

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra ochrany rostlin**



**Rezistence k fungicidům v populaci *Phytophthora infestans*  
v České republice**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Jakub Englisch**

**Obor studia: Rostlinolékařství - AML**

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

© 2019 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci "Rezistence k fungicidům v populaci *Phytophthora infestans* v České republice" jsem vypracoval 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 autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 3.4.2019

---

### **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucí mé diplomové práce, Ing. Janě Mazákové Ph.D., za její odborné vedení a pomoc v průběhu vyhotovení práce.

# Rezistence k fungicidům v populaci *Phytophthora infestans* v České republice

## Souhrn

Tato diplomová práce je zaměřena na posouzení a vyhodnocení citlivosti/rezistence patogena *Phytophthora infestans* (původce plísně bramboru) k vybraným účinným fungicidním látkám pomocí *in vitro* testu, použity v rozdílných koncentracích byly tyto látky: metalaxyl-M, propamocarb-hydrochlorid a dimethomorph.

Izoláty, které byly testovány k účinné látce metalaxyl-M byly hodnoceny jako citlivé, intermediární a rezistentní dle klasifikace Therrien et al. (1993). Jelikož pro účinné látky dimethomorph a propamocarb-hydrochlorid neexistuje obdobná klasifikace izolátů do jednotlivých skupin, tak pro jednotlivé izoláty byla u těchto látek stanovena pouze  $EC_{50}$ . V tomto případě  $EC_{50}$  je koncentrace účinné látky, která inhibuje růst mycelia z 50 %.  $EC_{50}$  byla vypočítána pomocí regresní analýzy probitu procenta inhibice růstu ku logaritmu koncentrace fungicidní látky.  $EC_{50}$  byla rovněž stanovena pro metalaxyl-M.

Z celkového počtu 100 izolátů *P. infestans* bylo k účinné látce metalaxyl-M 76 % izolátů citlivých, 16 % intermediárních a 8 % rezistentních. Citlivé izoláty byly zjištěny ve všech krajích, z kterých byly izoláty získány (Středočeský, Plzeňský, Vysočina a Praha) a nalezeny byly také téměř u veškerých lokalit (kromě obce Velhartice). Intermediární izoláty byly objeveny zejména v oblasti Valečov (Okrouhlice) na Vysočině odkud pocházelo 13 % izolátů. Rezistentní izoláty byly zjištěny především v Plzeňském kraji v lokalitě Velhartice, kde bylo nalezeno 6 % rezistentních izolátů z celkových 8 %, lze tedy konstatovat, že problém s rezistencí patogena *P. infestans* vůči účinné látce metalaxyl-M byl v roce 2016 zejména v této oblasti.

Všechny získané izoláty byly rovněž testovány na citlivost/rezistenci k účinné látce propamocarb-hydrochlorid, přičemž k 50 % inhibici růstu mycelia docházelo u této látky až při vyšších koncentracích. U 51 % izolátů se hodnota  $EC_{50}$  pohybovala mezi koncentracemi 10–100  $\mu\text{g/ml}$  a u 42 % izolátů přesahovala  $EC_{50}$  dokonce nejvyšší testovanou koncentrací 100  $\mu\text{g/ml}$ .

Účinná látka dimethomorph vykazovala nejlepší účinnost ze všech testovaných látek. K této látce byly všechny izoláty citlivé a nebyl u nich zaznamenán růst mycelia ani při nejnižší koncentraci < 0,1  $\mu\text{g/ml}$ .

**Klíčová slova:** Plíseň bramboru, rezistence, fungicidy, citlivost

# Fungicide resistance in population of *Phytophthora infestans* in the Czech republic

## Summary

This diploma thesis is aimed at assessing and evaluating the sensitivity/resistance of the pathogen *Phytophthora infestans* (the agent of the late blight) to selected active fungicidal substances by means of an *in vitro* test, used in different concentrations were the following substances: metalaxyl-M, propamocarb-hydrochloride and dimethomorph.

Isolates tested for the active substance metalaxyl-M have been evaluated as sensitive, intermediate and resistant according to the Therrien et al. (1993). Since there is no similar classification of isolates per group for the active substances dimethomorph and propamocarb-hydrochloride, only EC<sub>50</sub> was established for each of these substances. In this case, EC<sub>50</sub> is the concentration of the active substance that inhibits mycelia growth from 50 %. EC<sub>50</sub> was calculated using a regression analysis of the percentage inhibition of growth in the logarithm concentration of the fungicidal substance. EC<sub>50</sub> was also established for metalaxyl-M.

Of the total 100 *P. infestans* isolates, 76 % of the metalaxyl-M isolates were sensitive, 16 % intermediate and 8 % resistant to the active substance. Sensitive isolates were found in all regions from which isolates were obtained (Středočeský, Plzeňský, Vysočina and Praha) and were also found in almost all locations (except Velhartice). Intermediate isolates were found mainly in the Valečov (Okrouhlice) region of the Vysočina, where 13 % of the isolates came from. Resistant isolates were found mainly in Plzeňský region in Velhartice, where 6 % of resistant isolates were found from a total of 8 %, so it can be noted that problem with the resistance of the *P. infestans* pathogen to the active substance metalaxyl-M was mainly in this area in 2016.

All isolates obtained were also tested for sensitivity/resistance to the active substance propamocarb-hydrochloride, with 50 % inhibition of mycelia growth occurring at higher concentrations. In 51 % of isolates, EC<sub>50</sub> ranged between concentrations of 10–100 µg/ml and in 42 % of isolates, EC<sub>50</sub> even exceeded the highest test concentration of 100 µg/ml.

The active substance dimethomorph showed the best efficacy of all test substances. All isolates were sensitive to this substance and had no mycelium growth at the lowest concentration < 0,1 µg/ml.

**Keywords:** Late blight, resistance, fungicides, sensitivity

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Hypotéza a cíl práce</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b>	<b>4</b>
<b>3.1</b>	<b><i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) de Bary (1876)</b>	<b>4</b>
3.1.1	Taxonomické zařazení	4
3.1.2	Původ patogena	4
3.1.3	Biologie patogena	5
3.1.4	Rozmnožování	5
3.1.4.1	Nepohlavní rozmnožování	5
3.1.4.2	Pohlavní rozmnožování	6
3.1.5	Příznaky napadení a zdroj infekce	7
3.1.6	Metody ochrany	8
3.1.6.1	Rezistentní šlechtění	9
3.1.6.2	Nechemické metody	9
3.1.6.3	Chemické metody	11
3.1.7	Prognóza a signalizace výskytu	11
<b>3.2</b>	<b>Rezistence k fungicidům</b>	<b>12</b>
3.2.1	Typy rezistence	13
3.2.1.1	Kvalitativní rezistence	13
3.2.1.2	Kvantitativní rezistence	14
3.2.1.3	Křížová rezistence	14
3.2.1.4	Mnohonásobná rezistence	15
3.2.2	Molekulární mechanismy rezistence	15
3.2.2.1	Molekulární mechanismy rezistence k vybraným skupinám fungicidů	15
3.2.3	Rezistence patogena <i>Phytophthora infestans</i> k fungicidům	17
3.2.4	Monitoring rezistence a možnosti omezení vzniku rezistence k fungicidům	19
<b>3.3</b>	<b>Fungicidy</b>	<b>20</b>
3.3.1	Historie fungicidních přípravků	20
3.3.2	Vývoj fungicidních přípravků a jejich uvedení do praxe	21
3.3.3	Rozdělení fungicidů	22
3.3.3.1	Kontaktní fungicidy	22
3.3.3.2	Systémové fungicidy	22
3.3.4	Příklady chemických skupin používaných proti houbovým patogenům (včetně <i>P. infestans</i> ) a jejich mechanismus působení	23
3.3.4.1	MBC – Methyl benzimidazol karbamáty	23

3.3.4.2	QoI – Inhibitory ubichinol oxidázy .....	23
3.3.4.3	DMI – Inhibitory demetylace .....	24
3.3.4.4	Chloronitrily .....	24
3.3.4.5	PA – Fenylamidy.....	25
3.3.4.6	CAA – Amidy karboxylových kyselin.....	25
3.3.5	Přípravky proti plísni bramborové – ( <i>Phytophthora infestans</i> ) .....	26
<b>4</b>	<b>Materiál a Metody.....</b>	<b>30</b>
4.1	Sběr vzorků pro izolaci patogena <i>P. infestans</i> .....	30
4.2	Izolace patogena <i>P. infestans</i> .....	30
4.3	Živné médium .....	30
4.4	Stanovení rezistence (citlivosti) k fungicidním látkám .....	31
4.5	<i>In vitro</i> test rezistence na agaru .....	31
<b>5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>33</b>
5.1	Sběr a izolace <i>P. infestans</i> .....	33
5.2	Testy rezistence (citlivosti) k vybraným fungicidním látkám .....	33
5.2.1	Metalaxyl-M .....	33
5.2.2	Propamocarb-hydrochlorid .....	35
5.2.3	Dimethomorph .....	35
<b>6</b>	<b>Diskuse .....</b>	<b>36</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>39</b>
<b>8</b>	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>41</b>

# 1 Úvod

Oomyceta *Phytophthora infestans* způsobuje v celosvětovém měřítku nejzávažnější chorobu bramboru (*Solanum tuberosum*). Odhaduje se, že až 3,5 miliard dolarů ročně činí náklady spojené s ochranou proti tomuto patogenu (Juroch 2011). Plíseň bramboru ovlivňuje rozhodující měrou výnos, tržní kvalitu i výši ztrát v průběhu skladování, ve vlhkých letech může navodit ztráty na výnosu až ve výši 40–70 %.

Plíseň rajčete, jejímž původcem je stejný patogen, představuje v oblastech pěstování rajčat taktéž nejvýznamnější chorobu této plodiny. Za příznivých podmínek dochází k velice pohotovému a destruktivnímu šíření choroby v porostu hostitelských rostlin. V letech 1845–1847 došlo k epidemickému šíření choroby na území západní Evropy a v Irsku dokonce k úplnému a opakovanému zničení porostů bramboru, hlavní zemědělské plodiny a potravin y tamějšího obyvatelstva. Následkem epidemie choroby a několikaleté neúrody nastal hladomor, který zapříčinil smrt asi 1 miliónu obyvatel Irska a vedl k emigraci 1,5 milionu obyvatel.

S výjimkou střední Ameriky se ve všech oblastech pěstování až do 70. let minulého století vyskytoval jenom pohlavní typ A1 a patogen se rozmnožoval jen nepohlavním způsobem. Pravděpodobně v roce 1976 byl zavlečen z Ameriky v zásilkách brambor do Evropy úplně nový, druhý pohlavní typ A2, který je mnohem agresivnější. V důsledku pohlavního rozmnožování mezi typy A1 a A2 došlo k rozšíření genetické variability patogenu a brzy nastaly naprosto nové problémy v ochraně rostlin, kupříkladu vznik rezistence patogenu k některým přípravkům na ochranu rostlin, respektive k určitým skupinám účinných látek, například fenylamidům.

Rezistence fytopatogenních oomycet a hub je definována jako snížená účinnost fungicidu na populaci oomycety nebo houby v důsledku jeho používání, případně jako dědičné přizpůsobení patogenu k fungicidu, které vede ke ztrátě účinnosti fungicidní látky. V podstatě jde o reakci patogenu na opakované použití stejné nebo příbuzné účinné látky se stejným působením. Patogen přestává být citlivý na účinnou látku a rostlina přestává být dostatečně chráněna (získaná rezistence). V současné době jde o významný fenomén, který nepříznivě ovlivňuje nejen účinnost ochranných zásahů, ale i možnost optimální volby a dobu účinného používání fungicidů.



V praktické části této diplomové práce byla posuzována a vyhodnocena citlivost/rezistence patogena *Phytophthora infestans* k vybraným fungicidním látkám, použity v určitých koncentracích byly tyto látky: propamocarb-hydrochlorid (karbamáty), dimethomorph (amidy karboxylových kyselin) a metalaxyl-M (fenylamidy).

## 2 Hypotéza a cíl práce

Hypotéza diplomové práce: V populaci původce plísně bramboru (*Phytophthora infestans*) se nacházejí izoláty, které jsou rezistentní k některým běžně používaným účinným látkám fungicidů.

Cíl diplomové práce: U izolátů *Phytophthora infestans* získaných z různých lokalit pěstování bramboru testovat jejich reakci k vybraným účinným látkám fungicidů (dimethomorph, propamocarb-hydrochlorid a metalaxyl-M), které jsou běžně aplikovány při ochraně brambor proti plísni bramboru.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary (1876)

Jednou z nejvýznamnějších chorob bramboru je plíseň bramboru, kterou způsobuje patogen *Phytophthora infestans*. Tato choroba se vyskytuje především na podmáčených půdách, za mírného a deštivého počasí. V Irsku ve 40. letech 19. století dokonce zapříčinila hladomor. Mezi hostitelské spektrum *P. infestans* patří kromě brambor také jiné rostliny z čeledi *Solanaceae* – lilkovité, například *Solanum lycopersicum* L. (rajče jedlé). Bylo objeveno, že v Kanadě a USA se řadí mezi hostitelské rostliny rovněž *Petunia x hybrida*, *Solanum sarrachoides* a *S. dulcamara* (Stevenson et al. 2001).

#### 3.1.1 Taxonomické zařazení

*Phytophthora infestans* je podle internetového portálu lifemap-ncbi (2019) zařazována z taxonomického hlediska do těchto kategorií:

Doména: *Eukaryota*

Infraříše: *Stramenopiles*

Třída: *Oomycetes*

Řád: *Perenosporales*

Čeď: *Perenosporaceae*

Rod: *Phytophthora* de Bary 1876

#### 3.1.2 Původ patogena

Jsou známy dva zdroje důkazů, které se zabírají původem patogena *P. infestans*. První zdroj je podložen historickými informacemi, které se zabývají počátečním rozmachem infekce. Druhý zdroj je založen na vlastnostech patogena z aspektu molekulární úrovně, které se odlišují v rámci rozličných oblastí světa. Podle těchto podkladů byly určeny dvě přijatelné teorie původu *P. infestans* – andská a mexická. Andská teorie konstatuje, že patogen původně pochází z Jižní Ameriky, tudíž z totožné oblasti odkud pochází i jeho hlavní hostitel. Toto prohlášení bylo avšak poté popřeno mexickou teorií, která upřednostňuje jako centrum původu patogena

střední Mexiko. Bylo tak stanoveno detailní analýzou, kde byly též prvně určeny oba pohlavní typy A1 a A2 (Adrivon 1996).

Ve středním Mexiku v roce 1956 byl prvně nalezen pohlavní typ A2. Zatímco byl výskyt tohoto pohlavního typu hlášen do roku 1980 jen v Mexiku, pohlavní typ A1 byl už rozšířen i jinde ve světě. Pohlavní typ A2 byl v roce 1980 objeven také ve Švýcarsku a v poslední době byl jeho výskyt potvrzen i v ostatních částech světa (Ristaino 2002).

