidů. Příčinou vzniku mnohonásobné rezistence je nadměrné používání rizikových fungicidů z různých chemických skupin a zároveň nejsou využívány principy správné antirezistentní strategie. Příkladem je výskyt kmenů houby *Botrytis cinerea*, které se staly rezistentní k účinným látkám benzimidazol a dikarboximid (Brent et Hollomon, 2007).

## 3.5 QoIs (Quinone Outside Inhibitors) fungicidy

### 3.5.1 Charakteristika

Dle FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) náleží QoI fungicidy (Quinone outside Inhibitors) dle biochemického mechanismu působení v biosyntetických drahách rostlinných patogenů do třídy C, inhibující mitochondriální respiraci a ovlivňující tak tvorbu energie potřebnou pro buňku patogena. Cílové místo účinku fungicidu (označeno kódem C3) je respirační řetězec, kde blokují elektronový transport v místě oxidace chinolu (tzv. Qo centrum) v cytochromu bc1 na úrovni komplexu III, kde se váží na ubichinol oxidoreduktázu, což má za následek sníženou produkci ATP. FRAC řadí QoI fungicidy do skupiny 11 (používané fungicidy byly dle své příslušnosti k jednotlivým chemickým skupinám rozděleny do jednotlivých očíslovaných skupin). Tyto QoIs jsou účinné proti širokému spektru rostlinných patogenů, včetně zástupců všech tří důležitých tříd rostlinných patogenů: *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* a *Oomycetes*. Většina fungicidů z této třídy je registrována k používání do velkého množství rostlin, i když několik fungicidů je registrováno pro použití pouze užšího spektra plodin a nemocí (Anonym 12, 2014)

Chemické skupiny patřící do třídy QoI inhibitorů využívané v ochraně proti strupovitosti v České republice jsou převážně oximino-acetáty, což je přípravek s účinnou látkou kresoxim-metyl: Discus a další přípravek patřící do stejné chemické skupiny, ale s účinnou látkou trifloxystrobin je Zato 50 WG. Do jiné chemické skupiny methoxy-karbamátů náleží kombinované přípravky s účinnou látkou pyraclostrobin: Tercel (+ dithianon), Bellis (+ boscalid) a Flint Plus (+ captan) (Anonym 2, 2015).

Skupina QoI fungicidů zahrnuje tzv. strobilurinové fungicidy. Jsou odvozeny od původních přírodních látek (antibiotikum strobilurin A a B), které produkuje dřevokazná

stopkovýtrusá houba *Strobilurus tenacellus* (Pers.) Singer (1962) (Anonym , 2015) na obranu proti konkurenci ze strany mikroorganismů přítomných v tlejícím dřevě. Širokospektrální antifungální aktivita vyvolala zájem mezi vědci v rámci agrochemického průmyslu a výzkumné programy se zaměřily na úpravu a posílení aktivity těchto přirozeně se vyskytujících sloučenin. Biochemické a biologické mechanismy účinku kresoxim-methylu jsou specifické proti houbovým patogenům a vyznačují se nízkou toxicitou vůči necílovým organismům. Toxicita existuje pro ryby, dafnie, a zelené řasy *in vitro*. Sloučenina je nemutagenní, nedráždí kůži a oči. V přírodě nepůsobí žádné problémy v důsledku rychlé degradace této účinné látky v půdě, která má poločas několik hodin až několik dní v půdě (Ypema et Gold, 1999). Mezi strobiluriny patří tyto účinné látky vyvinuté chemickými koncerny: azoxystrobin, coumoxystrobin, dimoxystrobin, enoxastrobin, famoxadone, fenamidone, fenaminostrobin, fluoxastrobin, flufenoxystrobin, kresoxim-methyl, mandestrobin, metominostrobin, orysastrobin, pyraoxystrobin, picoxystrobin, pyraclostrobin, pyrametastrobin, pyribencarb, triclopyricarb trifloxystrobin azoxystrobin (Anonym 10, 2014).

Strobilurinové fungicidy mají translaminární účinek (tzn. "přes laminu" neboli listovou čepel). Část účinné látky zůstává na povrchu listu, část je ukládána do voskové kutikuly a část účinné látky pronikne do rostlinných pletiv, pod pokožkové buňky. Některé typy účinných látek (např. trifloxystrobin a kresoxim-metyl), které mají afinitu k voskové kutikule listu, pronikají translaminárním transportem (s malou účastí či bez účasti vaskulárního systému) na spodní stranu listu. Díky tomu může být fungicid obsažen na obou stranách listu, i když byl aplikován pouze na svrchní stranu listu. Tyto fungicidy, které minimálně využívají vaskulárního systému, tzn. že nejsou systémové, se označují jako mesosystemické, kvazi-systemické nebo povrchově systemické. Výjimku tvoří fungicidy s účinnou látkou azoxystrobin, která se transportuje jak translaminárně tak systémově (přes vaskulární systém). Z hlediska praktického významu, systémový transport (pokud k němu dojde) a translaminární transport pomáhají kompenzovat neúplné pokrytí postřikem. Dalším praktickým důsledkem dynamiky translaminárního transportu je kurativní účinek při léčbě symptomů vyvolaných patogenem. QoI fungicidy mají rovněž preventivní účinek, jelikož efektivně ničí klíčící spory, které iniciují proces infekce na vnější straně listu. U řady houbových patogenů jsou více citlivé k QoI fungicidům spory, než mycelium nacházející se uvnitř rostliny. To znamená, že pro nejlepší využití QoI fungicidů se doporučuje je aplikovat před proběhnutím infekce. Co se týče fytotoxicity, je známo, že způsobují fytotoxicitu za určitých, omezených okolností, ty bývají

popsány na etiketách výrobků. Například odrůdy jabloní s genetickým pozadím, které zahrnuje odrůdu MacIntosh, jsou velmi citlivé k azoxystrobinu (Vincelli, 2002).

Tyto fungicidy byly v Evropě zaregistrovány a uvedeny na trh poprvé v roce 1996. Krátce po uvedení na trh, byla v roce 1997 zjištěna rezistence k těmto přípravkům u *V. inaequalis* poprvé v experimentálním sadu ve Francii, ve Švýcarsku a v severním Německu (Gisi et al., 2002). U této skupiny fungicidů je riziko rezistence vysoké. Rezistence byla prokázána u mnoha různých houbových patogenů. Rezistenci zapříčiňují mutace v cílovém místě účinku v genu cytochromu bc1 a další mechanismy jako je např. alternativní dýchání. Křížová rezistence je prokázána mezi všemi fungicidy QoI skupiny (Anonym 10, 2014). Díky intenzivnímu monitoringu rezistence *V. inaequalis* ke QoI, které bylo prováděno v Evropě, je známo, že v oblastech, ve kterých je rezistence přítomna, je její úroveň velmi různorodá, od nulových hodnot až po vysoké, dokonce i mezi sousedními sady. Intenzivní monitoring, který byl proveden v roce 2010, ukázal různé frekvence rezistence rezistentních izolátů *V. inaequalis* vyskytujících se v Evropě. Vysoká frekvence rezistence byla zaznamenána v Řecku a severní Itálii. Středně vysoká frekvence rezistence byla zaznamenána v jižní Francii a východním Německu. Nízká až střední frekvence rezistence byla zaznamenána v jižním Německu, Belgii a Rakousku a nízká frekvence rezistence byla zaznamenána ve Španělsku, severozápadní Francii a ve Velké Británii. V tomto roce byla poprvé zaznamenána rezistence ke QoI fungicidům na Novém Zélandu. K dispozici nebyly žádné údaje v roce 2010 v Polsku a Portugalsku (Anonym 11, 2011). V roce 2011 byl opět proveden intenzivní monitoring citlivosti *V. inaequalis* QoI fungicidům a byla zaznamenána tato data: vysoká úroveň frekvence rezistence byla zaznamenána v severním Německu, Polsku a Holandsku. Střední až vysoká frekvence rezistence byla zaznamenána v jižní Francii, severním Německu a Belgii. Nízká až střední frekvence rezistence byla zaznamenána jižním Německu. Ne příliš nízká frekvence rezistence byla zaznamenána v severozápadní Francii a Velké Británii. Rezistence byla zaznamenána na Novém Zélandě a v jižní Brazílii. V Portugalsku byla také zaznamenána rezistence, ale většina vzorků populací *V. inaequalis* byla citlivá (Anonym 6, 2012). Monitoring rezistence v roce 2012 prokázal vysoké frekvence rezistence v severním Německu, Maďarsku a Belgii. Střední až vysokou frekvenci rezistence v Austrálii. Střední frekvence rezistence byla zaznamenána v jižní Francii a nízká až střední frekvence rezistence byla zaznamenána v jižním Německu. Ne příliš nízká rezistence byla opět zaznamenána v severozápadní Francii a ve Velké Británii. Z tohoto roku nebyla k dispozici data z Polska a Itálie (Anonym 7, 2013). Monitoring rezistence, který byl proveden v roce 2014, ukázal vysoké frekvence rezistence v jižní Francii

a Německu (ve většině regionů). Střední frekvenci rezistence ve střední Francii a údolí Loire a v jižním Německu. Nízká frekvence rezistence byla zaznamenána v severozápadní Francii (Anonym 8, 2015).

### 3.5.2 Princip rezistence ke QoI fungicidům

Stanovení potenciálu vzniku a vývoje rezistence u sledovaných druhů patogenů, její monitoring a doporučení jak ji předcházet je jedním ze základních podmínek pro využívání chemických ochranných prostředků v praxi. Potřebné informace mohou vycházet z výsledků laboratorních testů, polních pokusů v terénních podmínkách a zemědělské praxe (Jeřábková, 2010). Tam, kde monitoring rezistence není běžnou praxí, je rezistence poprvé zaznamenána až když pěstitelé zpozorují významné selhání účinnosti dříve účinných přípravků. Poté se musí rezistence odebraných vzorků patogena potvrdit za kontrolovaných podmínek v laboratoři. Toto potvrzení je důležité, protože existuje mnoho důvodů, proč se dříve účinné látky staly neúčinnými (např. intenzivní infekční tlak onemocnění, neúplné pokrytí rostlin fungicidem, nepřesné dávkování nebo načasování aplikace atd.) (Anonym 12, 2014). Analýza mechanismu vzniku rezistence může probíhat na několika úrovních: molekulární (klonování a sekvenování cílového genu a identifikace lokusu rezistence), genetické (způsob segregace při křížení rezistentních a citlivých jedinců), biochemické (působení fungicidu na cílové místo), fyziologické (transport a degradace fungicidu) a populační (četnost a agresivita rezistentních jedinců) (Gisi et al., 2000). Metody detekce rezistentních jedinců jsou založeny na biologických testech citlivosti a molekulárních markerech. Při detekci rezistence je využíváno *in vitro* (testy klíčivosti spor v kapkách fungicidu) a *in vivo* testování (přenos mycelia, spory na agar s přídavkem fungicidu, nebo na rostliny ošetřené fungicidem). Rozvoj molekulárních metod dovoluje detekci vyskytujících se mutací. K detekci bodové mutace může být použita PCR za použití buď „alelově“ specifických primerů nebo příslušných sond ke zkoumání namnožených DNA fragmentů (Brent et Hollomon, 2007).

Specifické místo účinku QoI fungicidů je příčinou potencionálního rizika vedoucího k vývoji a vzniku rezistence. To znamená, že z velkého množství biochemických reakcí probíhajících v buňce patogena, QoI fungicidy zasahují pouze jeden velmi specifický biochemický pochod v jednom místě metabolismu patogena. To je důležité, protože, jen jedna mutace v tomto místě (biochemické cílové místo fungicidu) může mít za následek vznik kmene patogena odolného k fungicidu. Toto specifické místo účinku, kde je specifický enzym fungicidu vázán v buněčném metabolismu patogena se nazývá MOA („Mode of action“)

či cílové místo účinku („Target site“). Například, strobilurinové fungicidy a SDHI fungicidy mají stejný MOA (inhibici dýchání), ale mají různá místa působení v dýchacím řetězci; SDHI blokuje komplex II, zatímco strobiluriny blokuje komplex III (Anonym 10, 2014). Pokud dojde ke vzniku takového kmenu, který je fungicidně-rezistentní, opakovaná aplikace QoI fungicidů může vést ke kumulaci rezistentní subpopulace patogena. Zkušenosti s QoI fungicidy ukazují, že je zde vysoké riziko vzniku rezistentních subpopulací různých patogenů. Po celém světě byla hlášena rezistence u rostoucího počtu patogenů polních plodin, ovoce, zeleniny, skořápkovin, okrasných rostlin a trávníků (Vincelli, 2002).

Existují dva hlavní typy rezistence k fungicidům: kvantitativní a kvalitativní. Při výskytu rezistence ke QoI fungicidům, v mnoha případech všechny možnosti regulace patogena selhávají a to z důvodu výskytu rezistence kvalitativního typu. Rovněž jsou zaznamenány případy, u kterých se vyskytla rezistence kvantitativního typu k určitým QoI fungicidům (Vincelli, 2002).

Změna v cílovém místě působení fungicidu, která snižuje citlivost k přípravku, je nejčastěji se vyskytujícím mechanismem rezistence u fytopatogenních hub. Při reprodukci hub dochází ke změnám v jejich DNA (mutacím). Některé mutace mají za následek změny v aminokyselinové sekvenci cílového místa což má za následek změnu tvaru zámku enzymatického komplexu/ cílového místa. Fungicid/ klíč enzymatického komplexu se nemusí být kompatibilní s cílovým místem / zámekem a to má za následek snížení citlivosti (Anonym 12, 2014)

Tento mechanismus rezistence se vyskytuje i u houbových organizmů, které jsou přirozeně rezistentní k vlastním metabolitům - strobilurinům, jako jsou stopkovýtrusé houby produkující strobilurin - *Strobilurus tenacellus* a *Mycena galopoda*. Tento mechanismus je založen na bodové mutaci, výměně aminokyselin uvnitř vazebného místa strobilurinu (Qo centrum) v cytochromu bc1. U fytopatogenních hub je tento mechanismus rezistence taky uplatňován.

Existují mutace spojené s rezistencí ke QoI fungicidům. Byly zjištěny tři substituce aminokyselin v genu cytochromu b, jsou to: změna z glycinu na alanin v pozici 143 (G143A), změna z fenylalaninu na leucin v pozici 129 (F129L) a změna z glycinu na arginin v pozici 137 (G137R). Všechny mutace G143A, G137R a F129L jsou založeny na jednotlivých nukleotidových polymorfismech v genu cytochromu b. Faktor rezistence (RF = ED<sub>50</sub> [rezistentní kmen] / ED<sub>50</sub> [citlivý nebo kmen „divokého“ typu]) spojené s mutacemi G143A, G137R a F129L jsou různé. Faktor rezistence připisovaný mutaci G143A,

je ve většině případů vyšší než 100. Izoláty patogena nesoucí mutaci G143A vytváří (kompletní) rezistenci. Izoláty patogena s mutací F129L nebo G137R vytváří mírnou (částečnou) rezistenci. Pokud se aplikují QoIs fungicidy dle doporučených dávek, které uvádí výrobce, lze zajistit účinnou dostatečnou kontrolu nad chorobou, která je způsobena patogenem s mutací s F129L nebo G137R. Naopak úplnou ztrátu kontroly nad patogenem, lze vždy pozorovat v populacích patogena, u kterých je dominantní mutace G143A, vyskytuje se většinou v případech, kde jsou QoIs fungicidy aplikovány samostatně (Anonym 10, 2014).

Výměna aminokyselin je situována do 2 oblastí v cytochromu bc1 nazývaných „hot spot“ oblasti (aminokyselinové zbytky 120-160 a 250-300) (Vincelli, 2002). Při analýze izolátů *V. inaequalis* byly identifikovány tři mutace měnící primární strukturu bílkovinné části cytochromu b. Jednalo se o substituce aminokyselin v kodonech mRNA v pozicích 129 (F129L), 137 (G137R) a 143 (G143A) (Zheng et al., 2000). Pro hodnocení vlastního rizika rezistence ke QoI fungicidům je cytochrom bc1 u askomycet (*V. inaequalis*) sekvenován a charakterizován dle organizace exon/ intron. Na těchto sekvencích jsou založeny specifické primery a metodou Q-PCR (Quantitative Polymerase chain reaction) objevena rezistence v populacích vyskytujících se na poli/sadu (Grasso et al., 2006).