### 3.1.3 Biologie patogena

*P. infestans* je hemibiotrofní organismus, který v průběhu svého životního cyklu prochází biotrofní fází, poté nekrotrofní a na konec saprofytickou fází (Pieterse et al. 1992). Stélka patogena je tvořena hyfou bez přehrádek vytvářející nepřehrádkované mycelium (Kalina & Váňa 2005). Patogen se dále charakterizuje nedostatkem chitinu ve stěnách buněk (Fry & Goodwin 1997). Kalina a Váňa (2005) uvádějí, že v buněčných stěnách se nachází především polyglukany, celulóza a ostatní látky. Pro patogena je též charakteristický výskyt dvou heterokontních bičíků u zoospor. *P. infestans* se řadí k druhům heterothalickým, tedy druhům, jejichž pohlavní rozmnožování je závislé na přítomnosti odlišných pohlavních typů (Fry & Goodwin 1997).

### 3.1.4 Rozmnožování

#### 3.1.4.1 Nepohlavní rozmnožování

Infekce porostů brambor je zapříčiněna zejména nepohlavním typem rozmnožování, u tohoto polycyklického patogena může docházet k opakovaným asexuálním cyklům (Stevenson et al. 2001). Na primárně napadených rostlinách se na vrcholových lístcích tvoří sporangiofory, které vyrůstají z listových průduchů. Útvary sporangioforů se utváří jednak jednotlivě či po 2 až 5 ve svazku a na konci se rozvětvují (Juroch 2011). Na konci sporangioforů se vytváří a poté odškrcují útvary citrónovitého tvaru, nazývaná sporangia. Sporangia jsou charakteristická rozměry  $21\text{--}23 \times 21\text{--}38 \mu\text{m}$  a přítomností apikálního póru (Stevenson et al. 2001), dále mají hladký povrch a na jejich bázi se nalézá stopečka (Juroch 2011). Ideální předpoklady pro vznik sporangií jsou vlhkost nad 90 % a teplota okolo 20 °C. Sporangia se šíří především v ranních hodinách, a to větrem, či deštěm (Andersson 2007). Jestliže jsou nízké teploty (8–18 °C) začínají se tvořit ve sporangiu zoospory. Tyto pohyblivé spory mají dva bičíky, které jsou obvykle jednojaderné. Zoospory, ale svoji pohyblivost ztrácejí po několika minutách, kdy encystují.

Poté zoospory na náležitě rostlině klíčí v hyfu, která prostupuje do buněk hostitele (Stevenson et al. 2001). Za vyšších teplot v hranici od 18 do 24 °C dochází k přímému klíčení sporangií v klíčící hyfu (Juroch 2011). Klíčení sporangií a zoospor provází následující vznik apresoria a penetračního hrotu, to poskytuje patogenu snazší průstup do pletiva hostitele. Po vniknutí hyf do pletiva hostitele dochází k pohotové expanzi patogena rozrůstáním hyf. *P. infestans* rovněž utváří haustoria, díky kterým odebírá živiny hostitele, přitom poté dochází i k zničení pletiva (Grenville-Briggs & van West 2005). Po několika dnech se opět tvoří sporangiofory se sporangií, která mohou znovu navodit sekundární infekci dalších rostlin (Andersson 2007). Agrios (1997) uvádí, že teploty okolo 30 °C limitují expanzi infekce, ale patogena úplně nezahubí. Při přijatelných podmínkách znovu dochází k aktivaci spor (Agrios 1997).

Jestliže se nedodrží náležitá opatření, může také dojít k napadení hlíz. Infekce je vyvolána smyvem sporangií z listů do půdy, kde přicházejí do kontaktu s hlízou. K infekci může dojít i v průběhu sklizně hlíz či během jejich manipulace. Možnost infekce je nicméně ročníková záležitost, která je také ovlivněna chemickou ochranou, výběrem odrůd, velikostí hrůbků a předčasným likvidováním natě (Hausvater & Doležal 2014; Stevenson et al. 2001). Klíčící zoospory a sporangia napadají hlízy, v kterých se potom rozšiřuje mycelium. Tyto hlízy jsou v následujícím roce zdrojem primární infekce. Rostliny po vyklíčení nevykazují žádné symptomy napadení, choroba je patrná až za vhodných podmínek (Vokál et al. 2013).

#### 3.1.4.2 Pohlavní rozmnožování

Na rozdíl od nepohlavního typu rozmnožování, kde dochází k opakování infekčního cyklu několikrát během vegetačního období, tak u pohlavního rozmnožování *P. infestans* je cyklus dokončen jen jednou v průběhu vegetačního období (Kessel & Förch 2006).

Do 80. let 20. století, se předpokládala možnost jenom nepohlavního způsobu rozmnožování. Zaznamenán byl jen výskyt pohlavního typu A1. Mexiko bylo jedním z míst, kde byly objeveny oba pohlavní typy, a tudíž mohlo dojít k pohlavnímu rozmnožování patogena. Z Mexika byl patogen dopraven nejdříve do Evropy, odkud potom expandoval o i do ostatních částí světa. Výskyt obou pohlavních typů nebyl tedy orientován jen na Mexiko (Stevenson et al. 2001). V roce 2003 byla přítomnost obou pohlavních typů také zaznamenána v České republice (Mazáková et al. 2006).

Specifickým znakem pohlavního rozmnožování je přítomnost pohlavních typů A1 a A2. Jestliže dojde ke spojení hyf obou pohlavních typů, nastává vytváření oospor, které vznikají splynutím oogonií a antheridií (Juroch 2011). Během tohoto vzájemného působení obou typů nastává utváření specifických feromonů, které napomáhají tvorbě těchto gametangií (Mazáková & Táborský 2005). Díky velmi silné buněčné stěně jsou oospory schopné přečkat nepříznivé podmínky, například mráz a sucho. V půdě můžou přežít i několik let (Stevenson et al. 2001). Bylo prokázáno, že po dobu dvou dnů můžou oospory přečkat velmi nízké teploty (-80 °C), ale také mohou přežít teploty do 35 °C (Drenth et al. 1995).

U tohoto patogena byla i dokázána polyploidie. U izolátů, které byly získané z Velké Británie bylo zjištěno vyšší množství DNA než u izolátů z Mexika. Tenhle vyšší počet chromozomových sad, konkrétně tetraploidie, dovoluje britským izolátům snazší adaptaci k chladnějším podmínkám (Sansome 1977).

K pohlavnímu rozmnožování dochází tehdy, pokud jsou vytvořeny ideální podmínky pro vývoj choroby. Oospory infikují spodní listy, kde jsou chráněny před fungicidním postřikem. Na rostlině pak můžou oospory vydržet i za nepříznivých podmínek, dokud se nevytvoří přijatelné podmínky (Drenth et al. 1995). V průběhu tohoto typu rozmnožování dochází k vytváření geneticky variabilních populací *P. infestans*, které dokáží přemoci rezistenci hostitele (Cooke et al. 2003). V **Příloze III** je zobrazen životní cyklus patogena *P. infestans*.

### 3.1.5 Příznaky napadení a zdroj infekce

Zdrojem infekce je zejména infikovaná sadba. Dalším zdrojem, o kterém se debatuje jsou odolné oospory přečkávající v půdě, na zřetel je třeba brát i plevelné brambory (Hausvater et al. 2011a).

Symptomy choroby vyvolané *P. infestans* se můžou rozšířit na celé rostlině bramboru (Stevenson et al. 2001). Pokud je primárně zasažena sadba, patogen systémově expanduje z hlízy do rostliny. Nejdříve nastávají projevy choroby na vegetačních vrcholech, potom se infekce rozšiřuje přes řapíky k listům a také na stonek. Skvrny na listech zapříčiněné sekundární infekcí jsou obvykle šedo-černé, vodnaté, můžou i nekrotizovat (viz **Příloha VI**) a během ideálních vlhkých podmínek se utváří na spodní straně listu, na rozmezí napadeného a zdravého

pletiva, vrstva sporangioforů. Přítomnost lézí se pozměňuje na základě klimatických podmínek a stáří rostliny (Juroch 2011).

Sporulovat může patogen také na stonku. Sporulace avšak nastává jen za ideálních podmínek, například za vysoké relativní vlhkosti (100 %) či vysoké vlhkosti povrchu rostlin a teplot, které se pohybují v rozmezí 12–24 °C. Tyto předpoklady by měly vytrvat alespoň po čas 8 hodin. Symptomy nákazy se vyskytují nejdříve na apikálních částech rostliny či na rozhraní stonku a řapíku (Stevenson et al. 2001).

Symptomy choroby lze ze začátku objevit jen lokálně, kdy se patogen rozšiřuje jenom kolem rostlin pocházejících z nakažené sadby, až poté zaznamenáváme rozlehlejší výskyt (Juroch 2011). Stevenson et al. (2001) uvádějí, že na rostlinách rajčete lze snadno, obzvláště po zaschnutí skvrn zaměnit chorobu se symptomy vyvolané *Botrytis* spp. V **Příloze VIII** je ukázka napadených plodů rajčat plísní bramborovou.

U infekce hlíz se symptomy choroby zprvu vyskytují jako tmavé skvrny (Prokinová 2014). Léze jsou na hlízách zpočátku méně výrazné a mají šedivou barvu, potom se můžou propadat (Juroch 2011). Přejít mezi napadeným a zdravým pletivem je na první pohled zřetelný (viz **Příloha VII**). Napadené pletivo není hladké a patogen se může dostat do rozličných hloubek hlízy (Stevenson 2001). Během rozkrojení hlízy jsou viditelné obzvláště po okrajích hnědo-červené skvrny (Prokinová 2014). Hlízy můžou být sekundárně infikovány dalšími houbovými patogeny, lze tedy zmínit například *Fusarium* spp. a *Phytophthora erythroseptica* (Stevenson 2001).

### 3.1.6 Metody ochrany

V nynějším období je nejhojněji využívána integrovaná ochrana rostlin proti *Phytophthora infestans*, která se zaobírá především preventivními opatřeními proti patogenu, užíváním fungicidních přípravků a zakončováním vegetačního období pomocí odstranění natě (Hausvater & Doležal 2014). Fungicidní přípravky se zatím nezdařilo vyloučit, a jsou tedy významnou složkou ochrany. Ochrana by ovšem měla být pokaždé cílená s ohlednutím na vývoj počasí a odrůdu (Vokál et al. 2013).

### 3.1.6.1 Rezistentní šlechtění

Haverkort et al. (2008) uvádějí, že náklady v souvislosti s ochranou proti *P. infestans* jsou velmi vysoké. Výdaje na samotné chemické přípravky byly v Nizozemsku ustanoveny přibližně na 330 EUR na hektar za jedno vegetační období (Haverkort et al. 2008). Množství vjezdů do vegetace, v souvislosti s použitím chemických přípravků na ochranu rostlin, se pohybuje u pěstitelů ze severní Evropy v rozmezí 10–15 za vegetační období. Tudíž je velmi prospěšné šlechtit rezistentní rostliny k *P. infestans*. Sníží se tím množství nezbytných chemických zákroků proti chorobě a omezí se tedy i vlivy na životní prostředí (Jones et al. 2014).

Vůči *P. infestans* jsou známy dva druhy rezistence (Sedlák et al. 2005). Prvním druhem je vertikální rasově specifická rezistence, která je typická zaměřením jen proti konkrétní rase. Řízení tohoto typu rezistence je navozeno majorgenem, tudíž genem velkého účinku. Tento druh rezistence je postaven na teorii „gen proti genu“, kde gen rezistence hostitele je spuštěn genem avirulence patogena (Věchet 2012). Rostlina *Solanum demissum* Lindl. byla využita pro účely šlechtění *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*, jako zdroj vertikální rezistence k *P. infestans* (Wastie 1991). Vnější podmínky nemají vliv na rezistenci řízenou majorgenem (Chloupek 2008). Klasifikováno bylo podle této rezistence 11 R-genů (Malcommson & Black 1966).

Druhým druhem je rasově nespecifická rezistence, která je řízena vyšším množstvím genů (Ross 1986). Rostliny mohou zareagovat na všechny rasy patogena. Tento druh rezistence je ovšem komplikovaný, poněvadž je podmiňován vnějšími podmínkami (Věchet 2012). Chloupek (2008) uvádí, že význam této rezistence je nižší, ovšem jestliže nastane vytvoření nových ras, nenastává většinou její překonání.

V současné době mohou pěstitelé brambor využít například odrůdu „Bohemia“, která je odolná k plísni bramboru (v nati i na hlízách) (vesa-velhartice 2019).

### 3.1.6.2 Nechemické metody

#### 3.1.6.2.1 Preventivní opatření

Vhodně vybrané pěstitelské postupy zajišťují snížení výskytu *P. infestans*. Jde především o preventivní opatření a poté správně zvolenou posklizňovou manipulaci.



Volba odrůdy je pro počátek pěstování velmi významná. Vybrány by měli být kvalitní a odolné odrůdy vůči *P. infestans*, které jsou rovněž ideální pro konkrétní pěstitelskou plochu. Není avšak pravidlem, že velmi kvalitní odrůdy jsou ty nejodolnější. Podstatné je též odlišit, která odrůda je citlivější k napadení nati, a která k napadení hlíz, a zvolit podle tohoto fungicidní ochranu (Hausvater & Doležal 2014).

Následujícím významným kritériem je výběr stanoviště, který je velice důležitý v prevenci vůči určitému patogenu. Vybírány by měli být lokality, které nejsou vlhké, zastíněné a utužené. Obzvláště náchylné odrůdy by se měli pěstovat v přijatelném prostředí (Vokál et al. 2013).

Biologická příprava sadby pojímá procesy, které uspíší její vzházení. Touto aktivitou se v průběhu epidemického šíření choroby zrychluje vzházení sadby, je tedy navozován zvýšený výnos plodiny (Hausvater & Doležal 2014).

Vhodná výživa je důležitým aspektem zapojeného a silného porostu. Rostliny, jenž nejsou uspokojivě vyživeny, či obráceně mají určitých prvků nadbytek, lépe vzdorují napadení (Hausvater & Doležal 2014). Vokál et al. (2013) uvádějí, že je podstatná také přítomnost přijatelného hořčíku.

U ochrany hlíz má úprava hrůbků klíčovou úlohu. Významné je jejich vhodné a přijatelné nahrnutí. Půda zde vytváří ochranu před kontaktem spor a hlíz (Vokál et al. 2013).

Předsklizňové postupy začleňují desikaci, či porušení natě. K infekci hlíz může dojít kontaktem s napadenou natí či přímo ze sklízecího stroje. Riziko napadení navíc zvyšuje mechanické poškození hlíz. Jestliže se před sklizní objeví, že jsou infikované hlízy, oddálí se doba sklizně. Hojně infikované hlízy se poté skladují v prostorách, které jsou pro ně určené a následně jsou tříděny. Bramborové hlízy by měly být ukládány do skladů, které jsou větratelné (Hausvater & Doležal 2014).

#### 3.1.6.2.2 Odstranění natě

Účelnou ochranou před infikováním hlíz je odstranění natě, a to jednak chemicky či mechanicky. Tím je zakončena vegetace a zmírněno nebezpečí napadení hlíz. O zakončení vegetace odstraněním natě se obecně uvažuje, pokud je infikováno 5–20 % nadzemních částí rostlin.

Přerušeni vegetace se ovšem provádí s poohlížením na předpokládaný vývoj počasí (Čepl et al. 2009).

### 3.1.6.3 Chemické metody

Fungicidní ochrana vůči *P. infestans* si pokládá za cíl zamezit napadení natě a rozmachu původce choroby dále ve vegetaci. Cílem je též zabránit napadení hlíz. V nynějším období je k dispozici na tuzemském trhu kolem 50 přípravků (konkrétně podle Rostlinolékařského portálu k 7.2.2019 = 85) na ochranu vůči *P. infestans*, které zahrnují okolo 21 (detailněji dle Rostlinolékařského portálu k 7.2.2019 = 27) účinných látek. Podstatné je avšak zachovávat antirezistentní strategie, například využívat více rozličných příslušných účinných látek (Hausvater & Doležal 2014).

Období počáteční aplikace fungicidního přípravku se určuje podle předpovědi výskytu patogena, či dle rozvíjení vegetace. Aplikace se opět provádí podle instrukcí na etiketě. Významné je monitorovat vývoj počasí a za deštivého a chladnějšího vývoje aplikovat přípravek častěji. Nařazení přípravku vodou by mělo být 400 l/ha a více (Hausvater et al. 2011a).

Počáteční zásah fungicidním přípravkem se uskutečňuje jako prevence vůči určité chorobě a používají se obvykle kontaktní fungicidy, kupříkladu na bázi mankozebu či metiramu. Následný postřik se provádí před a na začátku rozmachu infekce. Nejeefektivnějšími přípravky pro tyto termíny jsou kontaktní fungicidy, následně poté fungicidy systémové a lokálně systémové. Závěrečná aplikace fungicidními přípravky by měla být realizována na konec vegetace, ochrana by se měla zaměřovat zejména na hlízy (Vokál et al. 2013).

### 3.1.7 Prognóza a signalizace výskytu

Předpověď výskytu choroby pojímá první brzké ošetření, které by mělo být především preventivní. Základním prvkem pro stanovení prvního ošetření je použití negativní prognózy, či rozličných prognostických metod (Juroch 2011).

Metoda negativní prognózy posuzuje data v souvislosti s klimatickými faktory ve vztahu k *P. infestans*. Stanovuje dobu, kdy by se choroba neměla ve vegetaci vyskytovat (Iglesias et al. 2010). Následující metodou ve spojitosti s pozorováním počátečního výskytu choroby je počítačový model BLITECAST, který je schopen stanovit i její následné rozšiřování. Zohledňuje data týkající se teploty, vlhkosti, srážek a uvádí i možnost vyhovující volby a doby aplikace

fungicidního ošetření (Táborský & Doležal 2006). Následně je možné také definovat model LATEBLIGHT, který je schopen monitorovat průběh počasí, vývojové stadium hostitelské rostliny a napodobuje aplikaci fungicidního zásahu (Andrade-Piedra et al. 2005).

Podle negativní prognózy výskytu patogena se uskutečňuje signalizace počátečního zásahu. Počáteční ošetření podle signalizace se realizuje, nabyde-li hodnota kritického čísla 150. Jde především o ošetření porostů v polohách citlivých ke vzniku infekce a u méně odolných odrůd, a to podle prognostických metod, či v souvislosti na vývojové fázi rostliny (Juroch 2011).

### **3.2 Rezistence k fungicidům**

Jestliže je hojně a pravidelně využíván určitý fungicidní přípravek, či fungicidy z totožné chemické skupiny, je pravděpodobné, že se dříve nebo později u patogena vyskytne k těmto látkám rezistence. Kuck (2005) uvádí, že se fungicidy ukazují větší měrou citlivé ke vzniku rezistence než insekticidy či herbicidy a spousta houbových patogenů poškozujících rostliny je pověstných pro obzvláště velký potenciál vzniku rezistence. Rezistence k fungicidům může být formulována jako dědičná a permanentní adaptace patogena fungicidu, s konečnou redukovanou sensitivitou patogena k fungicidu. Rozvíjení rezistence je důsledkem genetické mutace jednoho či mnoha genů najednou, která přináší patogenu možnost přemoci účinek fungicidu. Za proměnlivost sensitivity patogena k fungicidu, respektive k jeho účinné látce nesou odpovědnost mimo major genů i minor geny, které jsou v interakci s major geny odpovědnými za rezistenci (McGrath 2001).

Populace patogenů můžou k fungicidu mimo citlivosti projevat též dědičnou nebo přirozenou rezistenci, která se pokládá za už přirozený typ rezistence, která tvoří jakousi přirozenou překážku využití fungicidu (Brent & Hollomon 2007b).

Abychom rozuměli dynamičnosti vzniku rezistentních subpopulací, je významné pozorovat jednak citlivost ošetřených a neošetřených populací k přípravku, ale i epidemiologická kritéria, například virulenci, fitness, distribuci pohlavních typů a frekvenci sexuální rekombinace (Gisi et al. 2000).

Na citlivou část patogenní populace účinkují fungicidy efektivně, malá část v populaci patogena nesoucí mutaci, která způsobuje rezistenci je schopna přežít, namnožit se a pod selekčním tlakem fungicidu se stát v populaci patogena dominantní. Ekologické fitness rezistentních houbových patogenů poté budou klíčové pro vytrvání selektovaných rezistentních genotypů v populaci. Poněvadž, ale rezistentní izoláty mají často slabší fitness než ty citlivé, nemůžou prosperovat za nepřítomnosti selekčního tlaku fungicidu. V této situaci by se četnost rezistentních izolátů v patogenních populacích dala zmírnit se zakončením aplikace přípravku. Můžou též být situace, kdy jsou rezistentní izoláty obdobně životaschopné jako ty citlivé a můžou vytrvat delší období dokonce za nepřítomnosti tlaku fungicidu. Například je možné v této situaci uvést rezistence určitých fytopatogenních hub (kupříkladu lokality s vysokou četností rezistentních izolátů u polních populací *E. graminis*) vůči benzimidazolovým či strobilurinovým fungicidům (Brent & Hollomon 2007a; Gisi et al. 2000; Ma & Michailides 2005; McGrath 2001).

Jestliže máme v úmyslu předpovídat rozvoj rezistence u patogenu, tak je nevyhnutelné vzít v úvahu zpětnou vazbu spojenou s hustotou jeho populace (Van den Bosch & Gilligan 2008). Rychlost, s jakou se rezistence rozvíjí, je též ve spojitosti s epidemiologickými kritérii specifickými pro určitý patogen nebo chorobu. Nedlouhý generační čas, způsobilost nakazit hostitele ve všech stádiích jeho životního cyklu (což požaduje opětovnou aplikaci fungicidu), přítomnost pohlavního stadia v životním cyklu, značný rozsah sporulace a dostatečná způsobilost spor šířit se mezi rostlinami, porosty a regiony, vede k navýšení nebezpečí vzniku rezistence (Brent & Hollomon 2007a).

### **3.2.1 Typy rezistence**

#### **3.2.1.1 Kvalitativní rezistence**

Rezistence k určitým fungicidům může být důsledkem modifikace jednoho zásadního genu. Rezistence v této situaci směřuje k úplnému poklesu kontroly nad chorobou, které není možné zabránit ani aplikováním vyšších dávek, či opakovaným použitím fungicidu. Tento typ rezistence je obvykle pojmenován jako kvalitativní rezistence. Příkladem je rezistence vůči benzimidazolovým fungicidům (kupříkladu benomyl, thiophanate-methyl), která plyne z prostorové změny cílového místa fungicidu u různorodých patogenů či k látkám z kategorie QoI inhibitorů (McGrath 2001, 2005; Wyenandt et al. 2008).

### 3.2.1.2 Kvantitativní rezistence

Jestliže rezistence vystupuje z modifikace několika vzájemně působících genů, patogeny v souvislosti s množstvím genových mutací (změn) vykazují různorodou sensitivitu k fungicidu. Proměnlivost v citlivosti v rámci populace je unimodální či kontinuální a selekce se vyskytuje ve specifickém směru. Rezistence v této situaci zhoršuje schopnost chemického ošetření vůči chorobě, avšak využitím vyšších dávek či pravidelnějším používáním fungicidu může být choroba zmírněna. Teprve následná selekce v genetické výbavě patogenu může následovně zapříčinit úplný pokles moci nad chorobou. Jedná se o takzvanou kvantitativní rezistenci. Kvantitativní rezistence se vytváří k takzvaným multi-site fungicidům, které zasahují do více pozic metabolismu patogenu, jestliže se u patogenu vyskytne zároveň několik mutací. Tento typ rezistence je představován též ve spojení s rezistencí k inhibitorům demethylace (DMI) (McGrath 2001).

### 3.2.1.3 Křížová rezistence

Mechanismy účinku rozmanitých fungicidů uvnitř každé ze zmíněných skupin jsou velice obdobné či stejné. Patogenní populace, která je rezistentní k jednomu fungicidu v rámci jisté skupiny, bude nejspíše rezistentní i k dalším přípravkům téže skupiny. Tato záležitost velice omezuje kontrolu rezistence. Jestliže se jednou rozvine rezistence k jednomu fungicidu, další přípravky ze stejné kategorie nejspíše budou méně působivé či zcela nepůsobivé (Brown 2002; McGrath 2001). Křížová rezistence může být též avšak jen parciální a nové látky z té samé skupiny mohou být více účinné než ty starší, vůči kterým byla rezistence zpozorována. Úroveň křížové rezistence se též odlišuje mezi individuálními izoláty (Brent & Hollomon 2007a). Křížová rezistence byla zjištěna u DMI (kupříkladu triadimefon a myclobutanil) i QoI inhibitorů (například azoxystrobin a kresoxim-methyl) (McGrath 2001). Vyskytnout se může též takzvaná negativní křížová rezistence. Proslulými vzory jsou dvě kategorie fungicidů – fenyلكarbamáty a benzimidazoly, které mají totožný mechanismus účinku (cílovým úsekem je  $\beta$ -tubulin), avšak podstatně se odlišují v účinnosti. Výměna aminokyseliny na kodonu 198 v cílovém  $\beta$ -tubulinu navozuje rezistenci vůči benzimidazolu, avšak současně zapříčiňuje sensitivitu patogenu k fenyلكarbamátům. Vystavení patogenu dvěma fungicidům majícím tuto negativní křížovou rezistenci by mělo zmírnit nebezpečí vytvoření rezistence k jejich součástem, poněvadž posunutí k rezistenci u jednoho přípravku automaticky navozuje sensitivitu k druhému (Brent & Hollomon 2007a, b).

#### 3.2.1.4 Mnohonásobná rezistence

Ve srovnání s křížovou rezistencí, u mnohonásobné rezistence patogenní populace projevují vytvoření rezistence k fungicidům více než jedné chemické skupiny. Intenzivní využívání nebezpečných fungicidů z rozličných chemických kategorií může, jestliže nejsou monitorovány zásady náležité kontroly rezistence, směřovat k vytvoření mnohonásobné rezistence (Gallian et al. 2002).

V písemných zdrojích bývá odlišována také takzvaná polní rezistence, která zobrazuje jenom výskyt rezistentních variant v polních populacích (o jakémkoliv množství nebo úrovni napadení) a skutečnou rezistenci („practical resistance“), která vyobrazuje absolutní pokles účinnosti (Brent & Hollomon 2007a; McGrath 2001).

### 3.2.2 Molekulární mechanismy rezistence

Mezi primární molekulární mechanismy rezistence patogenu k fungicidům se řadí 1) modifikace cílového úseku, na který má účinná látka působit, kdy dochází ke snížení schopnosti navázání fungicidu, 2) syntéza odlišného (zástupného) enzymu, schopného substituovat cílový enzym, 3) zesílená syntéza cílových úseků, vůči kterým má fungicid účinkovat, 4) omezený příjem fungicidu, 5) metabolické rozložení fungicidu, 6) popřípadě další dosud neznámé mechanismy (Ma & Michailides 2005).

#### 3.2.2.1 Molekulární mechanismy rezistence k vybraným skupinám fungicidů

Rezistence k **benzimidazolovým** fungicidům, dosud objevena u několika skupin houbových patogenů, je v povětšině případech ve spojitosti s bodovými mutacemi genu pro  $\beta$ -tubulin, které jsou spojené s výměnou sekvencí aminokyselin, přitom mutace na různorodých kodonech genu pro  $\beta$ -tubulin či rozličné záměny na totožném kodonu můžou vyústit v různý stupeň rezistence vůči benzimidazolům (Ma & Michailides 2005; Steffens et al. 1996). U určitých druhů patogenů jsou tyto mutace ve spojitosti s pleiotrofním účinkem inhibujícím vývoj mycelia během nízkých či vysokých teplotách. V těchto situacích by byly rezistentní izoláty v nevýhodě. Ma & Michailides (2005) tudíž předkládají myšlenku použít informace o citlivosti rezistentních izolátů vůči teplotě, aby mohla být zavedena náležitá strategie aplikace fungicidu.

**Inhibitory demethylace** (DMI) potlačují C-14 $\alpha$ -demetylaci 24-methylendihydrolanosterolu, prekursoru ergosterolu u hub. Rezistence k fungicidům této kategorie je u určitých hub zapříčiněna mutací genu CYP51 pro 14  $\alpha$ -demetylasu (eburicol 14  $\alpha$ -demetylasu), či jeho overexpresí (Kunz et al. 1997; Ma & Michailides 2005).

Za rezistenci ke **QoI inhibitorům** odpovídá v povětšině případů bodová mutace v genu pro mitochondriální cytochrom b směřující k výměně aminokyseliny z fenylalaninu na leucin, glycinu na alanin (G143A) či glycinu na serin (objeveno v laboratorním prostředí řízenou mutací u QoI rezistentního druhu *Magnaporthe grisea*). Obdobně jako u rezistence k benzimidazolům i různorodé úrovně rezistence ke QoI se odráží od mutací rozličných kodonů (Gisi et al. 2002; Ma & Michailides 2005). Ve spojitosti s hojně rozvinutým používáním QoI fungicidů se můžou vyskytnout též jiné mechanismy vytvoření rezistence, například jak předkládá Miguez et al. (2004) u druhu *Mycosphaerella graminicola* aktivací alternativní oxidázy.

### **Fenylamidy**

Ačkoli se v posledních 30 letech uskutečnilo mnoho výzkumů o způsobu působení a mechanismu rezistence vůči fenylamidům, předpokládaná genetická rezistence a lokální mutace v genomu nebyly až dosud objasněny (Müller & Gisi 2012).