Kromě mutací vazebného místa, může být snižená citlivost ke QoI fungicidům vyvolána iniciací alternativního dýchání, což je reakce na působení QoI fungicidů jako inhibitorů dýchání. Tento alternativní proces dýchání je aktivní v přítomnosti alternativní oxidázy, k expresi tohoto enzymu dochází v důsledku stresu a snížením toku elektronu v metabolické dráze cytochromu, které je způsobeno inhibitory dýchání. U *V. inaequalis* je rezistence ke strobilurinům způsobena i tímto mechanismem (Olaya et Köller, 1999). Předpokládá se, že kyslíkové radikály vzniklé inhibičním působením strobilurinů na cytochrom, indukovaly tvorbu alternativní

oxidázy (Ypema et Gold, 1999). Dalším mechanismus zapříčiňující rezistenci je metabolizace keroxim-methylu enzymy esterázami a cytochrom P450 monooxygenázou. Buňky hub obsahují širokou škálu metabolické nástrojů pro buněčné procesy. Tyto metabolické nástroje jsou schopny upravit fungicid na netoxickou formu, která již není škodlivá pro buňky houby (Anonym 12, 2014)

Snižená citlivost ke QoI fungicidům v populacích *V. inaequalis* se typicky vyskytuje ve dvou fázích. Zpočátku se populace patogena posune směrem ke snížené citlivosti ke QoI fungicidům, zatímco dávky fungicidů, které se aplikují, jsou ještě účinné. Postupně jak se v populaci zvyšuje počet rezistentních kmenů, rezistence se rozvíjí a šíří. V této počáteční fázi



se mohou vyskytnout kmeny s vysokou úrovní rezistence v důsledku bodové mutace v cytochromu bc1. Sled fungicidní ochrany může výrazně ovlivnit časový interval mezi prvním výskytem vysoce rezistentních kmenů a jejich narůstající převahu v populaci, a tím i dobu kdy normální dávky fungicidu stále ještě účinkují. Pokud populace rezistentních kmenů nadále narůstá, díky selekčnímu tlaku způsobeného fungicidem, nastupuje druhá fáze - polní rezistence a může dojít k rozsáhlému selhání používaného fungicidu. Rezistence ke QoI fungicidům byla hlášena u izolátů *V. inaequalis* z produkčních sadů v Kanadě (< 2 % izolátů), Chile, Běloruska a Polska a bodová mutace G143A byla zjištěna v izolátů *V. inaequalis* z Německa a Francie (Lesniak et al., 2011).

### 3.5.3 Antirezistentní strategie

Organizace FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) vydává opatření a pokyny ke snížení rizika výskytu a vývoje rezistence k fungicidům, které představují komplexní postupy pro prodloužení účinnosti „rizikových“ skupin fungicidů a omezují tak ztráty způsobené rezistencí. Tato organizace je speciální technickou skupinou CropLife International (CLI), dříve Global Crop Protection Federation (GCPF), je složena z vědců a výrobců rizikových fungicidů. Dalšími hlavními cíli FRAC jsou identifikovat existující a potenciální problémy rezistence, shromažďovat, evidovat a distribuovat informace získané z výzkumu fungicidů, doporučit postupy používané při studiu rezistence a spolupracovat s vysokými školami, vládními organizacemi, poradci, distributory a zemědělci (Anonym 9, 2014).

Primární opatření proti vzniku rezistence ke QoI fungicidům by měli být nechemické prostředky ochrany jako je např. výběr odrůd rezistentních k strupovitosti. Co se týče chemické ochrany, faktory, které ovlivňují vývoj rezistence, zahrnují typ fungicidu, frekvenci a délku jeho používání, způsob jeho aplikace (tj. samostatně nebo v kombinaci), vlastní schopnost patogena vytvářet si rezistenci k danému fungicidu a také schopnost rezistentních forem přežít do následující vegetační sezóny (Kloutvorová, 2011). Co se týče vlastností fungicidu, tak je rozhodující jeho mechanismus účinku. U účinných látek s tzv. „multi-site“ působením (tzn., že zasahují na více místech do vývoje a metabolismu patogena), který se vyskytuje především u kontaktních fungicidů, si patogen vytváří rezistenci obtížněji, případně nevytváří a riziko vzniku rezistence je tak velmi eliminováno. Především systémové fungicidy se vyznačují specifickým místem účinku, který ovlivňuje jen jeden určitý biochemický pochod v buňce (inhibice biosyntézy ergosterolu, inhibice dýchání atd.),

což je případ strobilurinových fungicidů, je vytvoření rezistence k těmto látkám vysoké (Kloutvorová et al., 2009).

Doporučuje se omezit počet aplikací QoI fungicidů během sezóny, jelikož čím častěji jsou tyto fungicidy používány, tím vyšší potom je selekční tlak vedoucí k vytvoření rezistentní populace patogena. Čím méně se tyto fungicidy budou používat, tím déle se prodlouží možnost použití těchto přípravků. Na etiketě na obalu fungicidu je uveden omezený počet aplikací během sezóny (Vincelli, 2002). Další základní strategií je střídání fungicidů s odlišným mechanismem účinku v průběhu postřikového sledu a využívání tank-mix kombinací přípravků z odlišných skupin v rámci jedné aplikace. Střídání přípravků může být efektivnější v plodinách, kde je zapotřebí velký počet ošetření během vegetační sezóny a zároveň je k dispozici jen omezené množství fungicidů s odlišným mechanismem účinku. Použití kombinace dvou odlišných účinných látek v jedné aplikaci je efektivnější vzhledem k účinnosti ochranného zásahu, ale naopak omezuje možnosti vzájemného prostřídání přípravků s různým mechanismem účinku v rámci postřikového plánu celé vegetační sezóny. Hlavní zásadou při použití kombinací je neaplikovat ve směsi současně takové účinné látky, které jsou vzájemně ohroženy tzv. křížovou rezistencí. Proto není žádoucí kombinovat ve směsi např. dva přípravky, které jsou oba založeny na bázi strobilurinů, ale je vhodné je kombinovat např. s kontaktní účinnou látkou (mancozeb, metiram, thiram, captan, ditianon atd.). Směsi fungicidů ovšem již nejsou účinné proti vzniklým rezistentním jedincům patogena, ale mohou zpomalit rychlost jejich šíření v populaci. Dávky jednotlivých přípravků by při jejich použití ve směsi měly zůstat na úrovni, která zaručuje takovou účinnost, jakou by pesticid měl při sólové aplikaci. Dávka ve směsi by se neměla snižovat pod 75 % dávky stanovené pro samostatnou aplikaci (Kloutvorová, 2011). Nejvhodnější je preventivní použití QoI fungicidů v raných fázích vývoje choroby a směřovat jejich aplikace mimo období nejsilnějšího infekčního tlaku. Při vysokém infekčním tlaku by interval mezi ošetřeními QoI fungicidy neměl přesáhnout 7-10 dnů. V případě potvrzení rezistence je nutné vyřadit strobilurinové přípravky ze systému ochrany po dobu několika let. (Vincelli, 2002). Aplikovat by se měly maximálně 3 ošetření QoI fungicidy na plodinu. Maximálně 4 ošetření QoI fungicidy lze použít tam, kde se provádí 12 nebo více aplikací ošetření plodiny. Doporučují se maximálně 2 po sobě jdoucí aplikace QoI fungicidů. Tam, kde byla zaznamenána snížená citlivost ke QoI fungicidům je doporučeno je aplikovat pouze ve směsích a střídat je s fungicidy z jiné skupiny, aby nedocházelo ke cross-rezistenci (Anonym 9,2014)

Na několika lokalitách v České republice letech byl zaznamenán pokles účinnosti a nástup rezistence k systémovým přípravkům na bázi strobilurinů, jelikož došlo k selekci ras patogena rezistentních ke strobilurinům (Kloutvorová et al., 2001; 2009).

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

Jako pokusný rostlinný materiál sloužily vzorky listů napadené patogenem *V. inaequalis*, které byly odebírány z produkčních výsadeb z různých lokalit na území České republiky. Vzorky byly zpracovány následující den po odběru. Citlivá populace byla odebírána z osaměle rostoucího stromu na okraji obce Lázně Bělohrad. Tento strom nebyl nikdy fungicidně ošetřován a je vzdálen od nejbližších zahrad více než 1 km a od produkčních výsadeb více než 5 km.

Jako další rostlinný materiál byly použity semenáčky odrůdy „Golden Delicious“, pro *in vivo* testy rezistence *V. inaequalis* vůči strobilurinům. Semena „Golden delicious“ byla stratifikována následujícím způsobem. Semena byla po dobu 24 hodin namočena v pitné vodě v kádince, poté byla voda slita. Následovně byla semena zalita merthiolátem (0,5 g/ l) a ponechána v něm po dobu 10 minut, poté byl merthiolát slit a semena byla promyta v destilované vodě. Před vlastní stratifikací byla semena ošetřena fungicidem Rovral (5 ml/ l). Semena byla rozložena na sterilizovaný filtrační papír, uložena do igelitového sáčku, jenž byl poté zavařen. Takto uskladněná semena byla zabalena do alobalu, aby se zamezilo přístupu světla. Semena byla stratifikována v chladničce při teplotě 3 °C po dobu 4 měsíců. V průběhu stratifikace byl stav semen kontrolován, bylo-li třeba, byla injekční stříkačkou doplněna voda. Výsev byl proveden do květináčů o rozměru 10x10 cm, do výsevního substrátu do hloubky cca 1-1,5 cm. Takto vysazené semenáčky byly ošetřeny fungicidním přípravkem Rovral (5 ml/ l).

### 4.2 Fungicid Discus<sup>®</sup>

Postřikový fungicidní přípravek s obchodním názvem Discus od firmy BASF je ve formě ve vodě dispergovatelného granulátu. Účinná látka je kresoxim-methyl (50 %) tj. methyl-(E)-methoxyimino-[alfa-(o-tolyloxy)-o-tolyl] acetát. Tento fungicid je účinný proti houbovým chorobám jabloně (strupovitost jabloně - *Venturia inaequalis*, padlí jabloně – *Podosphaera leucotricha*), révy vinné (padlí révy - *Uncinula necator*, s vedlejším účinkem na další houbové choroby), máku setého (spála máku – *Helminthosporium papaveris*), angreštu (americké padlí angreštu – *Sphaerotheca mors – uvae*) a růží (padlí růže – *Sphaerotheca pannosa* a černá listová skvrnitost růže – *Diplocarpon rosae*). Účinek

je založen na zabránění přenosu elektronů v dýchacím procesu, čímž je zabráněno sporulaci a klíčení spor. V závislosti na škodlivém organismu a termínu aplikace vykazuje protektivní, kurativní a eradikativní účinek. Přípravek je z místa dopadu rozváděn po povrchu rostliny, takže posléze vytvoří ochrannou vrstvu. Přípravek je plně selektivní v jakékoli růstové fázi.

Jabloně jsou ošetřovány od fenofáze zelený pupen až myší ouško, ošetření je doporučeno ukončit nejpozději 35 dní před sklizní. Rozhodující období infekcí a hlavní období nasazení přípravku je od druhé poloviny dubna do konce května. Interval použití za trvalého infekčního tlaku je 10 – 14 dní. Kurativní účinnost je do 72 hodin po počátku infekce. Optimální je preventivní použití, a pokud první dvě ošetření následují po sobě v jednom bloku. Před a po ošetření přípravkem Discus je nutné použít přípravky s odlišným mechanismem působení. Z důvodu omezení rizika vzniku rezistence je doporučeno použít přípravek maximálně 3x v průběhu jedné vegetace (Anonym 16, 2015).

## 4.3 Metodika

### 4.3.1 Příprava inokula

Pro *in vivo* skleníkové testy je potřebné mít k dispozici dostatečné množství napadených listů testovaného vzorku, aby bylo možné získat jejich smytím potřebné množství suspenze konidií s požadovanou koncentrací spor. Do Erlenmayerovy baňky byly vloženy napadené listy (20 – 30 ks), které byly zality pitnou čistou vodou, poté byly ponechány na třepačce po dobu 20 minut. Konidie musí mít dostatečnou klíčivost a životaschopnost. V Bürkerově komůrce byla spočítána koncentrace konidií, která by měla být minimálně  $20 \times 10^4$  ml.

### 4.3.2 *In vitro* testy klíčivosti spor

V testech byla použita metoda klíčivosti konidií v kapkách postřikové kapaliny testovaného fungicidu Discus a to při maximální účinné koncentraci 0,2 g/ l. Postřiková kapalina byla pipetována do jamek podložních sklíček (80  $\mu$ l do každé jamky, celkem 6 jamek pro každou variantu) a do těchto kapek byly přeneseny konidie houby *V. inaequalis* pocházející z jednotlivých vzorků. V jedné variantě byla vždy použita čistá pitná voda bez fungicidu jako kontrola. Sklíčka s konidiami byla poté inkubována ve vlhké komůrce po dobu 48 hodin při teplotě  $22 \pm 2$  °C. K *In vitro* testům klíčivosti byl zvolen postup využívaný ve VŠÚO Holovousy. Pod mikroskopem byl počítán počet vyklíčených spor (průměrně 500

spor ve variantě). Bylo vypočítáno procento klíčivosti z celkového množství hodnocených spor v jednotlivých variantách.

Na základě procenta klíčivosti konidií zjištěného v kapce fungicidu a porovnání s procentem klíčivosti stejného vzorku ve vodě lze izoláty *V. inaequalis* zařadit do následujících kategorií.

Tabulka č. 3: Kategorie citlivosti populací *V. inaequalis*

<b>Rezistentní</b>	ve fungicidu klíčí 50 a více % konidií ve srovnání s kontrolou
<b>Značně snížená citlivost</b>	ve fungicidu klíčí 20 až 49 % konidií ve srovnání s kontrolou
<b>Snížená citlivost</b>	ve fungicidu klíčí 1 až 20 % konidií ve srovnání s kontrolou
<b>Citlivá</b>	ve fungicidu klíčí do 1 % konidií ve srovnání s kontrolou
<b>Velmi citlivá</b>	ve fungicidu neklíčí žádné konidie

Relativní klíčivost spor v % vzhledem ke kontrole byla vypočítána dle vzorce:

$$RK (\%) = \frac{\% \text{ klíčivosti spor v postřikové kapalině}}{\% \text{ klíčivosti spor v kontrole}} \times 100$$

#### 4.3.3 *In vivo* skleníkové testy

V případě skleníkových testů jsou využívány umělé infekce hostitele příslušným patogenem. Tyto testy vyžadují vypěstování živého hostitele, v případě tohoto pokusu byly použity semenáčky citlivé odrůdy k původci strupovitosti „Golden Delicious“. Semenáčky byly staré minimálně 4 týdny, aby měly vyvinuté alespoň 4-6 pravých listů. Mladé semenáčky jabloně odrůdy „Golden Delicious“ byly 24 hodin před založením pokusu ošetřeny postřikovou kapalinou s přípravkem Discus o 0,02 % koncentraci (0,2 g/ l). Zvolená koncentrace odpovídá koncentraci přípravku aplikovaného v sadech v rámci praktické ochrany jabloní proti původci strupovitosti a je současně i registrovanou dávkou přípravku

do této plodiny. Pro každou variantu bylo zvoleno 20 rostlin, jako kontrola byla zvolena neošetřená varianta rovněž v počtu 20 rostlin.

Rostlinný materiál byl po postřiku suspenzí spor umístěn na 48 hodin do prostorově omezeného klimatizovaného boxu pro udržení vysoké vzdušné vlhkosti nutné ke vzniku infekce. Vyhodnocení pokusu bylo provedeno po 4 týdnech kultivace, kdy byla hodnocena intenzita napadení listů podle pětibodové stupnice (viz tab. 4). Listy byly v rámci hodnocení přiřazeny do jednotlivých kategorií stupnice a dle Townsend-Heubegera (1943) bylo vyjádřeno celkové napadení pro každý izolát:

$$P (\%) = \frac{\sum(n \times v)}{X \times N} \times 100$$

P = celkový stupeň napadení

n = počet listů v jednotlivých kategoriích napadení

v = číselné hodnoty kategorií napadení (hodnoty stupnice)

X = hodnota nejvyšší kategorie napadení

N = celkový počet listů včetně nenapadených

Tabulka č. 4: Pětibodová stupnice použitá k hodnocení *in vivo* skleníkových testů

<b>0</b>	bez napadení
<b>1</b>	1-2 malé skvrny – napadeno (do 25 mm <sup>2</sup> plochy)
<b>2</b>	3-4 malé skvrny nebo 1 velká (do 100 mm <sup>2</sup> )
<b>3</b>	5-10 malých skvrn nebo 5 velkých (do 400 mm <sup>2</sup> )
<b>4</b>	nad 400 mm <sup>2</sup>

Fungicidní účinnost byla vypočítána dle Abbota (1925):

$$\% \text{ účinnosti} = \frac{\text{napadení v kontrole} - \text{napadení ve variantě}}{\text{napadení v kontrole}} \times 100$$

#### 4.3.4 Monosporické izoláty

K získání monosporických izolátů byl proveden následující postup. Konidie *V. inaequalis* byly odebírány ze sporulujících lézí na napadených listech jabloní a stěrem přeneseny na hodinové sklíčko do kapky sterilní vody a poté rozetřeny suchou skleněnou sterilní tyčinkou po povrchu vodního agaru (2%, Fluka). Konidie na agaru pak byly inkubovány po dobu 24 hodin při teplotě  $22 \pm 2$  °C. Následně byly pod mikroskopem vyhledávány jednotlivé klíčící konidie, které byly přeočkovávány na živné médium CYGA (Chloramphenicol Yeast Glucose Agar, 4%, HIMEDIA), které je vhodné pro potlačení růstu nežádoucích mikroorganismů. Vzniklé monosporické izoláty byly kultivovány při teplotě  $22 \pm 2$  °C a běžném denním světelném režimu a dále byly použity na založení vlastních testů růstu mycelia na agaru s přidavkem fungicidu a k detekci rezistence pomocí molekulárních metod.

#### 4.3.5 Metoda *in vitro* testů hodnocení rezistence na základě růstu mycelia na agaru s přidavkem fungicidu

Tato metoda je pracovně i časově značně náročná a vyžaduje získání většího množství monosporických izolátů. Z těchto izolátů se pak dále napěstují kultury houby, které se rozočkovávají a poté se inkubují na živném médiu s přidavkem fungicidu. V případě tohoto pokusu byl použit fungicid Discus o 0,02 % koncentraci, což odpovídá 0,2 g/ l, který byl přidán do živného média po autoklávování (121 °C, 20 min). Jako živné médium byl použit agar CYGA (Chloramphenicol Yeast Glucose Agar, 4 %, HIMEDIA). Kontrolní varianta byla bez přidavku fungicidu. Test byl založen po 4 Petriho miskách na každý vzorek, do každé Petriho misky bylo rozočkováno po čtyřech koloniích patogena. Pokus byl proveden ve dvou opakováních. Vyhodnocení testů proběhlo po 4 týdnech kultivace, byl změřen průměr (d) kolonií mycelia v cm a hodnoty byly dosazeny do vzorce pro výpočet nárůstu mycelia v %.

$$NM = \frac{d_n}{d_k} \times 100$$

$d_n$  = průměr narostlé kolonie pokusné varianty v cm

$d_k$  = průměr narostlé kolonie kontrolní varianty v cm



#### 4.3.6 Detekce rezistence pomocí molekulárních metod

S rozvojem molekulárně genetických metod se otevírají i možnosti testování rezistence na základě detekce genů rezistence v cílovém organismu.

Izolace DNA *V. inaequalis* byla provedena z monosporických izolátů pomocí kitu GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit od firmy Sigma. Mycelium houby bylo setřeno špachtličkou z agaru do 1,5 ml mikrozkušavky. Narušení buněk bylo dosaženo střídáním teplé lázně (cca 50 – 60 °C) a studené lázně s tekutým dusíkem (proces byl opakován celkem 5x).

Následovalo uvolnění nukleových kyselin z buněk. Do mikrozkušavky s takto upraveným myceliem bylo přidáno 350 µl Lysis Solution (Part A) a 50 µl Lysis Solution (Part B). Obsah eppendorfky byl důkladně promíchán na vortexu. Po přidání Lysis Solution (Part B) vznikla bílá sraženina. Směs byla inkubována ve vodní lázni po dobu 10 minut při teplotě 65 °C a občasným obrácením mikrozkušavky byla rozpuštěna sraženina. Pro zabránění kontaminace DNA RNA bylo přidáno 50 jednotek Rnázy A, která nebyla dodána v kitu. Následně pro precipitaci nukleových kyselin bylo přidáno 130 µl Precipitation Solution. Směs byla převrácením mikrozkušavky promíchána a vzorky byly umístěny na 5 minut do ledu. Poté byly centrifugou stočeny při maximální rychlosti (12000 – 16000 ot./ min.) po dobu 5 minut do vzniku pelety buněčného odpadu, proteinů a polysacharidů. Opatrně byl odpipetován supernatant na filtrační kolonku a vložen do nové mikrozkušavky. Směs byla centrifugována při maximální rychlosti po dobu 1 minuty. Takto byl odstraněn buněčný odpad, který nebyl odstraněn v předcházejícím kroku. Filtrační kolonka byla odstraněna a vyhozena.

Poté byly centrifugou stočeny při maximální rychlosti (12000 – 16000 ot./ min.) po dobu 5 minut do vzniku pelety buněčného odpadu, proteinů a polysacharidů. Opatrně byl odpipetován supernatant na filtrační kolonku (GenElute Filtration Column) v nové mikrozkušavce. Směs byla centrifugována při maximální rychlosti po dobu 1 minuty. Takto byl odstraněn buněčný odpad, který nebyl odstraněn v předcházejícím kroku. Filtrační kolonka byla odstraněna a vyhozena.

Poté následovala příprava pro navázání DNA. Bylo přidáno 700 µl Binding Solution a směs byla důkladným převrácením mikrozkušavky promíchána. Do vazebné kolonky (GenElute Miniprep Binding) bylo přidáno 500 µl Column Preparation Solution a mikrozkušavka byla centrifugována při 12000 ot./ min. po dobu 30 – 60 sekund. Roztok byl následně slit a na kolonku bylo napipetováno 700 µl směsi, která byla připravena

v předchozím kroku a vše bylo centrifugováno při maximální rychlosti (12000 – 16000 ot./ min.) po dobu 1 minuty. Tekutina, která prošla kolonkou, byla slita. Na kolonku byl aplikován zbývající lysát, následovala centrifugace a poté vyhozena sběrná eppendorfka i s proteklým roztokem. Následovalo první promývání kolonky. Kolonka byla umístěna do nové sběrné 2 ml mikrozkušavky a bylo aplikováno na membránu kolonky 500  $\mu$ l naředěného Wash Solution Concentrate, vše bylo centrifugováno při maximální rychlosti po dobu 1 minuty. Filtrát byl vylit a sběrná mikrozkušavka ponechána. Při druhém promývání bylo na kolonku aplikováno 500  $\mu$ l naředěného Wash Solution Concentrate a vše bylo centrifugováno při maximální rychlosti po dobu 3 minut. Mikrozkušavka musí být z centrifugy vyndávána opatrně, aby bylo zabráněno dalšímu kontaktu prošlé tekutiny s kolonkou.

Následovalo vymývání DNA z kolonky. Kolonka byl přenesen do nové 2 ml mikrozkušavky a na membránu bylo aplikováno 100  $\mu$ l přehřátého (65 °C) Elution Solution. Poté bylo vše centrifugováno při maximální rychlosti po dobu 1 minuty. Proces vymývání byl ještě jednou zopakován. Supernatant obsahující DNA byl odebrán do sterilní zkumavky a uchován zamrazením pro následné použití.

Poté byla provedena vizualizace DNA pomocí elektroforézy. Byl použit 1% agarózový gel, kdy se agaróza promíchá v TAE pufru (složení) a v mikrovlnné troubě se směs zahřívá do úplného rozpuštění agarózy. Agarózový gel byl následně nalit do připravené vaničky s hřebínkem (po 20 jamkách). Po ztuhnutí gelu byl vyjmut hřebínek a gel byl přenesen do elektroforetické vany s TAE puftrem. Do jamek v gelu bylo pipetováno 9  $\mu$ l vzorku DNA (3  $\mu$ l vzorku DNA smíchaného s 3  $\mu$ l barviva SYBRgreen a 3  $\mu$ l barviva Loading Dye a 6  $\mu$ l DNA markeru (100 bp). Elektroforéza byla spuštěna při napětí 80 V po dobu 25 minut. Poté byl gel umístěn pod UV transiluminátor a vyhodnocen obraz na osobním počítači.

Přítomnost mutace v mitochondriálním genu pro Cyt b, která způsobuje rezistenci k fungicidům, byla ověřena metodou přímého sekvenování. V prvním kroku se připravil PCR produkt, který zahrnoval tuto oblast, pomocí primerů (EastPort Life Science): Forward primer VentCytb-F01: ACCTTGACCTGCCGATGTAGG; reverse primer VentCytb-R01: AAGCCTCCCACAGAAATTCG. PCR profil byl následující. Po úvodní denaturaci 95°C/5 min následovalo 40 cyklů: 95°C/30s, 58°C/30s, 72°C/30s; s finální extenzí 72°C/5 min a zchlazením na 8°C. PCR produkt o velikosti 465 bp byl separován na 1% agarózovém gelu, následně byl pod UV světlem vyříznut a izolován dle návodu pomocí

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Následovala příprava sekvenační reakce dle návodu s použitím BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) a její purifikace s pomocí BigDye Terminator Purification Kit. Vlastní sekvenanční analýza probíhala na přístroji Genetic Analyzer ABI3130. Výsledné sekvence byly porovnány s databází sekvencí pomocí BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### 4.3.7 Zpracování výsledků

Pro vyhodnocení získaných hodnot z *in vitro* testů klíčivosti spor byl zvolen statistický test jednofaktorová ANOVA. Ten umožnil mezi sebou porovnat všechny jednotlivé výběrové soubory – vzorky populací *V. inaequalis*, zda mezi nimi existuje či neexistuje statisticky významný rozdíl. U F-testu byla stanovena nulová hypotéza ( $H_0$ ):  $\mu_1 = \mu_2$ . Hladina významnosti ( $\alpha$ ) byla zvolena 0,05 a porovnávána s výstupním parametrem p-hodnotou. V případě, že:

- p-hodnota > 0,05, pak byla  $H_0$  přijata
- p-hodnota < 0,05, pak byla  $H_0$  zamítnuta

V případě zamítnutí  $H_0$  u F-testu je zapotřebí přejít k podrobnějšímu vyhodnocení ANOVY tzv. S–metodou (Scheffého metoda). Byla stanovena nulová hypotéza ( $H_0$ ): Neexistují statisticky významné rozdíly mezi vzorky populací *V. inaequalis*. Hladina významnosti ( $\alpha$ ) byla zvolena 0,05 a porovnávána s výstupním parametrem p-hodnotou. V případě, že:

- p-hodnota > 0,05, pak byla  $H_0$  přijata, nejsou statisticky významné rozdíly mezi vzorky populací *V. inaequalis*
- p-hodnota < 0,05, pak byla  $H_0$  zamítnuta, jsou statisticky významné rozdíly mezi vzorky populací *V. inaequalis*

Výsledné hodnoty u *in vitro* metody hodnocení rezistence na základě růstu mycelia na agaru s přidavkem fungicidu byly zpracovány ve statistickém modelu – jednovýběrovém t-testu, který ověřil, zda výsledný nárůst mycelia na plné koncentraci fungicidu Discus (0,2 g/ l) byl roven 100 %. Podle tohoto kritéria byla stanovena nulová hypotéza ( $H_0$ ):  $\mu = \mu_0$ , neboli  $\mu = 100$  %. Zvolená hodnota hladiny významnosti ( $\alpha$ ) byla 0,05. Ta pak byla srovnávána s výstupním parametrem p- hodnotou. V případě, že:

- p-hodnota  $> 0,05$ , pak byla  $H_0$  přijata
- p-hodnota  $< 0,05$ , pak byla  $H_0$  zamítnuta

## 5 Výsledky

V předkládané práci jsou prezentovány výsledky získané v rámci monitoringu citlivosti populací houby *V. inaequalis* z vybraných 20 lokalit v České republice ke strobilurinovému fungicidu s obchodním názvem Discus (účinná látka kresoxim-methyl). Prezentované výsledky byly získány na základě testů, při nichž byly použity *in vitro*, *in vivo* a molekulární metody detekce rezistence *V. inaequalis* ke strobilurinovým fungicidům.

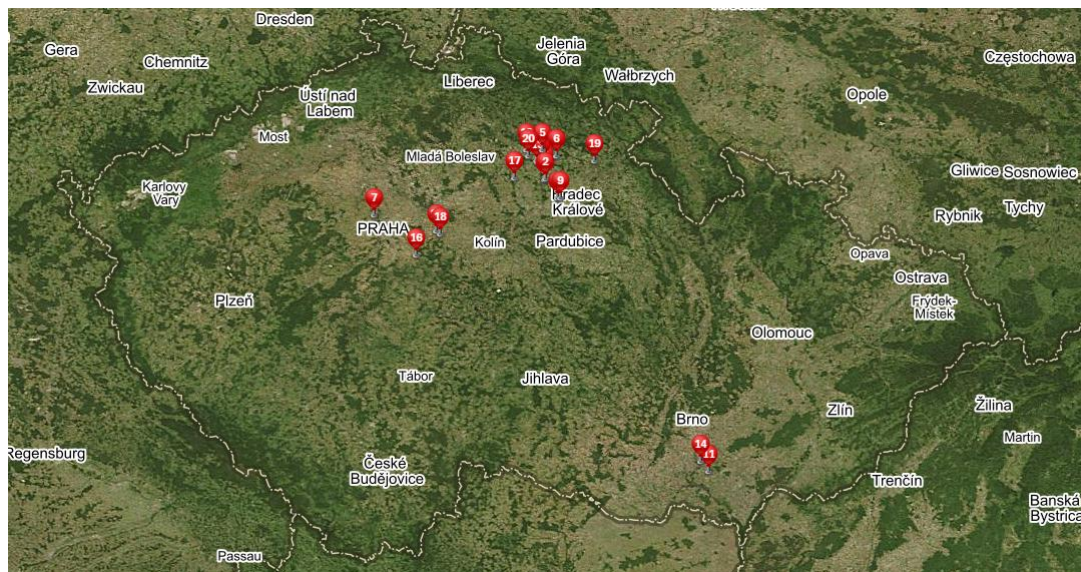
### 5.1.1 Sběr infikovaného rostlinného materiálu

Vzorky listů napadených *V. inaequalis* byly odebírány z různých lokalit na území České republiky. Odběr vzorků probíhal v září roku 2013, na přelomu května, června a v červenci 2014 a v září roku 2014. V následující tabulce je shrnuto 20 lokalit, ze kterých byly vzorky odebírány.