Davidse (1988) předpokládá, že mutace v genu RNA polymerázy je zodpovědná za rezistenci, protože endogenní RNA polymerázová aktivita izolovaných jader *P. megasperma* a *P. infestans* byla vysoce citlivá na metalaxyl, když byla získána z citlivých, ale ne z rezistentních jedinců. Tato hypotéza byla nedávno potvrzena Whisson et al. (2011), kteří identifikovali specifickou genomovou oblast v rezistentním izolátu *P. infestans* kódující velkou podjednotku RNA polymerázy I, která při přeměně na citlivém izolátu vedla k rezistentnímu jedinci.

Zodpovědná mutace způsobující rezistenci byla identifikována jako Y382F v genu *RNA-polII*, který vykazoval souvislost s rezistencí k metalaxylu-M u asi 85% izolátů v terénu (Randall et al. 2014). Není tedy zcela jasné, zda by další mutace v jiném genu, spojená nebo nespojená s Y382F nebo dalšími mechanismy měla podíl na fenylamidové rezistenci, jak se předpokládá po identifikaci lokusů MEX I a MEX II (Judelson & Roberts 1999).

Mendelova segregace fenylamidové rezistence u potomků F1 a F2 byla pozorována ve studiích křížení s *P. infestans*, což naznačuje, že fenylamidová rezistence je monogenní (Shattock 1986, 1988) a je založena na jednom neúplně dominantním genu (Shaw & Shattock 1991).

### 3.2.3 Rezistence patogena *Phytophthora infestans* k fungicidům

Do roku 1970 se případy fungicidní rezistence vyskytovaly jen mimořádně. Uvedením systémových fungicidů do všední praxe, se ale tato odolnost rapidně navýšila (Brent & Hollomon 2007a).

Nebezpečí vzniku rezistence k fungicidům vyvstane, jestliže na individuální po sobě jdoucí generace patogenu má vliv nepřetržitě totožná subletální koncentrace fungicidu. Tuto hypotézu se pokusili ratifikovat vědci na určené skupině, kdy byla zkoumána případná rezistence patogena *P. infestans* k fenylamidům. Během realizování studie s rezistentními kmeny i izoláty je bylo možné selektovat *in vitro*, ale vyskytovalo se jisté nebezpečí, že buďto nebudou patogenní anebo nenapadnou fenylamidem ošetřené rostliny. Vlastní výběr z rostlin bramboru nezaznamenal po 11 generací žádné rezistentní kmeny. Opačným směrem, vystavení obdobných organismů mutagenní chemické reakci (účinkování nitrosoguanidinu) směřovalo k opatření velmi vysoce fenylamidně rezistentních virulentních kmenů, které by mohly být využity k napadení ošetřených rostlin. Rozdílné výsledky signalizují, že chemicky či fyzikálně navozená mutageneze může poskytnout podstatnější závěry než výběrová riziková rezistentní studie. Počáteční populace v laboratorním prostředí je přesprávně úzká na to, aby zařazovala veškeré množství spontánních mutantů, které se všedně nalézají v polních podmínkách. Pokud jsou ale využity mutageny, je třeba zamezit nebezpečí uvolnění rezistentních kmenů do oblasti s hostitelskými plodinami (Brent & Hollomon 2007b).

Fenylamidy byly prvně uvedeny v roce 1977. Jde o fungicidní látky s charakteristickým účinkem k Oomycetes. Jako přínos je možné spatřovat listovou aplikaci, během které se účinnou látkou ošetří listová plocha a rostoucí rostlina. Určité množství účinné látky je přijato rostlinou a zbytek přetrvává na rostlině a následovně dochází k jejímu smytí deštěm či pronikání do půdy v následku zrání nebo opadávání listů. U půdní aplikace se účinná látka zapraví přímo do půdy, a to buďto v kapalně formě či ve formě granulí (Patentový spis CZ 287915 B6).

Rezistentní izoláty *P. infestans* k fenylamidům se pozvolna staly významnou součástí populací patogena v několika zemích. Pořád však mají fenylamidy dosud nezastupitelnou pozici



ve fungicidní ochraně brambor (Gisi & Cohen 1996). Využití fungicidů na základě (bázi) fenylamidů se v nynější době ztěžuje, poněvadž běžná praxe se, i když proměnlivě rok od roku, potýká se zřetelnou dynamičností ve vzniku a zániku rezistentních kmenů (Hausvater 1998).

Rezistence vůči fenylamidům v populaci patogena *P. infestans* byla prvně vyzorována v roce 1980 ve Švýcarsku, Irsku, Nizozemsku a Izraeli. Rozsáhlé využívání fenylamidních fungicidů směřovalo k vysokému zvýšení rezistentních kmenů *P. infestans* v roce 2004 (Elansky 2007).

Nezbytné bylo uvést na trh fungicid, který má jiné složení. Užitím fenylamidu s přídatkem mankozebu či cymoxanilu se omezila rezistence vůči samotnému využití fenylamidu. Nejproslulejší látkou z kategorie fenylamidů je metalaxyl. Tato účinná látka potlačuje sporulaci a rozrůstání mycelia v hostitelských tkáních, avšak má slabý účinek na sporangium či klíčení zoospor. Nicméně, už v roce 1980 byla přítomná v určitých zemích i rezistence k metalaxylu, což v ten čas byl poměrně nový fungicid proti patogenům ze třídy Oomycetes. Po uvedení obchodního přípravku Ridomil (s obsahem metalaxylu) do běžné praxe se rezistence k metalaxylu u *P. infestans* pohotově zvýšila. Tento fungicid účinkuje velice selektivně v konkrétním cílovém místě, tudíž mutace velice lehce směřuje k rezistenci (Möller et al. 2009).

Rezistence původce plísně bramboru byla ve spojitosti s využitím samotného metalaxylu, poněvadž v zemích, kde se metalaxyl používal ve směsici s mankozebem se rezistence neukázala (Brent & Hollomon 2007a). Antirezistentní strategie vůči nežádoucím organismům kromě jiného záleží na střídání rozmanitých účinných látek. V roce 1993 byla nalezena látka dimethomorph. Dimethomorph je systémově působící fungicidní derivát morfolinu s rozdílným mechanismem účinku v porovnání s jinými využívanými fungicidy. Působí na velké množství organismů třídy *Perenosporea*. U ošetřených sensitivních druhů zapříčiňuje morfogenezní obměny buněčné stěny, které vyvolávají ukončení vývoje patogena. U dimethomorphu není známa křížová rezistence s fenylamidy. Rezistentní kmeny doposud nebyly objeveny. Tato součást je významnou účinnou látkou v systému ošetřování brambor vůči *P. infestans* i za okolnosti tvorby rezistence k ostatním fungicidům (Brent & Hollomon 2007b).

Propamocarb reprezentuje lokálně systémovou fungicidní účinnou látku, která je zastoupena v řadě reakcí fázi syntézy fosfolipidů a mastných kyselin, tím tedy limituje utváření buněčných membrán patogenů. Na buněčné rovině ovlivňuje rozrůstání mycelia, klíčení a tvorbu

spor. V roce 1999 ověřovali výzkumníci v jižním Německu 76 izolátů na reakci propamocarbu a jen 10 z nich bylo rezistentních a 3 projevovaly evidentní citlivost (Möller et al. 2009).

### 3.2.4 Monitoring rezistence a možnosti omezení vzniku rezistence k fungicidům

Určení potenciálu vytvoření rezistence u monitorovaných druhů patogenů, její sledování a instrukce, jak jí zabránit, jsou jedním z primárních předpokladů pro používání ochranných chemických přípravků v praxi. Nezbytné údaje mohou pocházet z výsledků laboratorních zkoušek, pokusů v terénních podmínkách a zemědělské praxe. Laboratorní experimenty, které používají rozmanité techniky (mutace UV světlem, chemická mutace) vyvolávají rezistenci a přinášejí údaje o mechanismu potenciální rezistence. Mechanismus vytvoření rezistence může být rozebírán na různých rovinách – **a) molekulární** (sekvenování cílového genu, klonování a rozpoznání lokusů rezistence), **b) genetické** (způsob segregace během křížení rezistentních a sensitivních jedinců), **c) biochemické** (účinkování fungicidu na cílový úsek), **d) fyziologické** (transport a rozklad fungicidu), **e) populační** (početnost a agresivita rezistentních jedinců) (Gisi et al. 2000).

Metody, kterými jsou zjišťovány rezistentní jedinci jsou založeny na molekulárních markerech a biologických zkouškách sensitivity. Standardně se používá *in vitro* a *in vivo* testování (přesun patogena – mycelium, spory – na fungicidem obohacený agar, či na fungicidem ošetřené části rostliny). Vývoj molekulárních metod umožňuje zjištění vzácně se nacházejících mutací navozujících rezistenci při nejslabších možných četnostech 10 : 10 000. Ke zjištění bodové mutace může být použita PCR (polymerázová řetězová reakce) za využití „alelově“ specifických primerů či kompetentních sond k prozkoumání namnožených DNA fragmentů (Brent & Hollomon 2007b). Pro sledování rezistence se používají také epidemiologické a biologické charakteristiky patogenu, kupříkladu rozšiřování a přežívání patogena mezi vegetačním obdobím (Jarvis 2002).

Vytvoření rezistence k fungicidům je často zapříčiněn samotnými pěstiteli kvůli jejich nesprávnému využívání výhradně nebezpečných fungicidů. Působení a cena fungicidního přípravku jsou pořád pro pěstitele více významnější než nebezpečí vytvoření rezistence patogenů, poněvadž využití managementu rezistence může být nákladnější a méně působivé než použití jediného konkrétního fungicidu po celé sezónní období. Přitom méně drahé fungicidní přípravky jsou patrně často využívány hojněji, kdežto nákladné přípravky jsou používány ve zmírněných množstvích či v delším časovém rozmezí. Skutečný vliv biochemických, chemických,

epidemiologických a genetických nebezpečných faktorů na rozvoj rezistence spočívá na okolnostech využívání fungicidu. Jestliže se patogen objevuje ojediněle, kupříkladu díky nevhodným klimatickým poměrům, použijeme fungicidní přípravek též ojediněle či rotačně nebo v kombinaci s odlišnými druhy fungicidů a využíváme taktéž nechemické metody ochrany. Jestliže mohou předchozí plodiny posloužit jako zdroj nákazy pro další plodiny, měl by být na následovné plodiny užit jako první fungicid z odlišné chemické kategorie, než jaký byl fungicidní přípravek naposledy využívaný na předchozích plodinách. Systematická klasifikace všech případných nebezpečných podmínek a faktorů, za kterých je fungicidní přípravek používán, kupříkladu střídání a míchání fungicidů, načasování jejich využití a jak často jsou používány, poskytuje ustanovit míru nebezpečí vytvoření rezistence a kompetentní strategie během využívání ochranných přípravků (Brent & Hollomon 2007b).

### **3.3 Fungicidy**

Fungicidy zařazujeme k prostředkům na ochranu rostlin vůči houbovým patogenům. Chemický rozsah přípravků s antifungální činností je rozmanitý a obsahuje přípravky s účinnou látkou organického, ale také anorganického původu. Tyto přípravky můžeme rozčlenit podle chemické povahy i dle možnosti jejich použití, tedy na přípravky aplikované do půdy či na nadzemní části rostlin nebo aplikované po sklizni ochraňující skladované plodiny před houbovými patogeny. Dle funkce můžeme tyto přípravky rozčlenit na: a) protektivní fungicidy, které snižují vývoj patogenu (inhibují sporulaci či na povrchu rostliny utváří podmínky nežádoucí pro rozvoj patogenu) a b) kurativní, účinkují post-infekčně na rozšiřující se mycelium či post-symptomaticky, prostupují do spor a také do mycelia a potlačují patogena. Dle místa působení lze fungicidy rozdělit na systémové a kontaktní (Ballantyne 2004).

#### **3.3.1 Historie fungicidních přípravků**

Fungicidní přípravky jsou využívány k ochraně rostlin vůči houbovým patogenům už déle než 200 let. Ze začátku byly využívány zejména k ochraně vinné révy a semen obilnin, vývojem času se jejich využití rozvinulo na široké spektrum rostlinných druhů a jejich chorob. První organické fungicidy byly vynalezeny v roce 1934, poté následoval prudký rozmach chemických přípravků v boji vůči chorobám rostlin. Antibiotický griseofulvin byl následujícím milníkem na poli ochranných přípravků. Tato sloučenina nebyla v zemědělství nikdy významněji využita, avšak zaznamenala systémový účinek jako možný přístup k eliminaci chorob. Do šedesátých let 20. století byly proti padlí využívány multi-site inhibitory a protektanty (Hollomon & Wheeler 2002).

Přípravky zahrnující chinomethionát, dithiokarbamáty a síru byly častokrát používány, ale pouze na určité množství plodin. Použití těchto fungicidů bylo sníženo kvůli potřebné dlouhé prodlevě mezi aplikací a sklizní plodin, ale také kvůli potřebným vysokým dávkám na aplikaci a vysokými náklady, které vymezovaly aplikaci fungicidů pouze na velmi rentabilní plodiny. Na konci šedesátých a v průběhu sedmdesátých let se na trhu vyskytlo množství nových přípravků se systémovou účinností, například: benzimidazoly, fosforothioláty, 2- aminopyrimidiny, karboxanilidy, dikarboximidy, morfoliny, fenylamidy a inhibitory demethylace sterolu (DMI). V osmdesátých letech bylo uvedeno na trh určité množství triazolů, řadících se do kategorie DMI a také dva fungicidy z kategorie morfolinů, konkrétně fenpropimorph a fenpropidin. Poté v devadesátých letech bylo zavedeno mnoho nových látek začleněných v široce působících QoI fungicidech – strobiluriny (kupříkladu kresoxim-methyl, azoxystrobin) a anilinopyrimidiny (cyprodinil), potom zejména na padlí cílený spiroxamin a quinoxifen, který působí pouze vůči padlí, ale na rozsáhlé škále hostitelů (Brent & Hollomon 2007b). Použití systémových fungicidů navodilo celkové zlepšení produkce, jednak svojí účinností, které bylo dosaženo při nižších dávkách fungicidu, ale také cenovou přijatelností (Hollomon & Wheeler 2002).

### **3.3.2 Vývoj fungicidních přípravků a jejich uvedení do praxe**

Vývoj nových fungicidních přípravků a jejich uvádění do běžné praxe by měl být závislý na přísných kritériích. Fungicidy stále představují nezanedbatelnou zátěž pro životní prostředí. V posledních letech se obecně prosazuje snižování podílu rizikových a toxických látek. U nové generace přípravků na ochranu rostlin se rapidně snížilo dávkování na hektar. Novější druhy fungicidních přípravků jsou využívány povětšinou díky lepšímu působení, v poměrně nízkých množstvích, avšak to zpravidla nezaručuje jejich slabší dopad na životní prostředí a necílové organismy všeobecně (Brent & Hollomon 2007b).

Cílem by tudíž mělo být snížení dopadu přípravků na ochranu rostlin k životnímu prostředí na minimum. Jedna z hlavních zásad efektivního postupu v užívání přípravků na ochranu rostlin je také určení nebezpečí rezistence a zaevidování případů jejího počátku v zemědělské praxi. Prezentování účinných postupů ve výzkumu a rozvoji nových látek, je tudíž nepostradatelné pro prevenci rezistence (Russell 2002).

Případný nový přípravek je ověřován ve skleníku a laboratoři na rozličných druzích houbových patogenů (na pravých neselektovaných a rozmanitých populacích), následovně podléhá též polním experimentům, kdy je ověřován na velkém množství patogenů infikujících pěstované rostliny v rozličných regionech a zemích po čas určitého počtu sezón. Jestliže se ve všech výzkumech ukáže totožná účinnost vůči důležitým patogenům, jsou začleněny do následného průzkumu (následovná kontrola efektivity může být použita jako ukazatel možného rozvoje rezistence) a eventuálního zavedení na trh (Brent & Hollomon 2007a, b).

Registrace nového přípravku je pomalý proces. Před registrací nového fungicidu je stanovena primární úroveň sensitivity patogena k novému přípravku, která ukazuje určitou diverzitu v populaci patogena a zajišťuje měřítko pro zhodnocení následovných zpráv o omezené účinnosti fungicidu. Před registrací fungicidu k obchodnímu využití jsou též uskutečněny pokusy stanovující nezbytnou dávku přípravku. Dávka nového fungicidu stanovená pro registraci je nejnižší dávka zajišťující kontrolu při realizovaných zkouškách na účinnost přípravku. Nicméně nejnižší působivé množství fungicidu nemusí být nejpříznivější variantou pro oddálení vývoje rezistence (kvantitativní, viz výše v textu) u patogena, poněvadž může poskytnout přežití druhům se střední rezistencí (Russell 2002).

### **3.3.3 Rozdělení fungicidů**

#### **3.3.3.1 Kontaktní fungicidy**

Kontaktní fungicidy jsou nesystémové přípravky. Jsou z velké části určeny k preventivnímu použití, či jako dodatek k systémovým fungicidům. Aplikují se na povrch rostliny, kde rovnou účinkují na patogena a potlačují tak jeho vývoj před vstoupením do pletiva rostliny. Jsou charakterizovány jako takzvané multi-site fungicidy, které účinkují nespecificky na několika úsecích metabolismu patogena. Kontaktní fungicidy (kupříkladu dinocap, chlorothalonil) jsou méně sensitivní k vytvoření rezistence než systémové a translaminární fungicidy s charakteristickým způsobem účinku (McGrath 2001).

#### **3.3.3.2 Systémové fungicidy**

Přípravky s translaminární či se systémovou činností působí v jediném určitém bodě metabolické dráhy patogena, jsou též charakterizovány jako takzvané single-site fungicidy. K jejich rozšiřování v rámci rostlinného pletiva může docházet symplastickou cestou (obsahuje příjem a distribuci ze zdroje do sinku) či apoplastickou cestou (ovlivňováno difúzí a rychlostí transpirace) (Neumann & Jacob 1995).

Předností systémových přípravků je, že rostliny nemusejí být až tak pečlivě ošetřeny ve srovnání s kontaktními přípravky. Účinná látka systémového přípravku je rozmístována v rámci celé rostliny a je schopna umožnit ochranu vůči patogenu též v oblastech, které nebyly přímo zasaženy přípravkem. Díky systémovým fungicidům je tedy možné regulovat vývoj patogenů i na spodní straně listů (McGrath 2001). Protože je účinek systémových přípravků zaměřen jen na jediný určitý bod metabolické dráhy patogena, navyšuje se nebezpečí vzniku mutace, a tím i vytvoření rezistence. Systémové fungicidy jsou obecně tedy v mnohem větší míře náchylnější k vytvoření rezistence než nesystémové fungicidy (protektanty) (Brent & Hollomon 2007a).

### **3.3.4 Příklady chemických skupin používaných proti houbovým patogenům (včetně *P. infestans*) a jejich mechanismus působení**

Velké množství registrovaných konvenčních fungicidních přípravků, které jsou používány v běžné praxi, můžeme zařadit do těchto následujících kategorií: **MBC** fungicidy (methyl benzimidazol karbamáty); **DMI** fungicidy (inhibitory demethylace); **PA** fungicidy (fenylamidy); **CAA** fungicidy (amidy karboxylových kyselin); **QoI** fungicidy (inhibitory ubichinol oxidázy) (FRAC 2018).

#### **3.3.4.1 MBC – Methyl benzimidazol karbamáty**

Do této kategorie široce působících fungicidů se řadí dusíkaté heterocyklické sloučeniny odvozené od benzimidazolu či thiabendazolu. Primární mechanismus jejich působení je potlačení polymerizace mikrotubulů jejich připojením se na  $\beta$ -tubulin, eventuálně na odlišné formy tubulinu (Steffens et al 1996; Ballantyne 2004). V nedávných letech komerčně dosažitelné přípravky obsahovaly tyto aktivní látky – karbendazim, thiabendazol, benomyl, thiophanát-methyl, thiophanát a fuberidazol. U několika účinných látek z této kategorie byla nicméně zaznamenána rezistence u velkého množství houbových patogenů (Müller & Gisi 2012).

#### **3.3.4.2 QoI – Inhibitory ubichinol oxidázy**

QoI fungicidy s translaminární a systémovou činností potlačují mitochondriální respiraci zablokováním elektronového přenosu komplexem III, kde se poutají na takzvaný cílový úsek (místo), k b-typu cytochromu, nedaleko Qo centra. Zabraňují tedy proudění protonů, které jsou vytvářeny tímto komplexem a cytochrom c oxidázou, důsledkem této činnosti je snížená produkce ATP (Gisi et al. 2002; Gisi & Sierotzki 2015; Ma & Michailides 2005).

QoI fungicidy též potlačují klíčení spor. Ke QoI fungicidům se řadí tyto sloučeniny – azoxystrobin, fluoxastrobin, dimoxystrobin, famoxadon, enestroburin, fenamidon, kresoxim-methyl, oryastrobin, metominostrobin, pyribencarb, picoxystrobin, trifloxystrobin, pyraclostrobin. Azoxystrobin se řadí do chemické kategorie  $\beta$ -methoxyakrylátů, což jsou strobilurinové deriváty. Strobiluriny jsou látky, které jsou izolované z dřevokazných hub *Oudemansiiella mucida* – slizečka porcelánová a *Strobilurus tenacelus* – penízovka nahořklá, u kterých byla objevena tvorba látek, které jim umožňovaly eliminaci konkurenčních organismů v okolí. Na základě těchto látek byly poté vytvořeny účinné látky vůči velkému množství houbových patogenů (Knight et al. 1997).

#### 3.3.4.3 DMI – Inhibitory demethylace

Tato kategorie začleňuje dohromady čtyři skupiny fungicidů, ze kterých se tři skupiny využívají v zemědělství – aminy (kdysi pojmenované morpholiny), DMI fungicidy a hydroxy-anilidy. Účinné látky této kategorie zabraňují tvorbě ergosterolu u houbových mikroorganismů potlačením demethylace sterolů. Potlačení syntézy ergosterolu přispívá k strukturálnímu a funkčnímu poškození cytoplasmatické membrány. Dílčí skupiny se odlišují v určitých úsecích cílového místa působení. DMI fungicidy účinkují na sterol C 14-demethylázu (imidazoly, piperaziny, pyrimidiny, triazoly, pyridiny, triazolinthiony), aminy začleňují morpholiny, látky, které inhibují  $\Delta_{14}$  sterol reduktázu a spiroketalaminy a piperidiny s odlišnými způsoby účinku v následujících postupech biosyntézy sterolů. Třetí skupinou jsou hydroxyanilidy, které účinkují na 3-keto-reduktázu. Do této třídy se řadí účinná látka fenarimol (Hollomon & Wheeler 2002; FRAC 2018).

#### 3.3.4.4 Chloronitrily

Chlorothalonil, účinná látka této kategorie se vytváří halogenací různorodých substituo- vaných aromatických řetězců. Chlorothalonil je široce působící kontaktní fungicid, který zba- vuje buňky patogena o thiolové části, oslabuje tudíž glykolýzu a tvorbu energie. Do této sku- piny dříve spadala účinná látka dinocap; nyní se řadí do skupiny – dinitrophenyl-krotonáty, která je odvozená od dinitrofenolu, tato látka se řadí mezi kontaktní fungicidy s protektivním a kurativním způsobem účinku (Ballantyne 2004; FRAC 2018).

#### 3.3.4.5 PA – Fenylamidy

Mezi lety 1977 a 2007 bylo zavedeno sedm fenylamidových molekul: metalaxyl a benalaxyl, včetně odpovídajících aktivních isomerů (mefenoxam = metalaxyl-M a kiralaxyl = benalaxyl-M) oxadixyl, furalaxyl a ofurace, přičemž poslední dvě byly staženy z trhu (Hermann & Gisi 2012). Fenylamidy inhibují polymerizaci při biosyntéze ribozomální RNA u třídy Oomycetes (Fischer & Hayes 1982).

Davidse (1995) uvádí u *Phytophthora megasperma*, že metalaxyl inhibuje RNA polymerázu I, která je zodpovědná za syntézu rRNA. Fenylamidy inhibují několik životních stadií u Oomycetes, zejména růst hyf, haustorií a sporangií, zatímco žádný účinek na uvolňování zoospor nebo pohyblivost a klíčení spor nebyl zpozorován (Schwinn & Staub 1995). Fenylamidy jsou vnitřně vysoce aktivní a specificky regulují rostlinné patogeny v rámci Oomycetes, včetně patogenů *Perenosporales* a *Sclerosporales*, stejně jako většiny zástupců *Pythiales*, a také *Saprolegniales* (Gisi 2002).

Dlouhodobá preventivní a široká účinnost k Oomycetes (včetně patogenů semen a organismů žijících v půdě, jako je *Pythium* a *Phytophthora* ssp.), vysoká pohyblivost v rostlinách, kurativní potenciál a vynikající bezpečnost plodin činí z fenylamidů cenný nástroj pro léčbu chorob u mnoha plodin (Müller & Gisi 2012). Jsou používány většinou ve směsi s multi-site (více míst účinku) fungicidy nebo nesouvisejícími single-site (jedno místo účinku) inhibitory k rozšíření spektra účinnosti nad rámec Oomycetes a ke zvládnutí vývoje rezistence (Gisi & Sierotzki 2015).

#### 3.3.4.6 CAA – Amidy karboxylových kyselin

Fungicidy amidových karboxylových kyselin zahrnují tři podtřídy – amidy kyseliny skořicové (dimethomorph, fluoromorph, pyrimorph), valinamid karbamáty (benthiavalicarb, iprovalicarb, valiphenalate) a amidy kyseliny mandlové (mandipropamid) (Gisi et al. 2012).

Fungicidy amidových karboxylových kyselin vykazují specifickou aktivitu vůči většině zástupců Oomycetes, včetně patogenů *Perenosporales* a několika druhů *Phytophthora* na mnoha plodinách, jako jsou brambory, rajčata, pepř a ananas. Nedávné studie provedené s mandipropamidem přispěly k objasnění způsobu působení fungicidů amidových karboxylových kyselin u *P. infestans* (Gisi & Sierotzki 2015).



Inkorporace <sup>14</sup>C-značené glukózy do frakce  $\beta$ -1,4 glukanu (celulózy) buněčných stěn klíčivých spor je inhibována v přítomnosti mandipropamidu (Blum et al. 2010a). Sekvenování genů uměle vytvořených mutantů *P. infestans*, které byly rezistentní vůči mandipropamidu, odhalilo aminokyselinovou substituci v syntéze celulózy, *CesA3* genu v pozici 1105 z glycinu na alanin nebo valin G1105A/V (Gisi & Sierotzki 2015). Kromě toho, transformace a exprese mutované *CesA3* alely v citlivém izolátu *P. infestans* vedla k rezistentnímu fenotypu vůči amidovým karboxylovým kyselinám (Blum et al. 2010a). Celulóza-syntáza tedy může být stanovena jako primární cílový enzym pro aktivitu amidové karboxylové kyseliny (Gisi & Sierotzki 2015).

### 3.3.5 Přípravky proti plísni bramborové – (*Phytophthora infestans*)

V této podkapitole je uvedený aktuální seznam (k 7.2.2019) všech dostupných chemických a biologických fungicidních přípravků a jejich účinných látek na ochranu proti plísni bramboru, jejímž původcem je oomyceta *Phytophthora infestans*, veškeré níže uvedené informace (v této podkapitole) jsou citovány z (Rostlinolékařský portál 2019).

#### Mechanismus působení:

- (K) – kontaktní
- (CS) – částečně systémový
- (S) – systémový

#### Název přípravku – účinná(é) látka(y)

- Acrobat MZ WG – *Dimethomorph* (CS), *Mankozeb* (K)
- Airone SC – *Hydroxid měďnatý* (K), *Oxichlorid měďnatý* (K)
- Altima 500 SC – *Fluazinam* (S)
- Antre 70 WG – *Propineb* (K)
- Badge WG – *Hydroxid měďnatý* (K), *Oxichlorid měďnatý* (K)
- Banjo Forte – *Dimethomorph* (CS), *Fluazinam* (S)
- Banko 500 SC – *Chlorthalonil* (K)
- Carial Flex – *Cymoxanil* (CS), *Mandipropamid* (K,CS)
- Cobran – *Hydroxid měďnatý* (K)
- Consento – *Fenamidon* (S), *Propamocarb-hydrochlorid* (S)
- Coprantol Duo – *Hydroxid měďnatý* (K), *Oxichlorid měďnatý* (K)

- Criterium – *Benalaxyl (S), Mankozeb (K)*
- Cuproxat SC – *Síran měďnatý zásaditý*
- Cuprozin Progress – *Hydroxid měďnatý (K)*
- Curzate Gold – *Cymoxanil (CS), Mankozeb (K)*
- Curzate M WG – *Cymoxanil (CS), Mankozeb (K)*
- Cymbal – *Cymoxanil (CS)*
- Cymbal Flow – *Cymoxanil (CS)*
- Danso Flow – *Cymoxanil (CS)*
- Dauphin 45 – *Cymoxanil (CS)*
- Defender – *Hydroxid měďnatý (K)*
- Defender Dry – *Hydroxid měďnatý (K)*
- Dithane DG Neotec – *Mankozeb (K)*
- Dithane M 45 – *Mankozeb (K)*
- Drum Flow – *Cymoxanil (CS)*
- Emendo M – *Mankozeb (K), valifenalát (S)*
- Filder 69 WG – *Dimethomorph (CS), Mankozeb (K)*
- Flowbrix – *Oxichlorid měďnatý (K)*
- Fortuna Gold – *Cymoxanil (CS), Mankozeb (K)*
- Frowncide – *Fluazinam (S)*
- FUDAN GOLD – *Cymoxanil (CS), Mankozeb (K)*
- Funguran progress – *Hydroxid měďnatý (K)*
- Galben M – *Benalaxyl (S), Mankozeb (K)*
- Grecale – *Cymoxanil (CS), Fluazinam (S)*
- Green Doctor – *Pythium oligandrum M1*
- Grifon SC – *Hydroxid měďnatý (K), Oxichlorid měďnatý (K)*
- Champion 50 WG – *Hydroxid měďnatý (K)*
- Infinito – *Fluopikolid (S), Propamocarb-hydrochlorid (S)*
- Kopřiva – *Kopřiva*
- Kunshi – *Cymoxanil (CS), Fluazinam (S)*
- Kupfer Fusilan WG – *Cymoxanil (CS), Oxichlorid měďnatý (K)*
- Kuprikol 250 SC – *Oxichlorid měďnatý (K)*
- Kuprikol 50 – *Oxichlorid měďnatý (K)*
- Leimay – *Amisulbrom*
- Lieto – *Cymoxanil (CS), Zoxamid (K)*