Tabulka č. 5: Lokality odběru vzorků populací *V. inaequalis*

ČÍSLO VZORKU	LOKALITA
V1	Sady Petrovičky
V2	Sady Rokos, Petrovičky
V3	Sady ZD Bašnice
V4	Pokusná výsadba VŠÚO Holovousy
V5	Lázně Bělohrad
V6	Miletín
V7	Výsadba ČZU
V8	Ovoce Mejšťíkovo, Radíkovice
V9	Ovocné sady Lán Jiří, Těchlovice
V10	Lužanská zemědělská a.s.
V11	Sady.cz, Hustopeče
V12	Ing. Miloslav Valenta, Ostroměř
V13	EB Fruit , Ostroměř
V14	Sady.cz, Velké Němčice
V15	Sady Tismice
V16	Nedbal Jiří - Ovocnářství, Stránčice
V17	Sady AGRO Žlunice
V18	Sady Tucharaz
V19	Sady ZD Dolany
V20	Konecchlumí

Obrázek č. 1: Orientační mapa lokalit

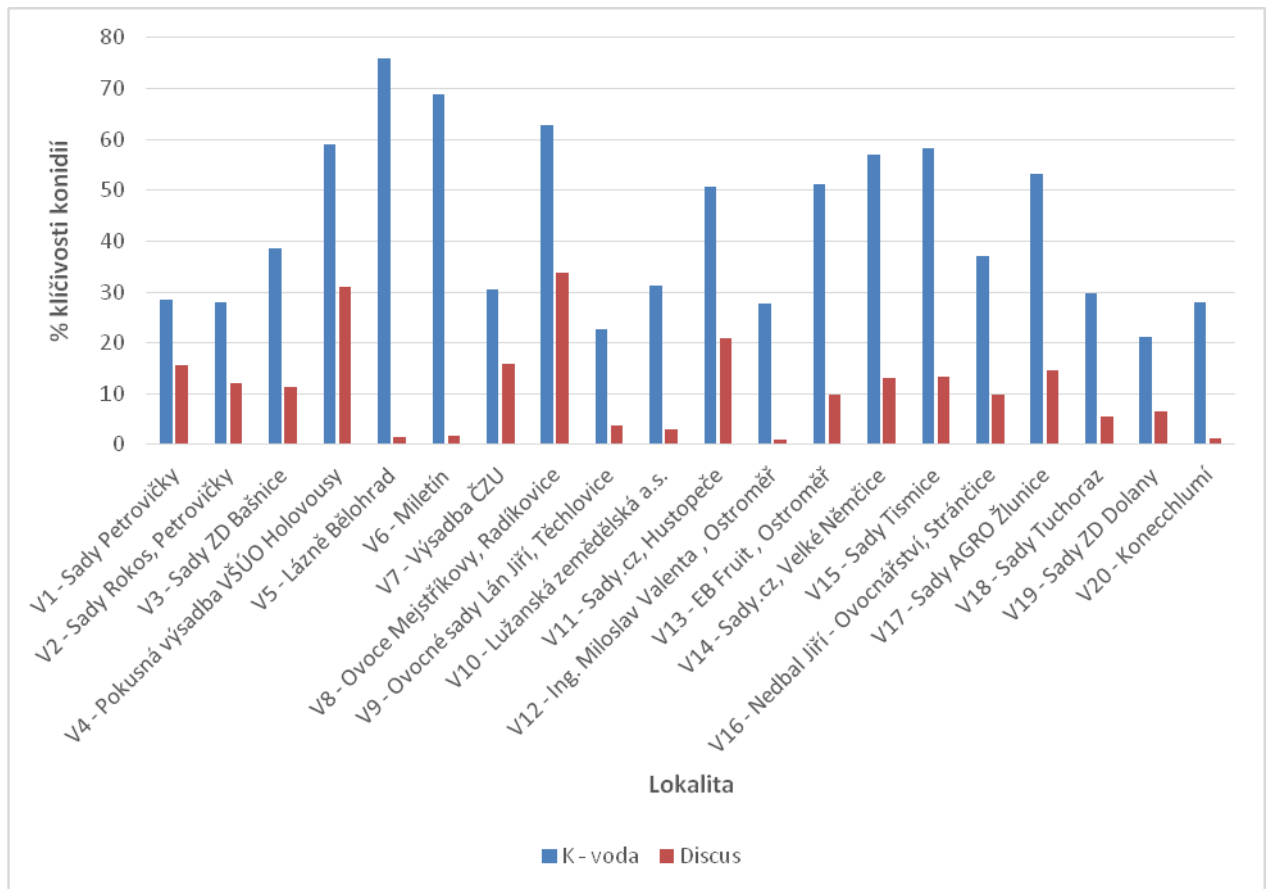


### 5.1.2 *In vitro* testy klíčivosti spor

Pomocí metody *in vitro* testu klíčivosti spor v kapkách fungicidu Discus bylo zhodnoceno 20 populací *V. inaequalis*.

U čtyř vzorků populace *V. inaequalis* lze pokládat populaci houby za rezistentní, jelikož klíčivost konidií ve fungicidu přesahovala 50 % oproti kontrolní variantě (čistá voda). Jedna z nejvyšších klíčivostí byla dosažena v případě populace z pokusné výsadby VŠÚO Holovousy (V4), kdy klíčivost konidií byla podobně vysoká jako klíčivost v kapkách vody. Podobně vysoká klíčivost byla zaznamenána v některých produkčních výsadbách (V1, V7, V8). U osmi vzorků (V2, V3, V11, V14, V15, V16, V17, V19) populací *V. inaequalis* se projevila značně snížená citlivost populací *V. inaequalis*, neboť klíčivost konidií ve fungicidu se pohybovala v rozmezí 20 – 49 % ve srovnání s kontrolní variantou. Zbývající počet vzorků populací *V. inaequalis* (V9, V10, V12, V13, V18, V20) lze označit jako populace houby se sníženou citlivostí ke strobilurinovému fungicidu, poněvadž rozmezí hodnot klíčivosti konidií bylo 1 – 20 % oproti kontrole. Nejnížší hodnoty klíčivosti konidií v přítomnosti fungicidu Discus byly zaznamenány v případech „divokých“ populací, které byly odebírány v přírodě (V5, V6), ale rovněž i u části populací z produkčních výsadeb. V grafu 1 je doložena snížená citlivost testovaných populací k fungicidu Discus ve vybraných lokalitách.

Graf č. 1: Procento vyklíčených konidií houby *V. inaequalis* v kapkách fungicidu Discus



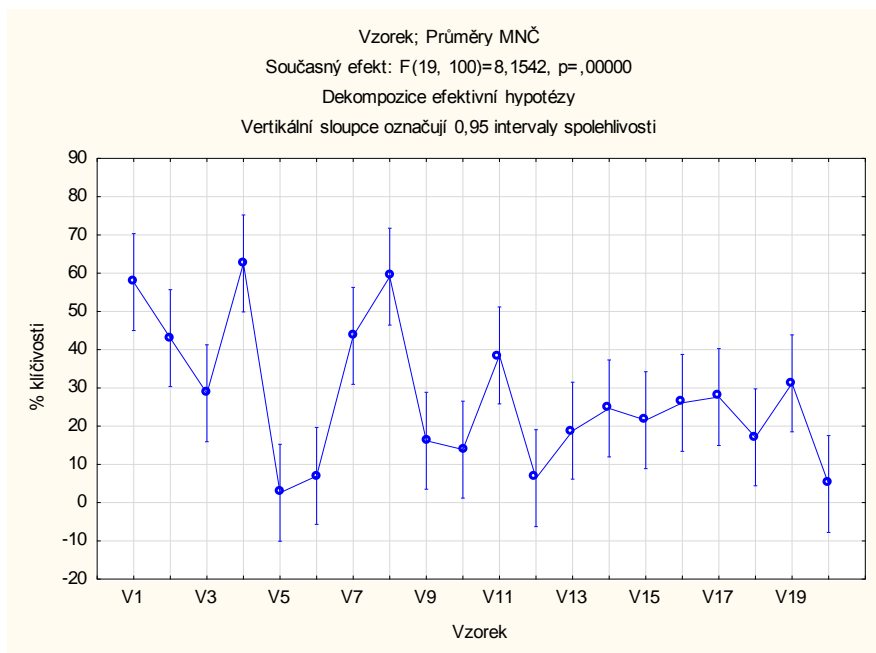
Tabulka 6: Relativní % klíčivosti spor vzhledem ke kontrole

<b>Lokalita</b>	<b>Relativní % klíčivosti</b>
V1 - Sady Petrovičky	55,4
V2 - Sady Rokos, Petrovičky	43,16
V3 - Sady ZD Bašnice	29,05
V4 - Pokusná výsadba VŠÚO Holovousy	52,75
V5 - Lázně Bělohrad	1,98
V6 – Miletín	2,55
V7 - Výsadba ČZU	51,86
V8 - Ovoce Mejstříkovo, Radíkovice	53,85
V9 - Ovocné sady Lán Jiří, Těchlovice	16,41
V10 - Lužanská zemědělská a.s.	9,23
V11 - Sady.cz, Hustopeče	41,3
V12 - Ing. Miloslav Valenta , Ostroměř	3,54
V13 - EB Fruit , Ostroměř	19,19
V14 - Sady.cz, Velké Němčice	22,99
V15 - Sady Tismice	22,86
V16 - Nedbal Jiří - Ovocnářství, Stránčice	26,45
V17 - Sady AGRO Žlunice	27,2
V18 - Sady Tuchoraz	17,98
V19 - Sady ZD Dolany	31,8
V20 – Konecchlumí	4,75



Pro vyhodnocení získaných hodnot z *in vitro* testů klíčivosti spor byl zvolen statistický test jednofaktorová ANOVA. Ten umožnil mezi sebou porovnat všechny jednotlivé výběrové soubory – vzorky populací *V. inaequalis*, zda mezi nimi existuje či neexistuje statisticky významný rozdíl.

Graf č. 2: Grafický výstup jednofaktorové ANOVY



Jelikož u F-testu byla p-hodnota = 0, tím pádem p-hodnota < 0,05 ( $\alpha$ ), byla  $H_0$  zamítnuta. Bylo provedeno podrobnější vyhodnocení ANOVY tzv. S–metoda (Scheffého metoda), kterou byla prokázána existence statisticky významného rozdílu mezi jednotlivými vzorky populací *V. inaequalis*. Statisticky významné rozdíly byly zjištěny mezi těmito vzorky populací *V. inaequalis*, protože p-hodnota < 0,05 ( $\alpha$ ) a  $H_0$  byla tak zamítnuta.

Tabulka č. 7: Statisticky významné rozdíly mezi vzorky populací *V. inaequalis*

Vzorky populací <i>V. inaequalis</i> , mezi kterými jsou statisticky významné rozdíly	p-hodnota
V1 x V5	0,01729
V1 x V12	0,04890
V1 x V20	0,03280
V4 x V5	0,00379
V4 x V6	0,01506
V4 x V12	0,01264
V4 x V20	0,00792
V5 x V8	0,01139
V6 x V8	0,03961
V8 x V12	0,03386
V8 x V20	0,02225

Statisticky významné rozdíly byly prokázány mezi vzorky tzv. „divokých“ populací (V5, V6) a vzorky populací *V. inaequalis* z produkčních výsadeb (V1, V8, V12). Rovněž byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi populací z experimentální výsadby VŠÚO (V4) a tzv. „divokými“ populacemi (V5, V6) a také některými populacemi z produkčních výsadeb (V12, V20). Statisticky významný rozdíl byl prokázán mezi populací *V. inaequalis* z produkční výsadby (V8) a populacemi rovněž z produkčních výsadeb (V12, V20).

### 5.1.3 Skleníkové *in vivo* testy

Skleníkové *in vivo* testy byly úspěšně provedeny pouze u pěti vzorků populací *V. inaequalis* a to: V1, V2, V3, V4, V6. U zbývajících vzorků populací byly rovněž založeny skleníkové testy, ale pravděpodobně z různých důvodů (špatné klíčivosti konidií, přítomností zbytků postřiků z listů vzorku v suspenzi spor nebo vysokými teplotami při odběru vzorků a ve skleníku) nebylo možné pokusy vyhodnotit. Nejvyšší účinnost přípravku Discus se projevila u vzorku tzv. „divoké“ populace V6, tato populace *V. inaequalis* byla odebrána z neošetřovaného stromu v lokalitě Miletín. Nejnižší účinnost přípravku Discus byla zaznamenána u vzorku populace V2, který byl odebrán v produkční výsadbě Sady Rokos v Petrovičkách. Poměrně dobrou účinnost měl tento přípravek u vzorku populace V4 z pokusné výsadby VŠÚO Holovousy. V následujících tabulkách jsou uvedeny výsledky pokusu.

Tabulka č. 8: Hodnocení skleníkových testů, vzorek V1- Sady Petrovičky

<b>V1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>celkem</b>	<b>napadení</b>	<b>účinnost %</b>
<b>K</b>	3	7	26	15	16	67	<b>42,0</b>	<b>19,6</b>
<b>V1</b>	2	10	22	15	9	58	<b>33,8</b>	

Tabulka č. 9: Hodnocení skleníkových testů, vzorek V2 – Sady Rokos

<b>V2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>celkem</b>	<b>napadení</b>	<b>účinnost %</b>
<b>K</b>	0	12	29	13	10	64	<b>37,3</b>	<b>8,1</b>
<b>V2</b>	8	14	20	9	14	65	<b>34,3</b>	

Tabulka č. 10: Hodnocení skleníkových testů, vzorek V3 – ZD Bašnice

<b>V3</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>celkem</b>	<b>napadení</b>	<b>účinnost %</b>
<b>K</b>	1	7	32	25	10	75	<b>46,5</b>	<b>44,1</b>
<b>V3</b>	35	26	24	6	3	94	<b>26,0</b>	

Tabulka č. 11: Hodnocení skleníkových testů, vzorek V4 – VŠÚO Holovousy

<b>V4</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>celkem</b>	<b>napadení</b>	<b>účinnost %</b>
<b>K</b>	2	21	28	14	4	69	<b>33,8</b>	<b>55,6</b>
<b>V4</b>	53	21	15	3	0	92	<b>15,0</b>	

Tabulka č. 12: Hodnocení skleníkových testů, vzorek V6 – Miletín

<b>V6</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>celkem</b>	<b>napadení</b>	<b>účinnost %</b>
<b>K</b>	69	4	3	8	10	94	<b>18,5</b>	<b>82,4</b>
<b>V6</b>	92	2	4	1	0	99	<b>3,3</b>	

#### **5.1.4 Metoda *in vitro* testů hodnocení rezistence na základě růstu mycelia na agaru s přídatkem fungicidu**

Byly získány tři monosporické izoláty ze vzorků populací *V. inaequalis* V1 (Sady Petrovičky), V2 (Sady Rokos) a V4 (Pokusná výsadba VŠÚO). Z výsledků je patrná značně snížená citlivost monosporických izolátů *V. inaequalis*, která se dá označit za rezistentní reakci u všech testovaných vzorků populací (V1, V2, V4).

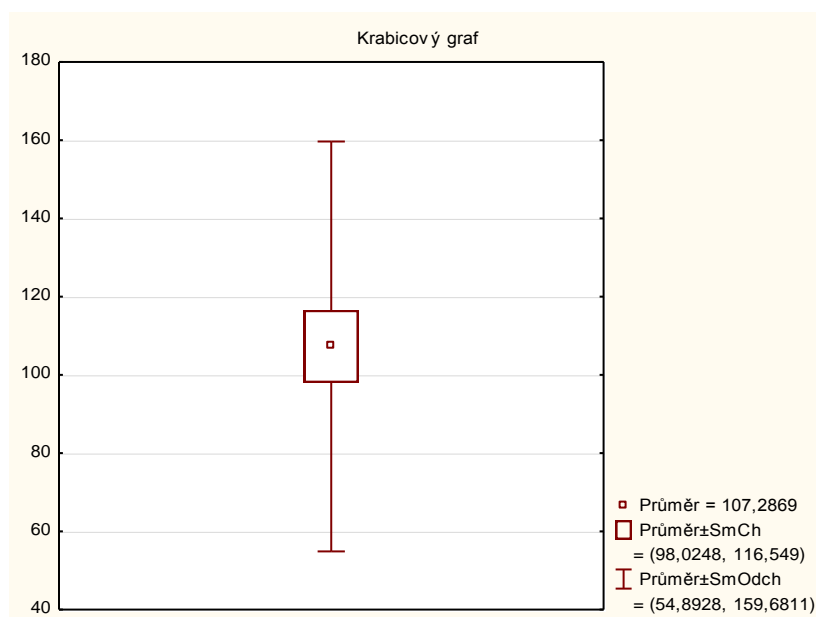
Pro potvrzení výsledku zda dochází k 100 % nárůstu mycelia i na plné koncentraci fungicidního přípravku Discus (0,2 g/ l) byla provedena statistická metoda jednovýběrový t-test. Hodnota hladiny významnosti byla stanovena na 0,05.

Tabulka č. 13: Statistické vyhodnocení jednovýběrového t-testu vzorku V1

Proměnná	Test průměrů vůči referenční konstantě (hodnotě) (Tabulka2)							
	Průměr	Sm.odch.	N	Sm.chyba	Referenční konstanta	t	SV	p
Prom1	107,286	52,3941	32	9,26206	100,000	0,78674	31	0,43740

U vzorku populace V1 ve statistickém modelu – jednovýběrovém t-testu, vyšla p-hodnota  $> 0,05$  ( $\alpha$ ),  $H_0$  byla přijata. Potvrdilo se, že výsledný nárůst mycelia na plné koncentraci fungicidu Discus (0,2 g/l) byl roven 100 %.

Graf č. 3: Krabicový graf vzorku V1

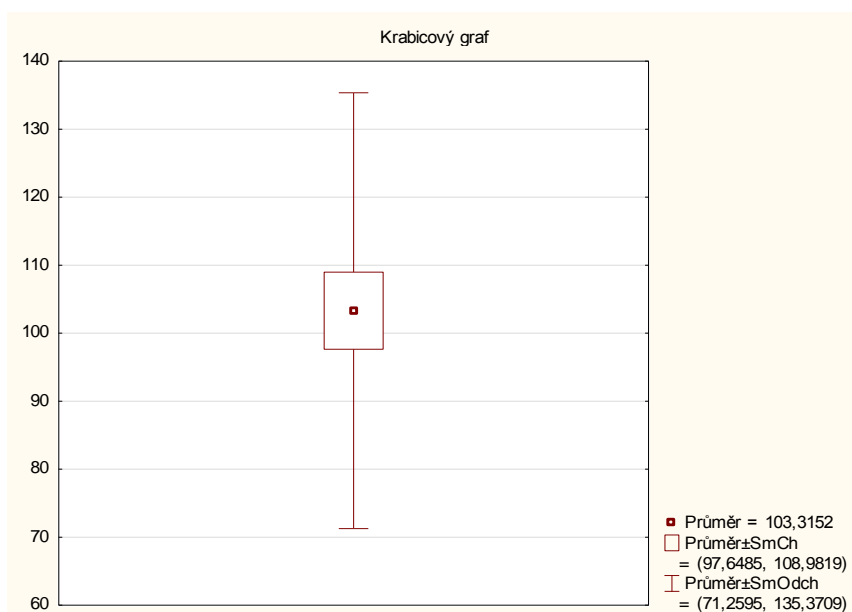


Tabulka č. 14: Statistické vyhodnocení jednovýběrového t-testu vzorku V2

Proměnná	Test průměrů vůči referenční konstantě (hodnotě) (Tabulka9)							
	Průměr	Sm.odch.	N	Sm.chyba	Referenční konstanta	t	SV	p
Prom1	103,315	32,0557	32	5,66670	100,000	0,58503	31	0,56276

U vzorku populace V2 ve statistickém modelu – jednovýběrovém t-testu, vyšla p-hodnota  $> 0,05$  ( $\alpha$ ),  $H_0$  byla přijata. Potvrdilo se, že výsledný nárůst mycelia na plné koncentraci fungicidu Discus (0,2 g/l) byl roven 100 %.

Graf č. 4: Krabicový graf vzorku V2

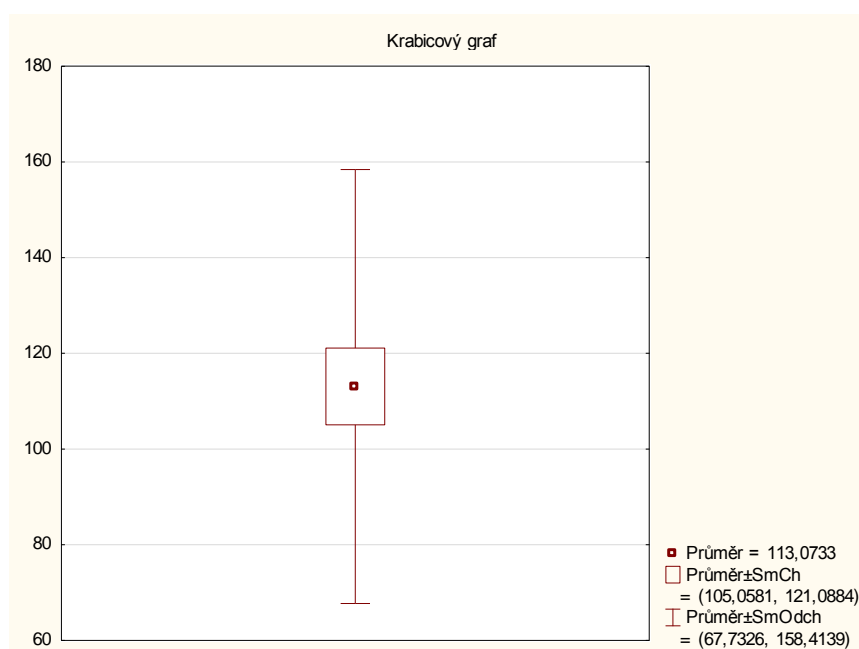


Tabulka č. 15: Statistické vyhodnocení jednovýběrového t-testu vzorku V4

Proměnná	Test průměrů vůči referenční konstantě (hodnotě) (Tabulka21)							
	Průměr	Sm.odch.	N	Sm.chyba	Referenční konstanta	t	SV	p
Prom1	113,073	45,3406	32	8,01517	100,000	1,63106	31	0,11299

U vzorku populace V4 ve statistickém modelu – jednovýběrovém t-testu, vyšla p-hodnota  $> 0,05$  ( $\alpha$ ),  $H_0$  byla přijata. Potvrdilo se, že výsledný nárůst mycelia na plné koncentraci fungicidu Discus (0,2 g/l) byl roven 100 %.

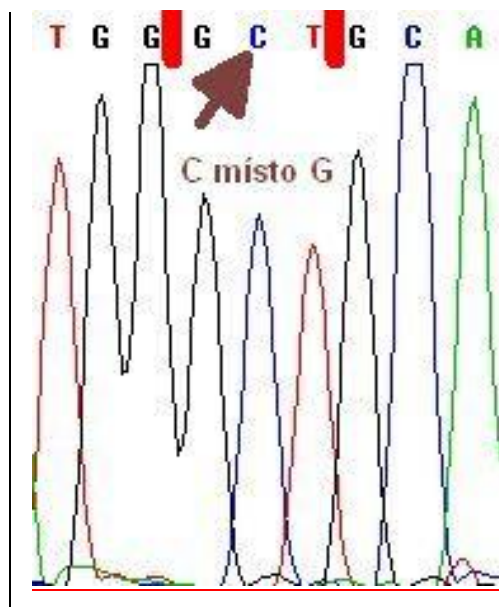
Graf č. 5: Krabicový graf vzorku V4



### 5.1.5 Detekce rezistence pomocí molekulárních metod

Pro potvrzení vzniku rezistence na základě mutace v cytochromu b, bylo nutné provést detekci rezistence pomocí molekulárních metod a to konkrétně metodou přímé sekvenace mitochondriálního genomu *V. inaequalis*. U tohoto patogena se vyskytuje jednobodová mutace v mitochondriálním genomu G > C, kde dochází ke změně z glycinu (kodon GGT) na alanin (GCT) v pozici 143 (Gly143Ala). Lze konstatovat, že izoláty V1, V2 a V4 mají v 100% záměnu cytosinu místo guaninu, která mění glycin143 na alanin a způsobuje tak rezistenci ke strobilurinovým fungicidům (Obrázek č. 2).

Obrázek č. 2: Výstup ze sekvenátoru



Autor: RNDr. Radek Čmejla, PhD.



## 6 Diskuze

Získané výsledky neposkytují ucelený obraz ve výsadbách v České republice z pohledu celkového rozšíření málo citlivých nebo rezistentních populací houby *V. inaequalis*, jelikož vzorky byly odebírány pouze z vybraných 20 lokalit. Celoplošný monitoring populací nebyl v rámci této práce proveden.

U *in vitro* testů klíčivosti spor by měla být primární klíčivost (počet vyklíčených spor v čisté pitné vodě bez fungicidu) hodnoceného vzorku poměrně vysoká, aby bylo možné získat signifikantní výsledky. Tento předpoklad nebyl u všech vzorků splněn. Životaschopnost konidií však může být ovlivněna předchozí aplikací fungicidního ošetření v sadu, dobou vegetace, vývojem počasí (horko, sucho) a podobně.

Olaya a Köller (1999) a Olaya et al. (1998) rovněž hodnotili citlivost populací *V. inaequalis* ke strobilurinovému fungicidu s účinnou látkou kresoxim-methyl v podmínkách *in vitro* na základě klíčení konidií. Získané výsledky porovnávali s výsledky dosaženými v polních podmínkách a skleníkových testech. *In vitro* testy klíčivosti prokázaly, že existují významné rozdíly v citlivosti populací patogena k účinné látce, ale tato snížená citlivost některých populací se neprokázala v *in vivo* testech na jabloňových semenáčcích ošetřených fungicidem prováděných ve skleníku. Což v případě *in vivo* skleníkových testů této diplomové práce nelze potvrdit, jelikož u vzorků populací *V. inaequalis*, kde byla zaznamenána značně snížená citlivost vůči kresoxim-methylu v *in vitro* testech klíčivosti, tak i v *in vivo* skleníkových testech na semenáčcích byla současně zaznamenána snížená účinnost tohoto fungicidu. Pouze u vzorku tzv. „divoké“ populace z neošetřované jabloně byla účinnost přípravku vysoká. Jedna z nejvyšších klíčivostí u *in vitro* testů byla dosažena u vzorku populace z pokusné výsadby VŠÚO Holovousy, kdy klíčivost konidií byla podobně vysoká jako klíčivost v kapkách vody. Tento výsledek byl očekáván, protože v pokusné výsadbě byla rezistence ke strobilurinovým fungicidům vyvolána uměle opakovanými aplikacemi těchto přípravků. Ale u skleníkového testu tohoto vzorku populace dosahovala účinnost přípravku přes 50 %. Tento výsledek koresponduje s poznatky uváděnými autory Olaya a Köller (1999) a Olaya et al. (1998). Je ale nutné poznamenat, že *in vivo* skleníkové testy byly úspěšně vyhodnoceny pouze u pěti vzorků populací *V. inaequalis*. U zbývajících vzorků byly rovněž založeny skleníkové pokusy, ale pravděpodobně z různých důvodů (špatné klíčivosti konidií, přítomností zbytků postřiků z listů vzorku v suspenzi spor nebo vysokými teplotami při odběru vzorků a ve skleníku) nebylo možné tyto pokusy vyhodnotit. U *in vitro* testů hodnocení rezistence na základě růstu mycelia na agaru s přidavkem fungicidu

Discus byla zjištěna rezistence u všech tří vzorků, ze kterých byla úspěšně provedena monosporická izolace, která je nezbytná pro uskutečnění těchto testů. Tři získané monosporické izoláty byly dále použity pro detekci rezistence molekulární metodou. U všech tří vzorků byl metodou přímé sekvenace mitochondriálního genomu *V. inaequalis* potvrzen vznik rezistence na základě jednobodové mutace v cytochromu b, kde dochází ke změně z glycinu na alanin v pozici 143 (G143A).

V počátku zavedení na trh měla tato účinná látka velký potenciál v ochraně rostlin, jevila se jako dostupná, nová sloučenina s širokospektrální účinností, která bude mít mnoho slibných využití v zemědělství. Účinná látka kresoxim-methyl silně inhibovala klíčení spor a houba *V. inaequalis* se projevila jako nejcitlivější testovaný patogen, jelikož klíčivost spor byla kompletně inhibována předinfekčními aplikacemi kresoxim-methylu v dávce 1 mg/ l. Při skleníkových testech byla sporulace *V. inaequalis* snížena o 98% a více, v případě aplikace dávky 67 mg/l kresoxim-methylu 2-4 dny po inokulaci hostitele patogenem. Co se týče účinku na subkutikulární mycelium *V. inaequalis* jeho rychlost růstu byla snížena, ale jeho růst nebyl zcela zastaven, pokud byl kresoxim-methyl aplikován na hostitelské rostliny po infekci. Pokud byl kresoxim-methyl aplikován v období nejsilnějšího výskytu infekce jeho inhibiční účinek na tvorbu mycelia a následnou sporulaci byl považován za dostačující, aby patogen *V. inaequalis* byl přiměřeně kontrolován (Ypema et Gold, 1999). V současné době je známo, že nejvhodnější je preventivní použití strobilurinových fungicidů v raných fázích vývoje choroby a směřování jejich aplikace mimo období nejsilnějšího infekčního tlaku, jelikož kurativní použití fungicidu zvyšuje riziko vzniku a vývoje rezistence (Vincelli, 2002). Již v době zavedení strobilurinových fungicidů byla známa možnost vzniku rezistence zapříčiněná alternativním dýcháním, ale co se týkalo jednobodových mutací v cytochromu b *V. inaequalis*, nebylo zcela známo, do jaké míry se mutace vyskytují v populacích patogena a do jaké míry mohou vést ke vzniku životaschopné, konkurenceschopné a rezistentní populace patogena ke strobilurinovým fungicidům (Ypema et Gold, 1999). Na mechanismu vzniku rezistence se mohou podílet různé příčiny jak spontánní genové mutace, tak alternativní dýchání. Zheng et al. (2000) uvádí i jev, kdy se v populaci patogena vyskytují jedinci, kteří jsou přirozeně rezistentní, aniž by byli vystaveni působení fungicidu. Tento jev lze pozorovat i u části populace cílových fytopatogenních hub strobilurinových fungicidů. Tyto fungicidy byly syntetizovány na bázi přírodních antifungicidních produktů a patogeni k těmto látkám mohou mít geneticky založenou necitlivost.

V letech 1998 – 2000 kdy byla ve VŠÚO Holovousy ověřována účinnost vybraných fungicidů na *V. inaequalis* a byla hodnocena citlivost patogena pomocí *in vitro* testů růstu mycelia na agaru s přidavkem fungicidu Discus. Všechny testované izoláty patogena vykazovaly vysokou citlivost k tehdy novému přípravku (Kloutvorová et al., 2001). Ve VŠÚO Holovousy byly provedeny pokusy v letech 1998 – 2004, které měly za cíl vyvolat rezistenci *V. inaequalis* ke strobilurinovým fungicidům vůči účinným látkám kresoxim-methylu (Discus) a trifloxystrobinu (Zato 50 WG). Fungicidy byly aplikovány 6-9 x za rok na stejné parcele. Kresoxim-methyl dobře účinkoval po dobu 5 let. V šestém roce (2003) používání došlo k významnému poklesu účinnosti a v sedmém roce (2004) zcela selhala ochrana proti původci strupovitosti jabloně. Stupeň napadení ve variantě ošetřené 8x Discusem byl stejný (v jednom případě dokonce vyšší) než v neošetřené kontrole. Až v roce 2003 byl do pokusu zařazen trifloxystrobin (Zato 50 WG) a už v následujícím roce (2004) významně poklesla účinnost tohoto přípravku, což naznačuje možnost vzniku křížové rezistence. V době, kdy byly strobilurinové přípravky uváděny na trh byly doporučovány maximálně 4 aplikace za vegetaci a v pozdějších letech maximálně 3 aplikace pro oddálení nástupu rezistence houby. V případě potvrzení rezistence je nutné vyřadit strobilurinové přípravky ze systému ochrany po dobu několika let (Lánský et al., 2005). Ve VŠÚO Holovousy byla v letech 2006 - 2008 hodnocena v laboratorních *in vitro* testech klíčivosti spor citlivost populací *V. inaequalis* z různých lokalit k vybraným fungicidům. První poklesy citlivosti patogena ke strobilurinovým fungicidům, konkrétně k účinným látkám kresoxim-methyl a trifloxystrobin byly zaznamenány v produkčních výsadbách již v letech 2004 a 2005 (nepublikováno). V letech 2006 – 2008 lze zaznamenat díky *in vitro* testům klíčivost spor sníženou citlivost k těmto přípravkům a v některých případech lze populaci patogena pokládat za rezistentní (Kloutvorová et al, 2009).