- Manfil 75 WG – *Mankozeb (K)*
- Manfil 80 WP – *Mankozeb (K)*
- Manzate 75 WG – *Mankozeb (K)*
- Mastana SC – *Mankozeb (K)*
- Mixanil – *Chlorthalonil (K), Cymoxanil (CS)*
- Moonlight – *Amisulbrom, Mankozeb (K)*
- Moximate 725 WG – *Cymoxanil (CS), Mankozeb (K)*
- Moximate 725 WP – *Cymoxanil (CS), Mankozeb (K)*
- Nando 500 SC – *Fluazinam (S)*
- Nautile DG – *Cymoxanil (CS), Mankozeb (K)*
- Ohayo – *Fluazinam (S)*
- Omix Duo – *Cymoxanil (CS), Propamocarb-hydrochlorid (S)*
- Penncozeb 75 DG – *Mankozeb (K)*
- Polydresser – *Pythium oligandrum M1*
- Polygandron WP – *Pythium oligandrum M1*
- Polyram WG – *Metiram (K)*
- Polyversum – *Pythium oligandrum M1*
- Polyversum-Biogarden – *Pythium oligandrum M1*
- Polyversum-Polygandron – *Pythium oligandrum M1*
- Presidium – *Dimethomorph (CS), Zoxamid (K)*
- Profilux – *Cymoxanil (CS), Mankozeb (K)*
- PROXANIL – *Cymoxanil (CS), Propamocarb-hydrochlorid (S)*
- Ranman Top – *Kyazofamid (K)*
- Revus – *Mandipropamid (K,CS)*
- Revus MZ – *Mandipropamid (K,CS), Mankozeb (K)*
- Revus Top – *Difenokonazol (S), Mandipropamid (K,CS)*
- Ridomil Gold MZ Pepite – *Mankozeb (K), Metalaxyl-M (S)*
- Rival Duo – *Cymoxanil (CS), Propamocarb-hydrochlorid (S)*
- Sacron WG – *Cymoxanil (CS)*
- Sanblite – *Amisulbron, Mankozeb (K)*
- Tanos 50 WG – *Cymoxanil (CS), Famoxadon (K)*
- Trimanoc DG – *Mankozeb (K)*
- Valbon – *Benthiavalikarb (S), Mankozeb (K)*
- Valis M – *Mankozeb (K), valifenalát (S)*

- Vendetta – *Azoxystrobin (S), Fluazinam (S)*
- Versilus – *Benthiavalikarb (S)*
- Winby – *Fluazinam (S)*
- Zampro Duo – *Ametoktradin (K), Mankozeb (K)*
- Signal 500 SC – *Fluazinam (S)*
- Zorvec Enicade – *Oxathiapiprolin (S)*

## 4 Materiál a Metody

### 4.1 Sběr vzorků pro izolaci patogena *P. infestans*

V roce 2016 v průběhu vegetačního období hostitelských rostlin *P. infestans* a výskytu příznaků plísně bramboru v porostu byly odebírány vzorky z infikovaných natí rostlin bramboru a rajčete. Sběr vzorků z rostlin bramboru byl soustředěn převážně na hlavní oblasti pěstování brambor, tedy na pozemky velkopěstitelů, drobných pěstitelů, výzkumných stanic, odrůdových zkušeben, ale i na soukromé zahrádky. Sběr vzorků v roce 2016 byl proveden na polích velkopěstitelů, odrůdových zkušeben a výzkumných stanic podle odrůdového zastoupení brambor. Z každé odrůdy infikované rostliny bramboru byly odebrány přibližně tři vzorky lichožpeřených listů nebo stonků (lodyh) s příznaky. Z pozemků drobných pěstitelů a soukromých zahrad byla pletiva odebírána z individuálních rostlin. Infikovaná pletiva rajčete (listy a stonky) byla získána ze soukromé zahrady rovněž z individuálních rostlin. Vzorky byly umístěny do mikrotenových sáčků, označeny datem sběru, odrůdou a ihned po převozu zpracovány nebo ponechány v ledničce k pozdějšímu využití.

### 4.2 Izolace patogena *P. infestans*

Jednotlivé části pletiva s lézemi (list, část stonku bramboru, případně list, část stonku rajčete) byly umístěny do vlhké komůrky. K tomuto účelu byly použity skleněné Petriho misky (průměr 90 mm) s třemi vrstvami navlhčeného filtračního papíru. Infikovaná pletiva v Petriho miskách byla inkubována při teplotě 16,5 °C, což podpořilo sporulaci patogena a usnadnilo tak následnou izolaci patogena na živnou půdu. Pomocí injekční jehly ožehnuté nad plamenem, na jejíž špičce bylo zachyceno malé množství agarů, byla přenesena jednotlivá sporangia na živnou půdu. Po nárůstu mycelia byl patogen přeočkován pomocí výřezů (5 × 5 mm) agarů s myceliem na novou živnou půdu a tímto způsobem namnožen v dostatečném množství pro testy citlivosti k fungicidním látkám.

### 4.3 Živné médium

Pro izolaci a následnou kultivaci *P. infestans* byly použity plastové Petriho misky o velikosti 60 mm a bylo využito toto živné médium:

### **Žitný agar A (1 l):**

Navážka 60 g žitných obilek byla desinfikována v 70 % ethanolu a 20 % Savu, promyta vodou a umístěna na misku a zalita dostatečným množstvím dH<sub>2</sub>O (destilované vody) tak, aby obilky byly částečně ponořeny a mohly klíčit. Po 36 hodinách byla tekutina z obilek slita a uchována pro pozdější použití. Obilky byly rozmělněny v 350 ml dH<sub>2</sub>O pomocí stolního mixeru a inkubovány 3 hodiny při 50 °C ve vodní lázni. Po inkubaci byly rozmělněné obilky filtrovány přes dvě vrstvy gázy, k filtrátu byla přidána uchovaná tekutina a množství doplněno dH<sub>2</sub>O na objem 1 l. Filtrát byl kompletován s 20 g sacharózy a 15 g agaru. Agar byl sterilizován v autoklávu 20 minut při 121 °C a rozlit do Petriho misek.

## **4.4 Stanovení rezistence (citlivosti) k fungicidním látkám**

Pro testy stanovení rezistence a citlivosti k částečně systémovému a systémovým fungicidům byly zvoleny tyto účinné látky:

**Dimethomorph** – částečně systémová účinná látka

**Metalaxyl-M** – systémová účinná látka

**Propamocarb-hydrochlorid** – systémová účinná látka

Účinné látky byly připraveny jako zásobní roztoky rozpuštěním technické látky DMSO (dimethylsulfoxid). Účinné látky dimethomorph, metalaxyl-M a propamocarb-hydrochlorid byly zakoupeny (Sigma-Aldrich).

## **4.5 *In vitro* test rezistence na agaru**

Bylo vytvořeno šest rozdílných koncentrací (**včetně kontroly**) metalaxylu-M v µg na ml žitného agaru A (**0**; 0,1; 1; 5; 10 a 100), čtyři rozdílné koncentrace dimethomorphu (**0**; 0,1; 1 a 10) a pět rozdílných koncentrací propamocarb-hydrochloridu (**0**; 0,1; 1; 10 a 100). Pro každou variantu byl sterilním korkovrtem vyříznut disk agaru (9 mm) s myceliem testovaného dva týdny starého izolátu a ten vložen do středu Petriho misky s živnou půdou. Všechny Petriho misky byly po obvodu 2× obvázány netoxickou krycí fólií (Parafilm), aby nepronikly nežádoucí mikroorganismy (například roztoči) do misek a nedošlo následně k jejich kontaminaci. Inokulace patogena *P. infestans* probíhala ve sterilním laboratorním zařízení „Flowbox“, který byl během inokulování pravidelně sterilizován koncentrovaným ethanolem. Přibližně po deseti dnech inkubace při 15–18 °C byl změřen posuvným měřítkem růst kolonie ve dvou rozměrech

na sebe kolmých. Průměr obou rozměrů kolonií patogena u variant s obsahem účinné látky byl vztažen k průměru růstové zóny kontroly (0 µg/ml). Test byl proveden ve třech opakováních. Pro posouzení reakce patogena k účinné látce metalaxyl-M byl rozhodující růst při nejvyšší koncentraci 100 µg/ml a koncentraci 5 µg/ml a izoláty byly hodnoceny takto (Therrien et al. 1993):

**Sensitivní izolát:** < 40 % růstu kontroly na koncentracích 5 a 100 µg/ml

**Intermediární izolát:** > 40 % růstu kontroly na koncentraci 5 µg/ml a < 40 % růstu kontroly na koncentraci 100 µg/ml

**Rezistentní izolát:** > 40 % růstu kontroly na koncentracích 5 a 100 µg/ml

Jelikož pro účinné látky dimethomorph a propamocarb-hydrochlorid neexistuje obdobná klasifikace izolátů do jednotlivých skupin, pro jednotlivé izoláty byla stanovena EC<sub>50</sub> dimethomorphu a propamocarb-hydrochloridu. V tomto případě EC<sub>50</sub> je koncentrace účinné látky, která inhibuje růst mycelia z 50 %. EC<sub>50</sub> byla vypočítána pomocí regresní analýzy probitu procenta inhibice růstu ku logaritmu koncentrace fungicidní látky. EC<sub>50</sub> byla rovněž stanovena pro metalaxyl-M.

## 5 Výsledky

### 5.1 Sběr a izolace *P. infestans*

Laboratorní pokus probíhal na konci roku 2016 a pro testy rezistence bylo získáno celkem 100 *P. infestans* izolátů, které pocházeli z těchto 10 lokalit (Malý Bor; Domanínek; Praha-Suchdol; Lukavec; Želiv; Lípa; Valečov (Okrouhlice); Veselý Žďár; Velhartice a Únětice) a 4 krajů (Středočeský; Plzeňský; Vysočina a Praha).

### 5.2 Testy rezistence (citlivosti) k vybraným fungicidním látkám

V rámci experimentu byla testována rezistence (citlivost) patogena *P. infestans* k těmto účinným fungicidním látkám – metalaxyl-M, propamocarb-hydrochlorid a dimethomorph. Níže (v Tabulce 1) je vyhodnocena citlivost izolátů k látce metalaxyl-M dle (Therrien et al. 1993) a pod Tabulkou 1 jsou dále (v grafech 1 a 2) uvedeny EC<sub>50</sub> pro látky metalaxyl-M a propamocarb-hydrochlorid.

#### 5.2.1 Metalaxyl-M

V souboru izolátů *P. infestans* bylo zjištěno, že 76 % izolátů bylo citlivých, 16 % intermediárních a pouze 8 % bylo rezistentních. Rezistentní izoláty pocházely jen ze 3 lokalit (Želiv; Lípa a Velhartice) a 2 krajů (Plzeňský a Vysočina).

**Tabulka 1.** Původ a charakteristika izolátů *Phytophthora infestans* hodnocených na citlivost k účinné látce metalaxyl-M.

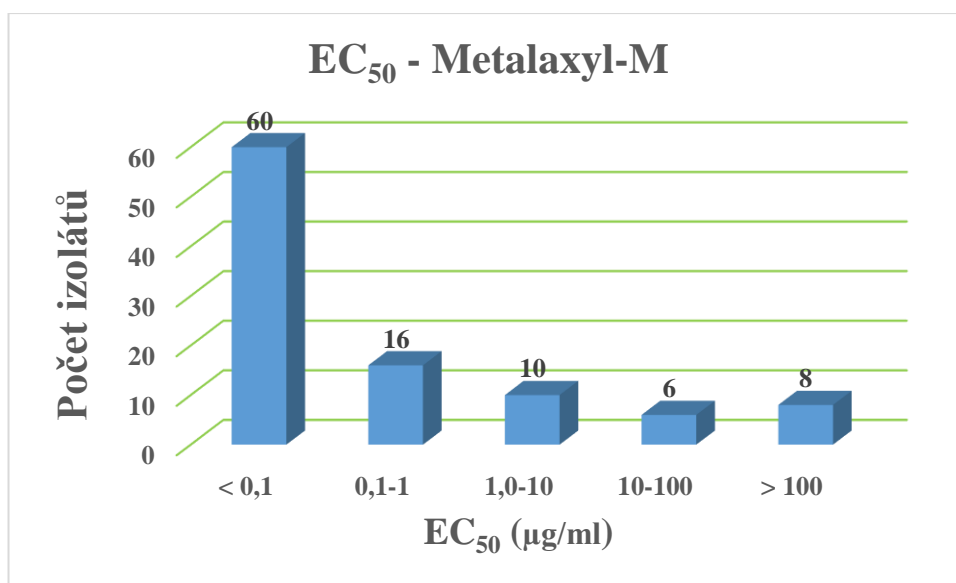
Celkový počet izolátů: 100		Počet izolátů			
Lokalita	Kraj	citlivé	intermediární	rezistentní	testované izoláty
Malý Bor	Plzeňský	12	2	-	14
Domanínek	Vysočina	14	-	-	14
Praha-Suchdol	Praha	3	-	-	3
Lukavec	Vysočina	8	-	-	8
Želiv	Vysočina	6	-	1	7
Lípa	Vysočina	10	-	1	11
Valečov (Okrouhlice)	Vysočina	16	13	-	29
Veselý Žďár	Vysočina	1	-	-	1
Velhartice	Plzeňský	-	1	6	7
Únětice	Středočeský	6*	-	-	6

\* Izoláty odebírané z rajčat.



V Tabulce 1 lze spatřit, že citlivé izoláty byly zjištěny ve všech krajích (Středočeský, Plzeňský, Vysočina a Praha) a téměř u veškerých lokalit (kromě obce Velhartice). Intermediární izoláty byly nalezeny zejména v obci Valečov (Okrouhlice) na Vysočině odkud pocházelo 13 z 16 izolátů. Z Tabulky 1 je dále zřejmé, že rezistentní izoláty byly zjištěny především v Plzeňském kraji v obci Velhartice, kde bylo nalezeno 6 rezistentních izolátů z celkových 8, je tedy patrné, že problém s rezistencí patogena *Phytophthora infestans* vůči účinné látce metalaxyl-M byl v roce 2016 zejména v této lokalitě.