Ochrana proti původci strupovitosti byla vždy velmi náročná v severní Itálii, v minulosti bylo vyžadováno mnoho ošetření s intervalem mezi aplikacemi 6–7 dní. V 90. letech díky dobré kontrole tohoto onemocnění pomocí nilinopyrimidinů (pyrimethanil a cyprodinil) a strobilurinů (kresoximmethyl) byl prodloužen interval mezi ošetřeními na 10 dní. V roce 2000 a zejména v roce 2001 došlo k selhání ochrany v sadech, kde byly aplikovány tyto přípravky. Od roku 2002 byly odebírány vzorky populací *V. inaequalis* z lokalit s různými režimy ošetřování strobilurinovými fungicidy: a) neošetřované jabloně, které rostou v neobdělávaných oblastech („divoké“ typy); b) neošetřované sady v blízkosti sadů, kde bylo podezření na selhání kontroly pomocí strobilurinů; c) produkční sady s dobrou

kontrolou *V. inaequalis* pomocí strobilurinů; d) produkční sady, kde selhala ochrana pomocí strobilurinů; e) experimentální sad, kde strobiluriny byly intenzivně aplikovány od roku 1994. U těchto vzorků byly provedeny *in vitro* testy růstu mycelia na agaru s přidávkem fungicidu, *in vivo* skleníkové testy na jabloňových semenáčcích a detekce rezistence molekulární metodou PCR-RFLP. Dle získaných výsledků byly testované populace *V. inaequalis* rozděleny do 3 tříd. První třída vykazuje velmi nízkou hodnotu ED<sub>50</sub>, nepřítomnost mutace G143A a zároveň vysokou citlivost v *in vivo* testech. Do této třídy lze zařadit všechny „divoké“ populace patogena. Druhá třída se vyznačuje střední hodnotou ED<sub>50</sub> a vykazují mírný pokles citlivosti v *in vitro* testech, proměnnou citlivost v *in vivo* testech a G143A mutace je přítomna pouze v některých případech. Do této skupiny náleží různorodé druhy populací patogena. Jedna populace z experimentální výsadby, 2 populace z neošetřovaných sadů v blízkosti sadů, kde bylo podezření na selhání kontroly pomocí strobilurinů a 4 populace ze sadů s dobrou kontrolou pomocí strobilurinů. Do třetí třídy byly zařazeny populace, které mají vysokou ED<sub>50</sub>, mutaci G143A a nízkou citlivost v *in vivo* testech. Tato třída zahrnovala 2 populace z experimentální výsadby, 7 populací z produkčních sadů kde bylo podezření na selhání ochrany pomocí strobilurinů a 2 populace z neošetřovaných sadů v blízkosti sadů, kde bylo podezření na selhání ochrany pomocí strobilurinů. Překvapivě byly zjištěny populace patogena s nízkou citlivostí a s mutací G143A v sadech, které nebyly ošetřovány strobiluriny, ale které se nachází v blízkosti ovocných sadů, kde bylo podezření na selhání ochrany pomocí strobilurinů, což bylo pravděpodobně zapříčiněno šířením spor patogena (Fiaccadori et al., 2005)

Fiaccadori et al. (2011) uvádí, že v případě neošetřované výsadby, která byla v blízkosti sadů, kde selhala ochrana proti *V. inaequalis* pomocí strobilurinů, a která byla zkoumána populace patogena po dobu 4 let, že ve vzorku populace došlo ke snižování citlivosti ke strobilurinům a to zejména ve čtvrtém roce, kdy byla nalezena substituce G143A. U tří vzorků populace z výsadeb, kde byla ochrana strobilurinovými fungicidy stále účinná, byla detekována substituce G143A, ale jejich citlivost k těmto přípravkům v *in vitro* testech nebyla odlišná od ostatních vzorků stejného původu. U vzorků populace z experimentální výsadby, kde byly intenzivně využívány strobilurinové fungicidy k ochraně před původcem strupovitosti, byla substituce G143A prokázána u všech vzorků a rovněž i snížená citlivost k přípravkům v *in vitro* testech. Oproti tomu ve vzorcích „divoké“ populace z neošetřovaných stromů byla prokázána vysoká citlivost ke strobilurinovým fungicidům v *in vitro* testech a nebyla ani u jednoho vzorku prokázána substituce G143A. V případě pokusu této práce byly

k detekci rezistence molekulární metodou vybírány vzorky, u kterých bylo podezření na rezistenci z předchozích *in vitro* a *in vivo* testů.

Köller et al. (2004) testovali citlivost populací *V. inaequalis* ke strobilurinovým fungicidům (kresoxim-methylu a trifloxystrobinu) *in vitro* testy klíčivosti spor a růstu mycelia na agaru s přídavkem fungicidu získaných z produkčních sadů z Michiganu, Pensylvánie, severního Německa a z experimentální výsadby v New Yorku. V produkčních sadech a experimentální výsadbě u populací *V. inaequalis* byly zaznamenány výrazné posuny směrem k poklesu citlivosti ke strobilurinovým fungicidům. Nicméně reakce populací patgena byly kvantitativní povahy, nebyly zjištěny rezistentní kmeny patgena a nebyla detekována mutace G143A. Vysoká hladina kvalitativní rezistence byla dokumentována u populace *V. inaequalis* v sadu v severním Německu, který byl intenzivně ošetřován celkem 25 postřiky po 4 vegetační sezóny.

V roce 2008 bylo zaznamenáno kritické selhání ochrany pomocí strobilurinových fungicidů v jedné z největších ovocnářských oblastí ve Fruit Ridge v USA, v Michiganu. Příčinou tohoto selhání byla rezistence populací *V. inaequalis* k těmto přípravkům. U *in vitro* testů klíčivosti spor bylo potvrzeno 105 izolátů z 210 tohoto patgena jako rezistentní k účinné látce kresoxim-methyl. Což bylo potvrzeno molekulární detekcí mutace G143A u většiny izolátů (Lesniak et al, 2011).

Dosud není ověřeno, jak dlouho se udrží snížená citlivost nebo rezistence ke konkrétní účinné látce v populaci *V. inaequalis* v dané výsadbě. Vliv může mít i tzv. cross rezistence, kdy populace patgena rezistentní k jedné účinné látce má zároveň sníženou citlivost k dalším látkám s podobným mechanismem účinku. Proto pokud již není v sadu aplikován fungicid ohrožený rezistencí, ale nadále jsou používány fungicidy ze stejné nebo příbuzné skupiny mohou ovlivnit udržení rezistentní populace patgena ve výsadbě. Vytvořená rezistence tak může být značně stabilní a přetrvat i řadu roků (Kloutvorová et al., 2009). Tuto domněnku lze jen potvrdit na příkladu pokusné výsadby VŠÚO, kde byla uměle vyvolána rezistence ke strobilurinovým fungicidům. Značně sníženou citlivost populace patgena ke strobilurinovému fungicidu a s mutací G143A lze zaznamenat.

Můžeme tedy konstatovat, že při dlouhodobém používání fungicidů na bázi strobilurinů vznikají ve výsadbách populace *V. inaequalis* se sníženou citlivostí až rezistencí k těmto přípravkům. Pokusy této diplomové práce dokládají výskyt těchto populací i na území České republiky. Pouze testy *in vitro* nejsou dostatečně určující k posouzení rezistence izolátů, je nezbytné je doplnit o *in vivo* skleníkové testy a pomocí molekulárních metod

potvrdit mutaci G143A, která je příčinou rezistence ke strobilurinovým fungicidům. Laboratorní *in vivo* testy citlivosti na rostlinách by měli být upřednostňovány před *in vitro* testy z důvodu rozdílné citlivosti ke strobilurinovým fungicidům, která byla pozorována ve srovnávacích studiích. Zároveň je nutné prověřit i další populace *V. inaequalis* z jiných lokalit České republiky.

## 7 Závěr

V rámci diplomové práce byla v roce 2014 monitorována citlivost populací houby *V. inaequalis* ke strobilurinovému fungicidu s obchodním názvem Discus (účinná látka kresoxim-methyl). Vzorky populací *V. inaequalis* byly získány z vybraných 20 lokalit v České republice. V práci jsou prezentovány výsledky testů, při nichž byly použity *in vitro*, *in vivo* a molekulární metody detekce rezistence *V. inaequalis* ke strobilurinovým fungicidům.

Výsledky *in vitro* testů klíčivosti spor prokázaly u čtyř vzorků populace *V. inaequalis* možný vznik rezistence, jelikož klíčivost konidií ve fungicidu přesahovala 50 % oproti kontrolní variantě (čistá voda). U osmi vzorků se projevila značně snížená citlivost populací *V. inaequalis*, neboť klíčivost konidií ve fungicidu se pohybovala v rozmezí 20 – 49 % ve srovnání s kontrolní variantou. Zbývající počet vzorků (6) lze označit jako populace houby se sníženou citlivostí k fungicidu Discus, poněvadž rozmezí hodnot klíčivosti konidií bylo 1 – 20 % oproti kontrole. Nejnižší hodnoty klíčivosti konidií v přítomnosti fungicidu Discus byly zaznamenány ve dvou případech „divokých“ populací, které byly odebrány z neošetřovaných stromů v přírodě, ale rovněž i u části populací *V. inaequalis* z produkčních výsadb.

U pěti vzorků populace *V. inaequalis* V1, V2, V3, V4, V6 byly provedeny *in vivo* skleníkové pokusy účinnosti fungicidu Discus. Nejvyšší účinnost přípravku Discus se projevila u vzorku V6, tato „divoká“ populace *V. inaequalis* byla odebrána z neošetřovaného stromu. Nejnižší účinnost přípravku Discus byla zaznamenána u vzorku populace V2, který byl odebrán v produkční výsadbě.

Byly získány tři monosporické izoláty *V. inaequalis* od vzorků V1, V2 a V4, u kterých byla provedena metoda *in vitro* hodnocení rezistence na základě růstu mycelia na agaru s přídavkem fungicidu Discus. Z výsledků je patrná značně snížená citlivost těchto izolátů *V. inaequalis*, která se dá označit za rezistentní reakci.

Pro potvrzení vzniku rezistence na základě jednobodové mutace v cytochromu b byly tři monosporické izoláty *V. inaequalis* ze vzorků populace V1, V2 a V4 testovány molekulární metodou detekce rezistence a to konkrétně metodou přímé sekvenace mitochondriálního genomu. U všech tří monosporických izolátů *V. inaequalis* byla nalezena jednobodová mutace, u které dochází ke změně z glycinu na alanin v pozici 143 (G143A) a způsobuje tak rezistenci ke strobilurinovým fungicidům.

## 8 Seznam literatury

Abbott, W. S. 1925: A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*. 18. 256-267.

Ackermann, P. 2002. Metodická příručka pro ochranu rostlin, Díl 1. Choroby rostlin – zelenina, ovocné plodiny, réva. Státní rostlinolékařská správa, odbor přípravků na ochranu rostlin. Brno. s. 276. ISBN 8070844167.

Agrios, G. N. 2005. *Plant pathology*. 4th ed. Elsevier Academic Press. London. p. 922. ISBN 0120445654.

Anonym 1. BioLib. Zařazení v systému *Malus domestica* Borkh. [online]. 2014. [cit. 2015-03-27]. Dostupné z <<http://www.biolib.cz/cz/taxonposition/id39552/>>.

Anonym 2. Registr přípravků na ochranu rostlin [online]. Ministerstvo zemědělství. 2015. [cit. 2015-03-28]. Dostupné z <<http://eagri.cz/public/app/eagriapp/POR/Vyhledavani.aspx>>

Anonym 3. 2014. Seznam odrůd zapsaných ve Státní odrůdové knize ke dni 15. června 2014. *Věstník Ústředního Kontrolního a Zkušebního Ústavu Zemědělského*. 13 (3). 62-63.

Anonym 4. EPPO Plant Protection Thesaurus EPPT [online]. 2015. [cit. 2015-03-27]. Dostupné z <<http://eppt.eppo.org/view.php?bcode=VENTIN>>.

Anonym 5. Index Fungorum [online]. Index Fungorum Partnership. 2015. [cit. 2015-03-27]. Dostupné z <<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>>.

Anonym 6. Minutes of the 2011 QoI Meeting, Recommendations for 2012 [online]. Fungicide action committee – QoI Working Group. 2012. [cit. 2015-03-28]. Dostupné z <<http://www.frac.info/docs/default-source/qoi-wg/qoi-meeting-minutes/minutes-of-the-2011-qoi-meeting-recommendations-for-2012.pdf?sfvrsn=2>>.

Anonym 7. Minutes of the 2012 QoI Meeting, Recommendations for 2013 [online]. Fungicide action committee – QoI Working Group. 2013. [cit. 2015-03-28]. Dostupné z



<<http://www.frac.info/docs/default-source/qoi-wg/qoi-meeting-minutes/minutes-of-the-2012-qoi-meeting-recommendations-for-2013.pdf?sfvrsn=2>>.

Anonym 8. Minutes of the 2014 QoI Meeting, Recommendations for 2015 [online]. Fungicide action committee – QoI Working Group. 2014. [cit. 2015-03-28]. Dostupné z <<http://www.frac.info/docs/default-source/qoi-wg/qoi-meeting-minutes/minutes-of-the-2014-qoi-meeting-recommendations-for-2015.pdf?sfvrsn=2>>.

Anonym 9. QoI Guidelines: Pome fruit [online]. Fungicide action committee – QoI Working Group. 2014. [cit. 2015-03-28]. Dostupné z <<http://www.frac.info/working-group/qol-fungicides/general-use-recommendations/vine-and-pome-fruits>>.

Anonym 10. QoI fungicides – Introduction and General Information [online]. Fungicide action committee. 2014. [cit. 2015-03-28]. Dostupné z <<http://www.frac.info/working-group/qol-fungicides>>.

Anonym 11. QoI Fungicides 2010 Minutes of annual meeting [online]. Fungicide action committee – QoI Working Group. 2011. [cit. 2015-03-28]. Dostupné z <<http://www.frac.info/docs/default-source/working-groups/qol-fungicides/archiv/qoi-fungicides-2010-minutes-of-annual-meeting.pdf?sfvrsn=8>>.

Anonym 12. Resistance overview [online]. Fungicide action committee. 2014. [cit. 2015-03-28]. Dostupné z <<http://www.frac.info/resistance-overview>>.

Anonym 13. Současnost českého ovocnářství [online]. Ovocnářská unie České republiky. 2015. [cit. 2015-03-28]. Dostupné z <<http://www.ovocnarska-unie.cz/?page=2>>.

Anonym 14. Historie českého ovocnářství [online]. Ovocnářská unie České republiky. 2015. [cit. 2015-03-28]. Dostupné z <<http://www.ovocnarska-unie.cz/?page=3>>.

Anonym 15. Index Fungorum [online]. Index Fungorum Partnership. 2015. [cit. 2015-03-27]. Dostupné z <<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>>.

Anonym 16. Registr přípravků na ochranu rostlin [online]. Ministerstvo zemědělství. 2015. [cit. 2015-03-28]. Dostupné z <<http://eagri.cz/public/app/eagriapp/POR/Detail.aspx?id=23693&stamp=1428334362981>>

Bednář, J. 2003. Genetická determinace a rezistence vůči strupovitosti *Venturia inaequalis* Cke. In Salaš, P. (ed.). Modernizace výukového procesu u předmětů ovocné, okrasné školkařství a ovocnářství. Sborník přednášek z odborného semináře. Lednice na Moravě. s. 3-7. ISBN 8071577154.

Bénaouf, G., Parisi, L. 2000. Genetics of host-pathogen relationships between *Venturia inaequalis* races 6 and 7 and *Malus* species. *Phytopathology*. 90 (3). 236-242.

Blažek, J. a kol. 1998. Ovocnictví. 1. vyd. Nakladatelství Květ. Praha. s. 383. ISBN 8085362333.

Blažek, J., Paprštejn F. 1997. Charakteristika genotypů jabloní s nejvyššími stupni odolnosti proti strupovitosti soustředěnými ve VŠÚO Holovousy. *Vědecké práce ovocnářské*. 15. s. 125-141.

Brent, K. J.; Hollomon, D. W. 2007. Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? 2nd ed. Fungicide Resistance Action Committee. Brussels. p. 60. ISBN 9072398076.

Brent, K. J.; Hollomon, D. W. 2007. Fungicide resistance: The assessment of risk. 2nd ed. Fungicide Resistance Action Committee. Brussels. p. 53.

Buchtová, I. 2014. Situační výhledová zpráva – Ovoce. Ministerstvo zemědělství České republiky – Odbor zemědělských komodit. Praha. s. 86.

Carisse, O., Meloche, C., Tureček, W. W. 2011. Spatial heterogeneity, incidence-incidence and incidence-lesion density relationship of apple scab (*Venturia inaequalis*) in managed orchards. *Eur J Plant Pathol*. 130. 349–365.

Dvořák, A., Vondráček, J., Kohout, K. Blažek, J. 1976. Jablka. Academia. Praha. s. 588.

Fiaccadori, R., Cicognani, E., Alberoni, G., Collina, M., Brunelli, A. 2011. Sensitivity to strobilurin fungicides of Italian *Venturia inaequalis* populations with different origin and scab control. *Pest Management Science*. 67. 535–540.

Fiaccadori, R., Cicognani, E., Abbatecola, A., Collina, M., Brunelli, A. 2005. Sensitivity of *Venturia inaequalis* to strobilurine fungicides in Italy. *Universita di Bologna. Diproval. Bologna*. p. 3.

Gisi, U., Chin, K. M., Knapova, G., Küng Färber, R., Mohr, U., Parisi, S., Sierotzki, H., Steinfeld, U. 2000. Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides. *Crop Protection*. 19. 863-872.

Gisi, U., Sierotzki, H., Cook, A., McCaffery, A. 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science*. 58. 859–867.

Grasso, V., Palermo, S., Sierotzki, H., Garibaldi, A., Gisi, U. 2006. Cytochrome *b* gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Management Science*. 62. 465–472.

Hluchý, M. a kol. 2008. Ochrana ovocných dřevin a révy v ekologické a integrované produkci. *Biocont Laboratory. Brno*. s. 498. ISBN 9788090187474.

Jeřábková, H. 2010. Rezistence k fungicidům v populaci padlí tykvovitých v České republice. *Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta. Olomouc*. s. 84.

Juroch, J. 2010. Řízení ochrany proti strupovitosti jabloně (*Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.). *Závěrečná práce. Mendelova univerzita v Brně. Institut celoživotního vzdělávání. Brno*. s 95.

Juroch, J. 2010. Strupovitost jabloně – nejvýznamnější houbová choroba jabloní *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter 1875. *Ministerstvo zemědělství ČR ve spolupráci se Státní rostlinolékařskou správou. Praha*. s. 8.

Kalina, T., Váňa, J. 2005. Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Karolinum. Praha. s. 606. ISBN 8024610361.

Kloutvorová, J. 2014. Rozhovor. Osobní sdělení.

Kloutvorová, J., Lánský, M., Kupková, J. 2001. Hodnocení citlivosti vybraných izolátů *Venturia inaequalis* Cke. Aderh. K některým fungicidům v podmínkách *in vitro*. Vědecké práce ovocnářské. 17. 29-36.

Kloutvorová, J., Lánský, M., Ouředníčková, J. 2011. Integrovaná ochrana jaderovin: Metodika. Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o. Holovousy. s. 92. ISBN 9788087030202.

Kocourek, F. a kol. 2001. Monitorování a regulace škůdců v systému integrované ochrany jaderovin. Ústav zemědělských a potravinářských informací. Praha. s. 51. ISBN 8072710796.

Köller, W., Parker, D. M., Turechek, W. W., Avila-Adame, C. 2004. A two-phase resistance response of *Venturia inaequalis* populations to the QoI fungicides kresoxim-methyl and trifloxystrobin. Plant Disease. 88 (5). 537-544.

Lánský, M., Kupková, J., Nečesaný, V. 1999. Začátek zralosti askospor houby *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. v závislosti na sumě efektivních teplot. Vědecké práce ovocnářské. 16. 9-17.

Lánský, M., Nečesaný, V., Kloutvorová, J., Kupková, J. 2005. Vyvolání rezistence houby *Venturia*

Lánský, M., Nečesaný, V., Kloutvorová, J., Kupková, J. 2001. Uplatnění strobilurinových fungicidů při ochraně jabloní proti strupovitosti působené houbou *Venturia inaequalis* Cke. Aderh. Vědecké práce ovocnářské. 17. 17-27.

*inaequalis* Cke. Aderh. ke strobilurinovým a DMI fungicidům při ochraně jabloní proti strupovitosti. Vědecké práce ovocnářské. 19. 35-43.

- Lesniak, K. E., Proffer, T. J., Beckerman, J. L., Sundin, G. W. 2011. Occurrence of QoI resistance and detection of the G143A mutation in Michigan populations of *Venturia inaequalis*. *Plant Disease*. 95 (8). 927-934.
- MacHardy, W., E. 1996. Apple scab: biology, epidemiology, and management. APS. St. Paul, Minnesota. p. 545. ISBN 0890542066.
- MacHardy, W. E., Gadoury, D., M., Gesler, C. 2001. Parasitic and biological fitness of *Venturia inaequalis*: relationship to disease management strategies. *Plant Disease*. 85 (10). 1036 - 1051.
- McGrath, M. T. 2001. Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew: Experiences and challenges. *Plant Disease*. 85 (3). 236-245.
- Melounová, M., Vejl, P., Sedlák, P., Reznerová, A., Tesařová, M., Blažek, J., Zoufalá, J. 2004. The variability of *Venturia inaequalis* CKE. races in the Czech Republic and the accumulation of resistance genes in apple germplasm. *Plant, Soil and Environment*, 50 (9). 416–423.
- Olaya, G., Köller, W. 1999. Diversity of kresoxim-methyl sensitivities in baseline populations of *Venturia inaequalis*. *Pesticide Science*. 55. 1083-1088.
- Olaya, G., Zheng, D., Köller, W. 1998. Defferential responses of germinating *Venturia inaequalis* conidia to kresoxim-methyl. *Pesticide Science*. 54. 230-236.
- Parisi, L, Lespinasse, Y. 1996. Pathogenicity of *Venturia inaequalis* strains of race 6 on apple clones (*Malus sp.*). *Plant Disease*. 80 (10). 1179-1183.
- Parisi, L., Lespinasse, Y., Guillaumes, J., Krüger J. 1993. A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the Vf gene. *Phytopathology*. 83(5). 533-537.
- Roberts, A. L, Crute, I. R. 1994. Apple scab resistance from *Malus floribunda* 821 (Vf) is rendered ineffective by isolates of *Venturia inaequalis* from *Malus floribunda*. Norwegian

Journal of Agricultural Sciences. 17. 403–6.

Rychlá, K. 2013. Vliv počtu ošetření přípravkem Alginure na napadení jabloní patogenem *Venturia inaequalis*. Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně. Agronomická fakulta. Brno. s. 65.

Sandskär, B. 2003. Apple scab (*Venturia inaequalis*) and pests in organic orchards. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp. p. 39. ISBN 9157664161.

Tenzer, I., Ivanissevich, S., Morgante, M., Gessler, C. 1999. Identification of microsatellite markers and their application to population genetics of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 89 (9). 748-753.

Townsend, G. R., Heuberger, J. W. 1943: Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experimetns. *Plant disease reporter*. 27 (17). 340-343.

Vávra, R., Sedlák, P., Vejl, P., Boček, S., Kloutvorová, J. 2011. Charakterizace *Venturia inaequalis* v produkčních výsadbách jabloní v České Republice. *Úroda, vědecká příloha*. 652 – 661.

Vincelli, P. 2002. QoI (Strobilurin) Fungicides: benefits and risks. *The Plant Health Instructor* [online]. The American Phytophathological Society. 2012. [cit. 2015-03-28]. Dostupné z <<http://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/Pages/StrobilurinFungicides.aspx>>.

Vícha, Z., Juroch, J. 1998. Signalizace primárních infekcí strupovitosti jabloně. *AGRO, ochrana, výživa, odrůdy*. 5. 43-45.

Vlk R., Řezníček V., Salaš, P. 1998. Problematika zachování a ochrany starých či krajových odrůd ovocných dřevin. In Salaš, P. Sborník referátů : Lednice na Moravě 26.-27. srpna 1998. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. Ústav šlechtění a množení zahradnických rostlin. Brno. s. 105. ISBN 8071573434.

Williams, E. B., Kuć, J. 1969. Resistance in *Malus* to *Venturia inaequalis*. Annu. Ref. Phytopathology. p. 223-246.

Wyenandt, Ch. A.; Maxwell, N.; Ward, D. L. 2008. Fungicide programs affect practical resistance development in cucurbit powdery mildew of pumpkin. HortScience. 43 (6). 1838-1845.

Xiangming, X., Harvey, N., Roberts, A., Barbara, D. 2013. Population variation of apple scab (*Venturia inaequalis*) within mixed orchards in the UK. Eur J Plant Pathology. 135. 97–104.

Ypema, H. L., Gold, R. E. 1999. Kresoxim-Methyl: Modification of a Naturally Occuring Compound to Produce a New Fungicide. Plant Disease. 83 (1). 4-19.

Zheng, D., Olaya, G., Köller, W. 2000. Characterization of laboratory mutants of *Venturia inaequalis* resistant to the strobilurin-related fungicide kresoxim-methyl. Current genetics. 38. 148-155.

## 9 Seznam použitých zkratek

BBCH - makrofenologická stupnice růstových fází plodin (jabloň aj.)

ČR – Česká republika

DMIs – inhibitory biosyntézy sterolů (DeMethylation Inhibitors)

DNA – deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic Acid)

EPPO – Evropská a středozevní organizace na ochranu rostlin (European and Mediterranean Plant Protection Organization)

et – a

et al.

FRAC – pracovní výbor pro rezistenci fungicidů (Fungicide Resistance Action Committee)

Mze ČR – Ministerstvo zemědělství České republiky

např. - například

QoIs – inhibitory vnějších chinonů (Quione outside Inhibitors)

pl. – množné číslo (plurál)

PCR – RFLP – polymerázová řetězová reakce - (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism)

RAPD –

resp. – respektive

spp. – označení všech druhů patřících do vyššího taxonu (Species)

SRS – Státní rostlinolékařská správa

SSR marker – (Simple Sequence Repeat marker)

syn. – synonymum

tzv. tak zvaný

ÚEB AV ČR – Ústav experimentální botaniky Akademie Věd České republiky

UPGMA – (Unweighted Pair Group Method Using Averages)

USA – Spojené státy americké

VŠÚO – Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy

VÚRV – Výzkumný ústav rostlinné výroby v Ruzyni



## 10 Seznam v textu uvedených tabulek, grafů a obrázků

### 10.1 Tabulky

Tabulka č. 1: Vědecké názvy *V. inaequalis*

Tabulka č. 2: Taxonomické zařazení houby *V. inaequalis*

Tabulka č. 3: Kategorie citlivosti populací *V. inaequalis*

Tabulka č. 4: 5 bodová stupnice použitá k hodnocení *in vivo* skleníkových testů

Tabulka č. 5: Lokality odběru vzorků populací *V. inaequalis*

Tabulka č. 6: Relativní % klíčivosti spor vzhledem ke kontrole

Tabulka č. 7: Statisticky významné rozdíly mezi vzorky populací *V. inaequalis*

Tabulka č. 8: Hodnocení skleníkových pokusů, vzorek V1- Sady Petrovičky

Tabulka č. 9: Hodnocení skleníkových pokusů, vzorek V2 – Sady Rokos

Tabulka č. 10: Hodnocení skleníkových pokusů, vzorek V3 – ZD Bašnice

Tabulka č. 11: Hodnocení skleníkových pokusů, vzorek V4 – VŠÚO Holovousy

Tabulka č. 12: Hodnocení skleníkových pokusů, vzorek V6 – Miletín

Tabulka č. 13: Statistické vyhodnocení jednovýběrového t-testu vzorku V1

Tabulka č. 14: Statistické vyhodnocení jednovýběrového t-testu vzorku V2

Tabulka č. 15: Statistické vyhodnocení jednovýběrového t-testu vzorku V4

### 10.2 Grafy

Graf č. 1: Procento vyklíčených konidií houby *V. inaequalis* v kapkách fungicidu Discus

Graf č. 2: Grafický výstup jednofaktorové ANOVY

Graf č. 3: Krabicový graf vzorku V1

Graf č. 4: Krabicový graf vzorku V2

Graf č. 5: Krabicový graf vzorku V4

### 10.3 Obrázky

Obrázek č. 1: Orientační mapa lokalit

Obrázek č. 2: Výstup ze sekvenátoru

## 11 Přílohy

### 11.1 Seznam příloh

Obrázek č. 1: Vývojový cyklus *V. inaequalis*

Obrázek č. 2: A – C Fotografie askospor *V. inaequalis*

Obrázek č. 3: A – B Fotografie konidií *V. inaequalis*

Obrázek č. 4: A – B Fotografie listů napadené houbou *V. inaequalis*

Obrázek č. 5: A – B Fotografie plodů napadené houbou *V. inaequalis*

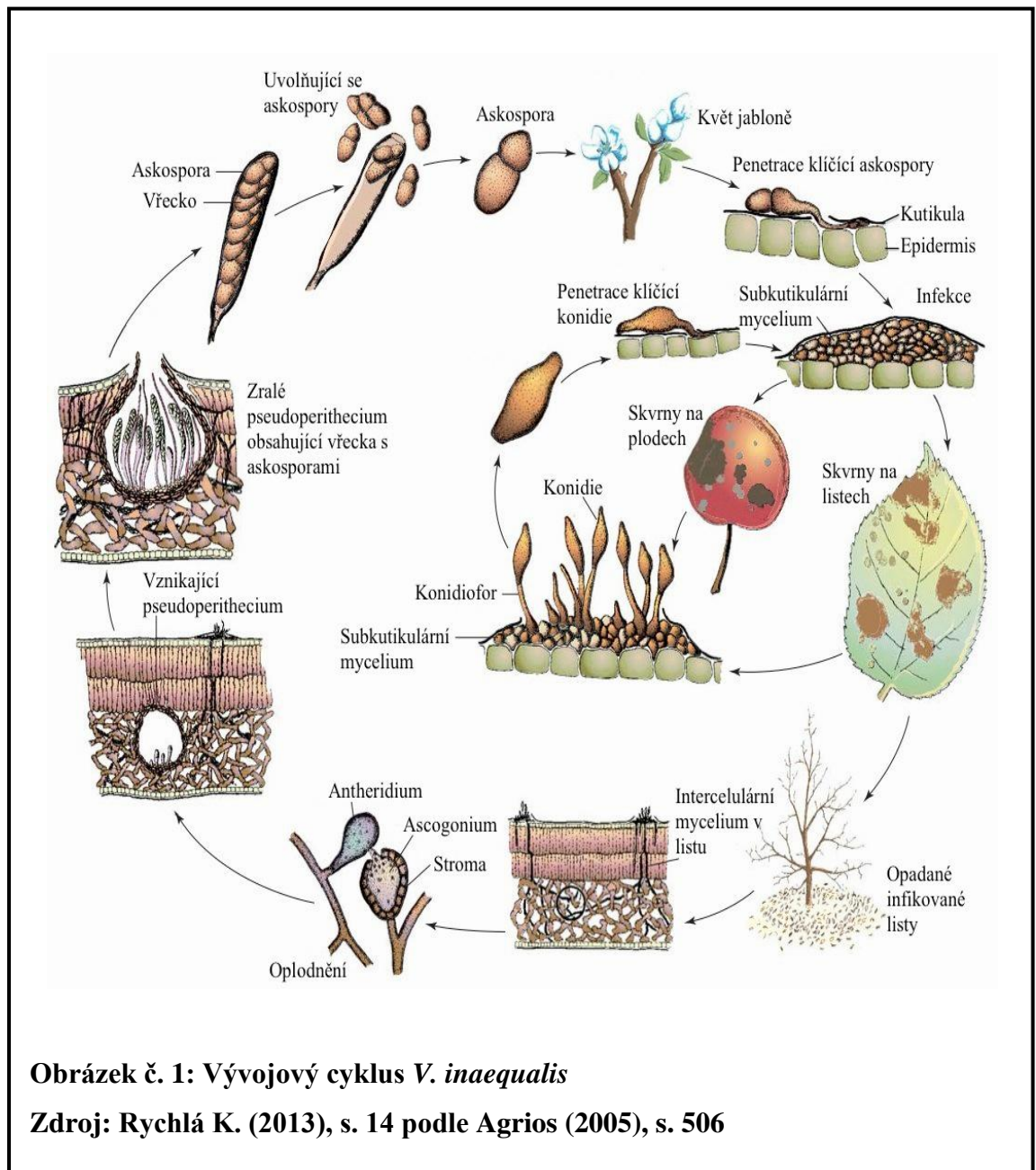
Obrázek č. 6: A – B Fotografie plodů poškozených skládkovou strupovitostí

Obrázek č. 7: A – B Schéma působení účinné látky kresoxim-methyl a její chemická struktura

Obrázek č. 8: Stupně napadení listů

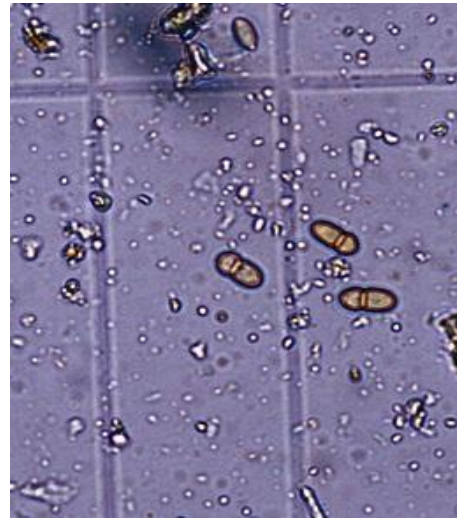
Obrázek č. 9: Příklad monosporického izolátu *V. inaequalis* a agarový test izolátu *V. inaequalis* (V1)

Obrázek č. 10: A-B Agarové testy izolátů *V. inaequalis* (V2 a V4)



**Obrázek č. 1: Vývojový cyklus *V. inaequalis***

**Zdroj: Rychlá K. (2013), s. 14 podle Agrios (2005), s. 506**



A) Klíčící askospora *V. inaequalis* B) Dvoubuněčné askospory



C) Vřecka se zralými askosporami

Obrázek č. 2: A – C Fotografie askospor *V. inaequalis*

Zdroj: VŠÚO Holovousy

Autor: Kloutvorová J.