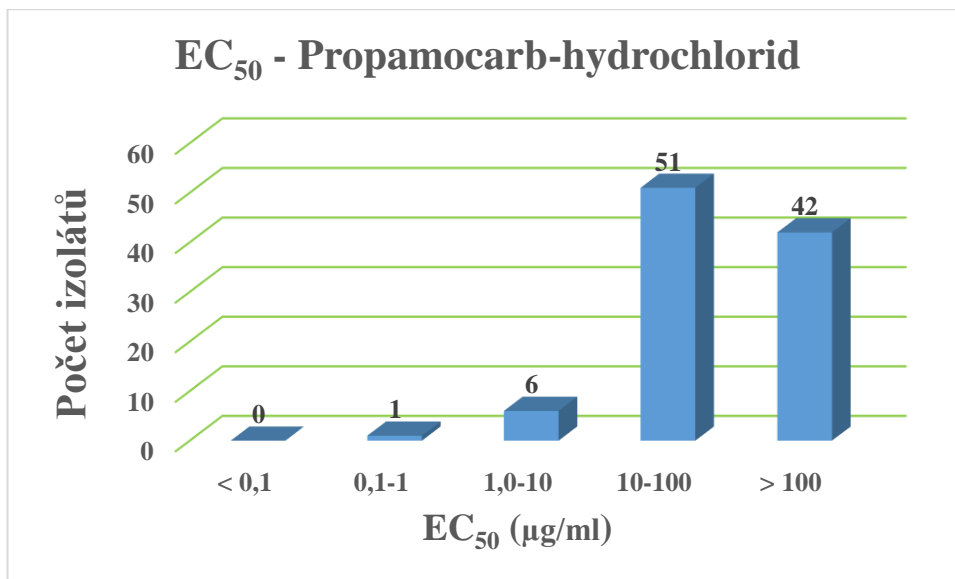
**Graf 1.** EC<sub>50</sub> – metalaxyl-M



Z Grafu 1 vyplývá, že už při nejslabší koncentraci < 0,1 (µg/ml) docházelo u nad poloviny izolátů (konkrétně 60) k 50 % inhibici růstu mycelia, dále je z grafu 2 patrné (zajímavé), že pouze 8 izolátů bylo inhibováno při nejvyšší koncentraci > 100 (µg/ml.) V **Příloze I** je uveden podrobný přehled všech testovaných izolátů k účinné látce metalaxyl-M.

### 5.2.2 Propamocarb-hydrochlorid

Graf 2. EC<sub>50</sub> – propamocarb-hydrochlorid



U Grafu 2 můžeme vidět opačné, významně odlišné výsledky než u předchozího Grafu 1, u nejnižší koncentrace < 0,1 (µg/ml) nebyl inhibován z 50 % žádný izolát a při koncentraci 0,1–1 (µg/ml) byl inhibován pouze 1 izolát. Dále je z Grafu 2 patrné, že téměř u veškerých izolátů (přesněji 93) docházelo k 50 % inhibici růstu mycelia až při vysokých koncentracích 10–100; > 100 (µg/ml.) V **Příloze II** jsou podrobně uvedeny všechny testované izoláty k účinné látce propamocarb-hydrochlorid.

### 5.2.3 Dimethomorph

U účinné látky dimethomorph nejsou níže uvedeny podrobné výsledky, protože všechny izoláty byly citlivé a nebyl u nich zaznamenán růst mycelia ani při nejnižší koncentraci 0,1 (µg/ml).

## 6 Diskuse

V současné době, v ochraně rostlin je rezistence (odolnost) patogenů k fungicidním látkám a přípravkům velmi závažným problémem, s kterým se s postupem času stále více setkáváme, a tudíž dle mého názoru se domnívám, že by této problematice měla být věnována vyšší pozornost, zejména v řadách profesionálních pěstitelů.

Na výše zmíněnou problematiku navazuje praktická část této diplomové práce, kde byla posouzena a vyhodnocena rezistence patogena *Phytophthora infestans* k fungicidním účinným látkám – metalaxyl-M, propamocarb-hydrochlorid a dimethomorph.

K účinné látce metalaxyl-M bylo 76 % izolátů hodnoceno jako citlivé, 16 % bylo intermediárních – přitom 13 % jich pocházelo z oblasti Valečov (Okrouhlice) na Vysočině a pouze 8 % izolátů bylo rezistentních, z nichž 6 % bylo zjištěno v Plzeňském kraji v lokalitě Velhartice. Ze zmíněných informací je tedy patrné, že problém s rezistencí patogena *P. infestans* byl v roce 2016 především v obci Velhartice, důvodem tohoto problému může být například nedodržování antirezistentních strategií, kupříkladu používání přípravků ze stejné skupiny, které mají totožnou účinnou látku a stejný mechanismus účinku, nebo využívání pouze jednoho přípravku v pravidelných intervalech, dále by tento problém mohl být zapříčiněn nedodržováním předepsaných dávek, tedy takzvané „předávkování“ nebo „poddávkování“. Mazáková et al. (2018) testovali mezi lety 2012–2014 u izolátů, které pocházely z lokalit Valečov (Okrouhlice) a Veselý Žďár rovněž rezistenci/citlivost patogena *P. infestans* k účinné látce metalaxyl-M a ve svých pokusech uvádějí, že v roce 2012 bylo ve Valečově (Okrouhlice) testováno celkem 10 izolátů, z nichž 4 byly citlivé a 6 intermediárních a ve Veselém Žďáru byly testovány jen 2 izoláty, přičemž 1 byl citlivý a 1 intermediární. V roce 2013 bylo v rámci lokality Valečov (Okrouhlice) testováno 15 izolátů, z kterých bylo 7 citlivých, 4 intermediární a 4 rezistentní a dále bylo testováno celkem 8 izolátů (Veselý Žďár) a nebyl zde zjištěn žádný intermediární, ani rezistentní izolát, tedy všechny izoláty byly citlivé. V posledním roce 2014 bylo testováno celkem 11 izolátů pocházejících z oblasti Valečov (Okrouhlice), z nichž 10 bylo citlivých a jen 1 rezistentní a z Veselého Žďáru byl v tomto roce získán a testován pouze 1 izolát, který byl citlivý. Pokud porovnáme výsledky, které uvádějí Mazáková et al. (2018) s Tabulkou 1, která je uvedena v experimentální části této diplomové práce (kapitola Výsledky), tak lze konstatovat, že v lokalitách Valečov (Okrouhlice) a Veselý Žďár nebyly zjištěny v roce 2012 a 2016 žádné rezistentní izoláty, ve Veselém Žďáru nebyl nalezen rezistentní izolát ani v roce 2013. V roce 2014 nebyl v oblasti Valečov (Okrouhlice) nalezen žádný intermediární izolát, přičemž

o 2 roky později v roce 2016 zde bylo zjištěno 13 intermediárních izolátů, je tedy zřejmé že, v této lokalitě došlo k výraznému navýšení intermediárních izolátů. Z veškerých uvedených údajů je patrné, že výsledky z let 2012–2014 a 2016 jsou velmi rozdílné a je důležité říci, že tato variabilita může být způsobována nepříznivými podmínkami, které omezují šíření a vývoj infekce a také rezistentních kmenů. Výrazně vyšší procentuální zastoupení rezistentních izolátů (oproti roku 2016) u látky metalaxyl-M zjistili v České republice Mazáková et al. (2011) v roce 2003 (58 %), následně v roce 2008 (29 %) a poté v roce 2009 (31 %).

Téměř u veškerých izolátů, které byly testovány k účinné látce propamocarb-hydrochlorid docházelo k 50 % inhibici růstu mycelia mezi koncentracemi 10–100 a > 100 ( $\mu\text{g/ml}$ ), podobné výsledky u této látky zjistili v roce 2012 Mazáková et al. (2018), dále tito autoři ve svých pokusech uvádějí, že mezi lety 2013–2014 docházelo k 50 % inhibici růstu mycelia u výrazné většiny izolátů při koncentraci > 100 ( $\mu\text{g/ml}$ ), respektive v roce 2014 bylo inhibováno téměř 100 % izolátů. Izoláty, které byly testovány v praktické části této práce, nemohly být obdobně klasifikovány jako izoláty s látkou metalaxyl-M, protože pro tuto látku nejsou přesně definované koncentrace, které rozdělují izoláty na citlivé, intermediární a rezistentní, toto platí i u účinné látky dimethomorph, proto u těchto dvou látek byla stanovena pouze  $\text{EC}_{50}$ . Ovšem Möller et al. (2009) ve svých pokusech stanovili pro  $\text{EC}_{50}$  – propamocarb-hydrochlorid toto klasifikační schéma:  $\leq 100$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) (citlivý izolát), 100–1000 ( $\mu\text{g/ml}$ ) (intermediární) a  $\text{EC}_{50} \geq 1000$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) (rezistentní). V Německu, podle této klasifikace Möller et al. (2009) uvádějí, že v roce 1999 bylo zjištěno 8 % izolátů citlivých, 82 % intermediárních a 10 % izolátů bylo rezistentních. Pokud bychom použili toto klasifikační schéma na pokus, který je uveden v praktické části této diplomové práce, pak by bylo u látky propamocarb-hydrochlorid 58 % izolátů citlivých, 31 % intermediárních a 11 % izolátů rezistentních, z výše zmíněných údajů lze tedy konstatovat, že procentuální zastoupení citlivých a intermediárních izolátů (v Německu a České republice) je velmi odlišné a výrazné, zatímco počet rezistentních izolátů je téměř totožný.

Účinná látka dimethomorph vykazovala nejlepší účinnost proti patogenu *P. infestans* v porovnání s účinnými látkami metalaxyl-M a propamocarb-hydrochlorid. K této látce nebyl zjištěn žádný intermediární a rezistentní izolát a k 100 % inhibici růstu mycelia docházelo už při nejslabší koncentraci < 0,1 ( $\mu\text{g/ml}$ ). Stejně výsledky ve svých pokusech mezi lety 2003–2008 také zjistili Mazáková et al. (2011), dále tyto výsledky jsou rovněž v souladu se studiemi (Zhang et al. 2005; Elansky 2007; Zhu et al. 2008), které také nezjistili u látky dimethomorph žádný rezistentní izolát patogena *P. infestans*. Můžeme tedy konstatovat, že tato látka má v ochraně rostlin stále velký význam.

Na základě, již zmíněných údajů byla hypotéza u účinných látek metalaxyl-M a pro-pamocarb-hydrochlorid potvrzena, zatímco u účinné látky dimethomorph byla hypotéza zamít-nuta.

## 7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo u izolátů *Phytophthora infestans* získaných z různých lokalit pěstování bramboru testovat jejich reakci k vybraným účinným fungicidním látkám (dimethomorph, propamocarb-hydrochlorid a metalaxyl-M), které jsou běžně aplikovány při ochraně brambor proti plísni bramboru.

Účinná látka dimethomorph vykazovala nejlepší účinnost ze všech testovaných látek. K této látce byly všechny izoláty citlivé a nebyl u nich zaznamenán růst mycelia ani při nejnižší koncentraci  $< 0,1$  ( $\mu\text{g/ml}$ ), hypotéza byla tedy u této látky zamítnuta.

U izolátů, které byly testovány k účinné látce propamocarb-hydrochlorid docházelo k 50 % inhibici růstu mycelia až při vyšších koncentracích, 51 % izolátů bylo inhibováno mezi koncentracemi 10-100 ( $\mu\text{g/ml}$ ) a 42 % izolátů bylo inhibováno při koncentraci  $> 100$  ( $\mu\text{g/ml}$ ). Pokud bychom použili pro hodnocení izolátů stejné klasifikační schéma, které uvádějí Möller et al. (2009) pro  $\text{EC}_{50}$  – propamocarb-hydrochlorid, viz Diskuse, pak bychom mohli konstatovat, že 58 % izolátů bylo citlivých, 31 % intermediárních a 11 % rezistentních a na základě tohoto hodnocení izolátů by byla u této látky hypotéza potvrzena.

K účinné látce metalaxyl-M bylo zjištěno 76 % izolátů citlivých, 16 % intermediárních a 8 % rezistentních, hypotéza byla tedy u této látky potvrzena. Citlivé izoláty byly zjištěny ve všech krajích (Středočeský, Plzeňský, Vysočina a Praha) a téměř u veškerých lokalit (kromě obce Velhartice). Intermediární izoláty byly objeveny zejména v oblasti Valečov (Okrouhlice) na Vysočině odkud pocházelo 13 % izolátů. Rezistentní izoláty byly zjištěny především v Plzeňském kraji v lokalitě Velhartice, kde bylo nalezeno 6 % rezistentních izolátů z celkových 8 %, lze tedy konstatovat, že problém s rezistencí patogena *Phytophthora infestans* vůči účinné látce metalaxyl-M byl v roce 2016 je zejména v této lokalitě.

Rezistence patogena *Phytophthora infestans* k fungicidním látkám představuje závažný problém nejen v České republice, ale také v jiných evropských státech, například v Německu, Polsku, Francii a dalších zemích, příčinou tohoto problému může být například nedodržování antirezistentních strategií, kupříkladu používání přípravků ze stejné skupiny, které mají totožnou účinnou látku a stejný mechanismus účinku, nebo využívání pouze jednoho přípravku v pravidelných intervalech, dále by tento problém mohl být zapříčiněn nedodržováním předepsaných dávek, tedy takzvané „předávkování“ nebo „poddávkování“.

V současné době zatím neexistují nechemické metody s významnou účinností proti plísni bramboru, ale aby došlo alespoň k částečnému snížení pravděpodobnosti vzniku rezistence, je důležité využívat odrůdy brambor, které mají vysokou odolnost vůči této chorobě a dále dodržovat preventivní pěstitelská opatření, tedy včasné odstranění natě a časté střídání fungicidních přípravků, které mají odlišné účinné látky a rozdílný mechanismus účinku.