A) Konidie *V. inaequalis*



B) Klíčící konidie *V. inaequalis*

Obrázek č. 3: A – B Fotografie konidií *V. inaequalis*

Zdroj: VŠÚO Holovousy

Autor: Kloutvorová J.



**A) Listy jabloně napadené houbou *V. inaequalis***



**B) Listy Listy jabloně napadené houbou *V. inaequalis***

**Obrázek č. 4: A – B Fotografie listů napadené houbou *V. inaequalis***

**Zdroj: VŠÚO Holovousy**

**Autor: Kloutvorová J.**



**A) Plod napadený houbou *V. inaequalis***



**B) Silně napadené mladé plody houbou *V. inaequalis***

**Obrázek č. 5: A – B Fotografie plodů napadené houbou *V. inaequalis***

**Zdroj: VŠÚO Holovousy**

**Autor: Kloutvorová J.**



**A) Skládková strupovitost**



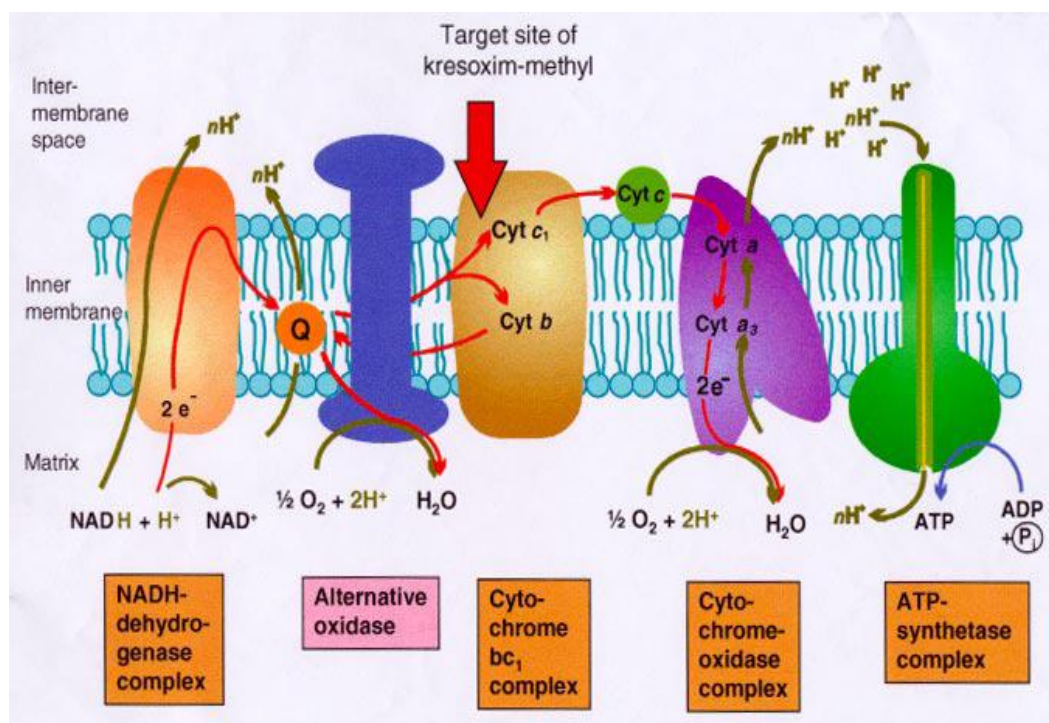
**B) Plně rozvinotá skládková strupovitost**

**Obrázek č. 6: A – B Fotografie plodů poškozených skládkovou strupovitostí**

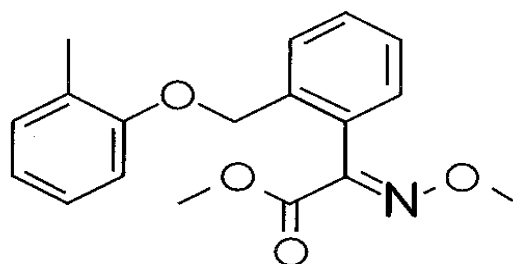
**Zdroj: VŠÚO Holovousy**

**Autor: Kloutvorová J.**





A) Schéma mitochondriálního respiračního řetězce, znázorňující transport elektronů a místo inhibice kresoxim-methylu

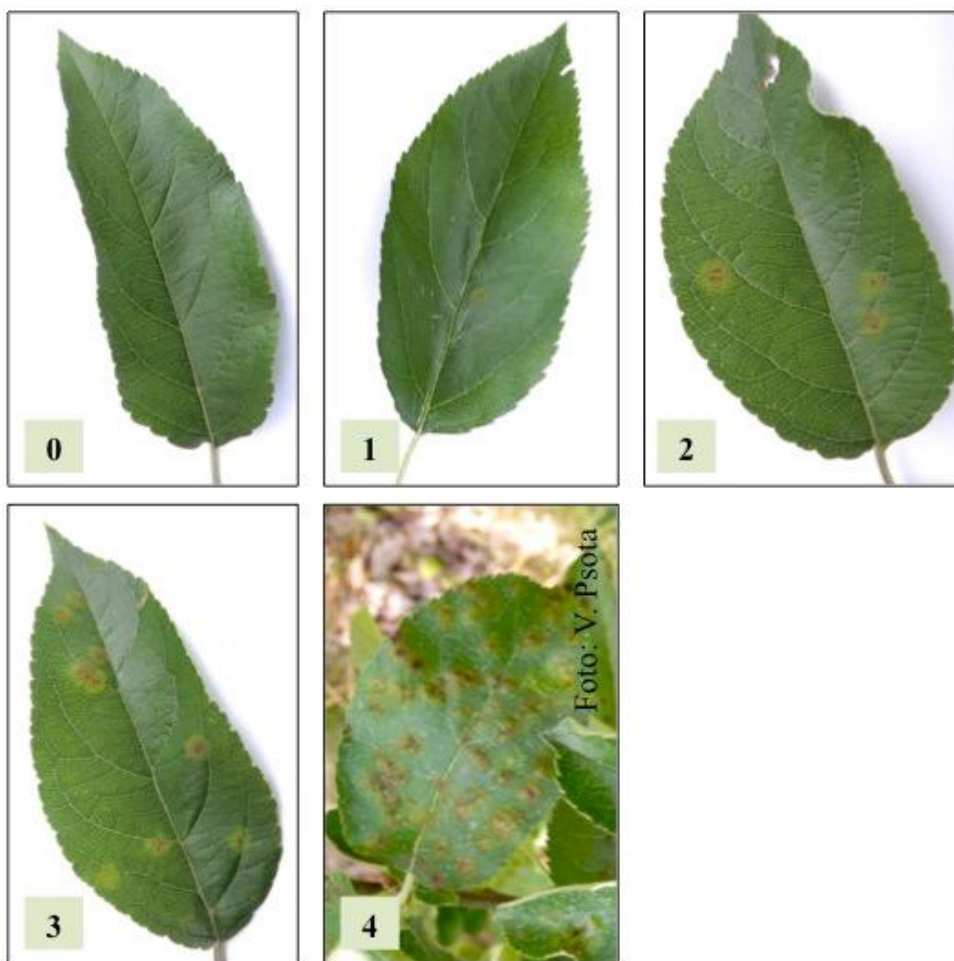


Kresoxim-methyl  
BAS 490 F

B) Chemická struktura účinné látky kresoxim-methyl

Obrázek č. 7: A – B Schéma působení účinné látky kresoxim-methyl a její chemická struktura

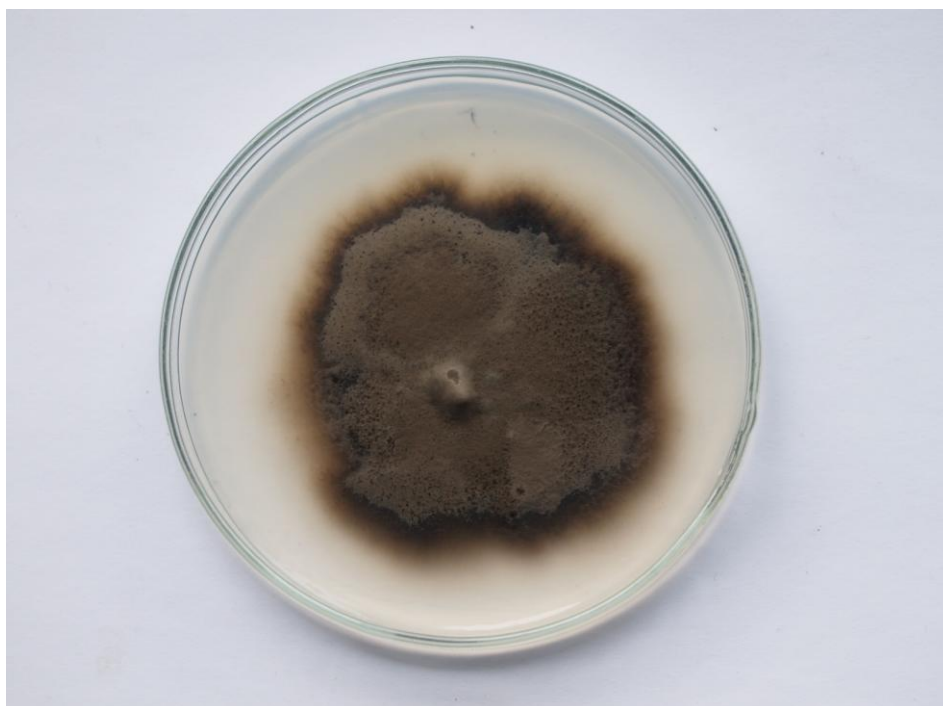
Zdroj: Ypema H. L. et. Gold R. E. (1999), s. 5



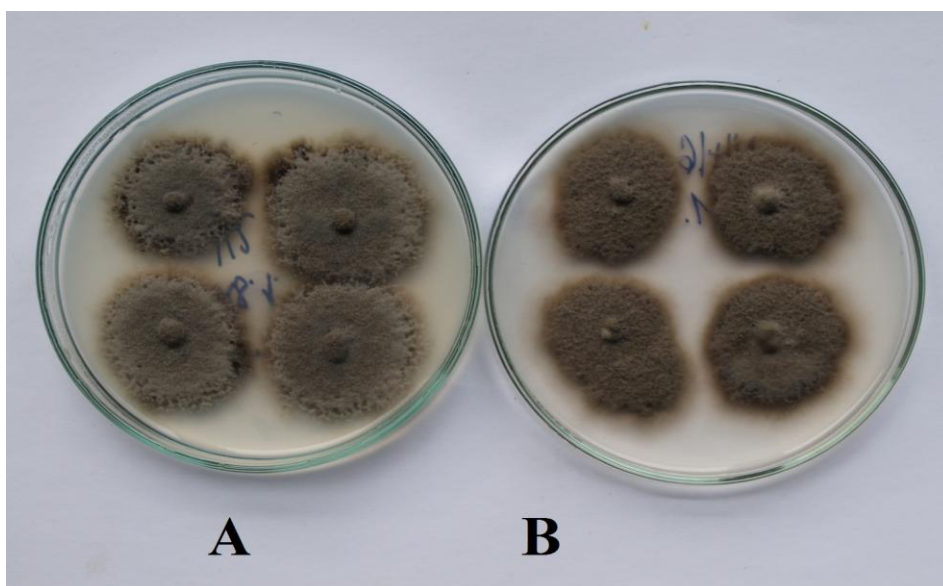
**Obrázek č. 8: Stupně napadení listů. 0) bez napadení; 1) 1 – 2 malé skvrny; 2) 3 – 4 malé skvrny nebo 1 velká skvrna; 3) 5 a více malých nebo 2 velké skvrny; 4) napadeno více jak 4 cm<sup>2</sup> listové plochy.**

**Zdroj: Rychlá K. (2013), s. 31**

**Autor: Psota V.**



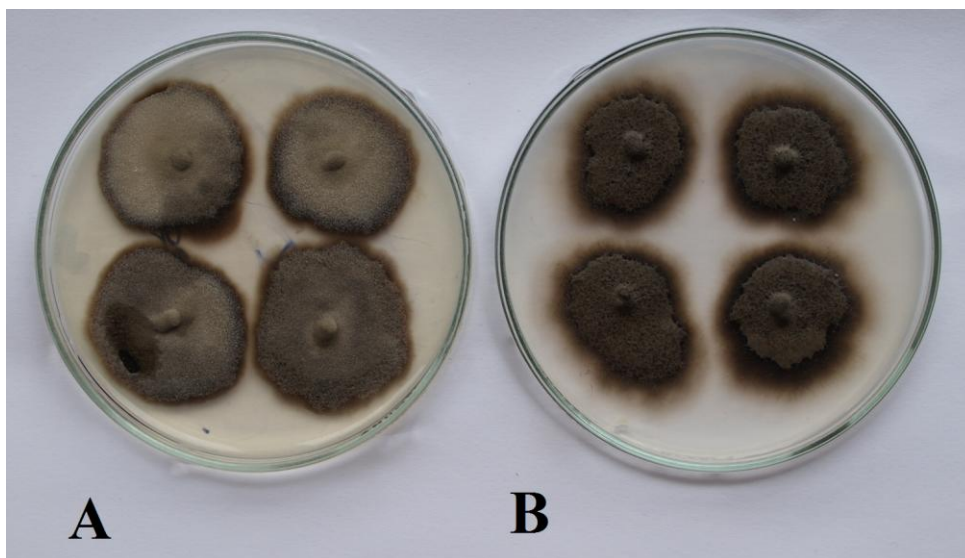
A) Rozočkový monosporický izolát *V. inaequalis*



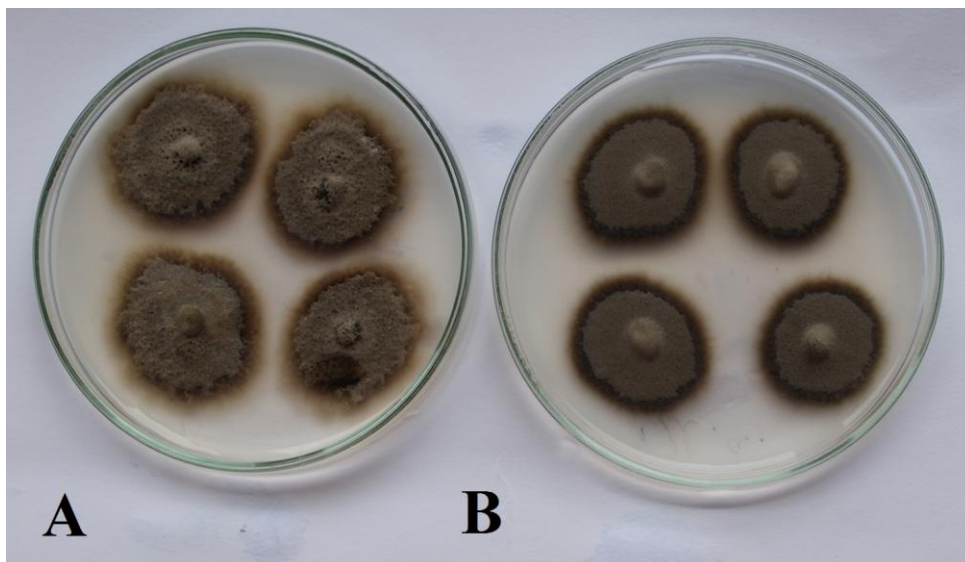
B) Izolát V1 (A – Kontrola, B – Discus 0,2 g/l)

Obrázek č. 9: Příklad monosporického izolátu *V. inaequalis* a agarový test izolátu *V. inaequalis* (V1)

Autor: Jaklová P. (2014)



**A) Izolát V2 (A – Kontrola, B – Discus 0,2 g/l)**



**B) Izolát V4 (A – Kontrola, B – Discus 0,2 g/l)**

**Obrázek č. 10: A-B Agarové testy izolátů *V. inaequalis* (V2 a V4)**

**Autor: Jaklová P. (2014)**