## 8 Seznam použité literatury

- Andrison D. 1996. The origin of *Phytophthora infestans* populations present in Europe in the 1840s: a critical review of historical and scientific evidence. *Plant Pathology* **45**: 1027-1035.
- Agrios GN. 1997. *Plant Pathology*, Fourth edition. Academic Press. San Diego.
- Andersson B. 2007. Sexual reproduction in *Phytophthora infestans* – epidemiological consequences [Doctoral thesis]. Swedish University of Agriculture Sciences, Uppsala.
- Andrade-Piedra JL, Forbes GA, Shtienberg D, Grünwald NJ, Chacón MG, Taïpe MV, Fry WE. 2005. Qualification of a plant disease simulation model: Performance of the LATE-BLIGHT model across a broad range of environments. *Phytopathology* **95**: 1412-1422.
- Ballantyne B. 2004. Toxicology of fungicides. Pages 193-303 in Marrs TC, Ballantyne B, editors. *Pesticide Toxicology and International Regulation*. Wiley, England.
- Blum M, Boehler M, Randall E, Young V, Csukai M, Kraus S, Moulin F, Scalliet G, Avrova AO, Whisson SC, Fonné-Pfister R. 2010a. Mandipropamid targets the cellulose synthase-like PiCesA3 to inhibit cell wall biosynthesis in the oomycote plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology* **11**: 227-243.
- Bosch van den F, Gilligan ChA. 2008. Models of fungicide resistance dynamics. *Annual Review of Phytopathology* **46**: 123-147.
- Brent KJ, Hollomon DW. 2007a. Fungicide resistance: The assessment of risk. 2 second, (revised) edition. Fungicide Resistance Action Committee, United Kingdom.
- Brent KJ, Hollomon DW. 2007b. Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed?, 2 second, (revised) edition. Fungicide Resistance Action Committee, Brussels.
- Brown JKM. 2002. Comparative genetics of avirulence and fungicide resistance in the powdery mildew fungi. Pages 56-65 in Bélanger RR, Bushnell WR, Dik AJ, Carver LW, editors. *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise*. APS Press, St. Paul.
- Cooke DEL, Young V, Birch PRJ, Toth R, Gourelay F, Day JP, Carnegie SF, Duncan JM. 2003. Phenotypic and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* populations in Scotland (1995 – 97). *Plant Pathology* **52**: 181-192.



- Čepl J, Čížek M, Doležal P, Domkářová J, Hamouz K, Hausvater E, Kasal P, Lachman J, Ra-socha V, Urbancová M, Vokál B. 2009. Konzumní brambory na poli, zahradě a v ku-chyni. Výzkumný ústav bramborářský, Havlíčkův Brod.
- Davidse LC. 1988. Phenylamide fungicides: mechanism of Action and resistance. Pages 63-65 in Delp CJ, editor. Fungicide resistance in North America. APS Press, St. Paul.
- Davidse LC. 1995. Phenylamide fungicides: biochemical Action and resistance. Pages 347-354 in Lyr H, editor. Modern selective fungicides, 2 second edition. Gustav Fischer, Jena.
- Drenth A, Janssen EM, Govers F. 1995. Formation and survival of oospores of *Phytophthora infestans* under natural conditions. Plant pathology **44**: 86-94.
- Elansky SN, Apryshko VP, Milyutina DI, Kozlovsky BE. 2007. Resistance of Russian strains of *Phytophthora infestans* to fungicides Metalaxyl and Dimethomorph. Moscow Uni-versity, Biological Science Bulletin **62**: 11-14.
- Fischer DJ, Hayes AL. 1982. Mode of Action of the fungicides furalaxyl, metalaxyl and ofurace. Pesticide Science **13**: 330-339.
- FRAC. 2018. FRAC Code List ©\*2018: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). Fungicide Resistance Action Committee. Available from <http://www.phi-base.org/images/fracCodeList.pdf> (accessed February 2019).
- Fry WE, Goodwin SB. 1997. Re-emergence of potato and tomato late blight in the United Sta-tes. Plant Disease **81**:1349-1357.
- Gallian JJ, Miller JS, Nolte P. 2002. Managing fungicide resistance. University of Idaho, Mos-cow. Available from [https://www.researchgate.net/profile/Jeffrey\\_Miller9/publication/267722474\\_Managing\\_Fungicide\\_Re-sistance/links/54b926e60cf2c27adc4917a8/Managing-Fungicide-Resistance.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Jeffrey_Miller9/publication/267722474_Managing_Fungicide_Re-sistance/links/54b926e60cf2c27adc4917a8/Managing-Fungicide-Resistance.pdf) (ac-cessed February 2019).
- Gisi U. 2002. Chemical control of downy mildews. Pages 119-159 in Spencer PTN, Gisi U, Lebeda A, editors. Advances in downy mildew research. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Gisi U, Cohen Y. 1996. Resistance to phenylamide fungicides: a case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. Annual Review of Phytopathology **34**: 549-572.

- Gisi U, Sierotzki H. 2015. Oomycete Fungicides: Phenylamides, Quinone Outside Inhibitors, and Carboxylic Acid Amides. Pages 145-168 in Ishii H, Hollomon DW, editors. Fungicide Resistance in Plant Pathogens: Principles and a Guide to Practical Management. Springer, Japan.
- Gisi U, Chin KM, 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.
- Gisi U, Lamberth C, Mehl A, Seitz T. 2012. Carboxylic Acid Amide (CAA) fungicides. Pages 807-830 in Krämer W, Schirmer U, Jeschke P, Witschel M, editors. Modern crop Protection compounds, 2 second edition. Wiley-VCH, Weinheim.
- Grenville-Briggs LJ, van West P. 2005. The biotrophic stages of oomycete–plant interactions. *Advances in applied mikrobiologie* **57**: 217-243.
- Hausvater E. 1998. Nejčastější chyby v ochraně proti plísni bramborové. *Úroda* **4**: 18-19.
- Hausvater E, Doležal P. 2014. Integrovaná ochrana proti plísni bramboru. Výzkumný ústav bramborářský, Havlíčkův Brod.
- Hausvater E, Doležal P, Dejmalová J. 2011a. Plíseň bramboru, 4. vydání. Výzkumný ústav bramborářský, Havlíčkův Brod.
- Haverkort AJ, Boonekamp PM, Hutten R, Jacobsen E, Lotz LAP, Kessel GJT, Van der Vossen EAG. 2008. Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification. *Potato Research* **51**: 47-57.
- Hermann D, Gisi U. 2012. Fungicide resistance in Oomycetes with special reference to *Phytophthora infestans* and phenylamides. Pages 133-140 in Thind TS, editor. Fungicide resistance in crop protection. CAB International, Oxfordshire.
- Hollomon DW, Wheeler IE. 2002. Controlling powdery mildews with chemistry. Pages 249-255 in Bélangér RR, Bushnell WR, Dik AJ, Carver LW, editors. The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise. APS Press, St. Paul.
- Chloupek O. 2008. Genetická diverzita, šlechtění a semenářství, 3. vydání. Academia, Praha.

- Iglesias I, Escuredo O, Seijo C, Méndez J. 2010. *Phytophthora infestans* prediction for a potato crop. American journal of potato research **87**: 32-40.
- Jarvis WR, Gubler WD, Grove GG. 2002. Epidemiology of powdery mildews in agricultural pathosystems. Pages 169-199 in Bélanger RR, Bushnell WR, Dik AJ, Carver LW, editors. The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise. APS Press, St. Paul.
- Jones JD, Witek K, Verweij W, Jupe F, Cooke D, Dorling S, Foster S. 2014. Elevating crop disease resistance with cloned genes. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences DOI: 10.1098/rstb.2013.0087.
- Judelson HS, Roberts S. 1999. Multiple loci determining insensitivity to phenylamide fungicides on *Phytophthora infestans*. Phytopathology **89**: 754-760.
- Juroch J. 2011. *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary původce chorob plísně bramboru a rajčete. Ministerstvo zemědělství ČR ve spolupráci se Státní rostlinolékařskou správou, Praha. Available from <http://eagri.cz/public/web/file/125259/plisen.pdf> (accessed February 2019).
- Kalina T, Váňa J. 2005. Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Karolinum, Praha.
- Kessel GJT, Förch MG. 2006. Effect of UV-exposure on germination of sporangia of *Phytophthora infestans*. Plant Research International, Wageningen. Available from <https://clean-light.nl/wp-content/uploads/2017/07/PRI-Rapport-Phytophthora.pdf> (accessed February 2019).
- Knight SC, Anthony VM, Brady AM, Greenland AJ, Heaney SP, Murray DC, Powell KA, Schulz MA, Spinks CA, Worthington PA, Youle D. 1997. Rationale and perspectives on the development of fungicides. Annual Review Phytopathology **35**: 349-372.
- Kuck KH. 2005. Fungicide resistance management in a new regulatory environment. Pages 35-43 in Dehne HW, Gisi U, Kuck KH, Russell PE, Lyr H, editors. Modern fungicides and anti-fungal compounds. BCPC, Alton UK.
- Kunz S, Deising H, Mendgen K. 1997. Acquisition of resistance to sterol demethylation inhibitors by population of *Venturia inaequalis*. Phytopathology **87**: 1272-1278.

- Lifemap-NCBI. 2019. Eukaryota – Archaea – Bacteria. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Available from <http://lifemap-ncbi.univ-lyon1.fr/> (accessed February 2019).
- Ma Z, Michailides TJ. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* **24**: 853–863.
- Malcolmson JF, Black W. 1966. New R genes in *Solanum demissum* Lindl. and their complementary races of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Euphytica* **15**: 199-203.
- Mazáková J, Táborský V. 2005. Plíseň bramborová – složení populací patogenu *Phytophthora infestans*. *Rostlinolékař* **16**: 23 - 24.
- Mazáková J, Táborský V, Zouhar M, Ryšánek P, Hausvater E, Doležal P. 2006. Occurrence and distribution of mating types A1 and A2 of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in the Czech Republic. *Plant Protection Science* **42**: 41-48.
- Mazáková J, Zouhar M, Ryšánek P, Táborský V, Hausvater E, Doležal P. 2011. Sensitivity to fungicides in the isolates of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in the Czech republic from 2003 to 2008. *Plant Protection Science* **47**: 5-12.
- Mazáková J, Zouhar M, Sedlák P, Zusková E, Ryšánek P, Hausvater E. 2018. Sensitivity to fungicides and essential oils in the Czech isolates of *Phytophthora infestans*. *Scientia Agriculture Bohemica* DOI: 10.2478/sab-2018-0011.
- McGrath MT. 2001. Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew: Experiences and challenges. *Plant Disease* **85**: 236-245.
- McGrath MT. 2005. Guidelines for managing cucurbit powdery mildew with fungicides in 2005. Cornell University, Riverhead. Available from [http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/NewsArticles/Cuc\\_PM\\_Update.htm](http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/NewsArticles/Cuc_PM_Update.htm) (accessed February 2019).
- Míguez M, Reeve C, Wood PM, Hollomon DW. 2004. Alternative oxidase reduces the sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* to QoI fungicides. *Pest Management Science* **60**: 3-7.
- Möller K, Dilger M, Habermeyer J, Zinkernagel V, Flier WG, Hausladen H. 2009. Population studies on *Phytophthora infestans* on potatoes and tomatoes in southern Germany. *European Journal of Plant Pathology* **124**: 659-672.

- Müller U, Gisi U. 2012. Newest aspects of nucleic acid synthesis inhibitors: metalaxyl-M. Pages 901-908 in Krämer W, Schirmer U, Jeschke P, Witschel M, editors. Modern crop protection compounds, 2 second edition. Wiley-VCH, Weinheim.
- Neumann S. Jacob F. 1995. Principles of uptake and systemic transport of fungicides within plant. Pages 53-73 in Lyr H, Fischer G, editors. Modern selective fungicides. Gustav Fischer, Jena.
- Novartis AG, Basle CH. 1997. Fungicidní prostředek a způsob ochrany nebo prevence houbového napadení. Úřad průmyslového vlastnictví ČR, Česká republika. CZ 287915.
- Pieterse CM, de Wit PJ, Govers FP. 1992. Molecular aspects of the potato - *Phytophthora infestans* interaction. European Journal of Plant Pathology **98**: 85-92.
- Prokinová E. 2014. Choroby polních plodin. Profi Press, Praha.
- Randall E, Young V, Sierotzki H, Scalliet G, Birch PRJ, Cooke DEL, Csukai M, Whisson SC. 2014. Sequence diversity in the large subunit of RNA polymerase I contributes to mefenoxam insensitivity in *Phytophthora infestans*. Molecular Plant Pathology DOI: 10.1111/mpp.12124.
- Ristaino JB. 2002. Tracking historic migrations of the Irish potato famine pathogen, *Phytophthora infestans*. Microbes and Infection **4**: 1369-1377.
- Ross H. 1986. Potato Breeding: problems and perspectives. Journal of Plant Breeding **13**: 132.
- Rostlinolékařský portál. 2019. Plíseň bramborová. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. Available from [http://eagri.cz/public/app/srs\\_pub/fytoportal/public/?key=%22c18ccd9cbe2ba381e37b810d0c2720e7%22#fotogalerie|hledej:Phytophthora%20infestans|so:c18ccd9cbe2ba381e37b810d0c2720e7](http://eagri.cz/public/app/srs_pub/fytoportal/public/?key=%22c18ccd9cbe2ba381e37b810d0c2720e7%22#fotogalerie|hledej:Phytophthora%20infestans|so:c18ccd9cbe2ba381e37b810d0c2720e7) (accessed February 2019).
- Russell PE. 2002. Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management. Crop Life International, Brussels. Available from <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/monographs/monograph-3.pdf> (accessed February 2019).
- Sansome E. 1977. Polyploidy and induced gametangial formation in British isolates of *Phytophthora infestans*. Microbiology **99**: 311-316.

- Sedlák P, Křenek P, Vejl P, Melounová M, Zoufalá J, Kreuz L, Domkářová J. 2005. Posouzení praktické využitelnosti vybraných DNA markerů rezistence bramboru vůči *Phytophthora infestans*. ČZU, Praha. Available from [http://www.agris.cz/Content/files/main\\_files/64/142119/domkar.pdf](http://www.agris.cz/Content/files/main_files/64/142119/domkar.pdf) (accessed February 2019).
- Shattock RC. 1986. Inheritance of metalaxyl resistance in the potato late blight fungus. Pages 555-560 in Proceedings Brighton crop protection conference, vol 2. British Crop Protection Council. Thorton Heath, Surrey.
- Shattock RC. 1988. Studies on inheritance of resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans*. Plant Pathology **37**: 4-11.
- Shaw DS, Shattock RC. 1991. Genetics of *Phytophthora infestans*: the Mendelian approach. Pages 218-230 in Lucas JA, Shattock RC, Shaw DS, Cooke LR, editors. Phytophthora. Cambridge University Press, Cambridge.
- Schwinn F, Staub T. 1995. Oomycete fungicides: phenylamides and other fungicides against Oomycetes. Pages 323-346 in Lyr H, editor. Modern selective fungicides, 2 second edition. Gustav Fischer, Jena.
- Steffens JJ, Pell EJ, Tien M. 1996. Mechanisms of fungicide resistance in phytopathogenic fungi. Current Opinion in Biotechnology **7**: 348-355.
- Stevenson WR, Loria R, Franc GD, Weingartner DP. 2001. Compendium of Potato Diseases. American Phytopathological Society, USA.
- Táborský V, Doležal P. 2006. Prognóza výskytu plísně bramboru. Problematika rezistence patogena *Phytophthora infestans* k fungicidům. Agromanuál **1**: 28-31.
- Therrien CD, Tooley PW, Spielman LJ, Fry WE, Ritch DL, Shelly SE. 1993. Nuclear DNA content, allozyme phenotypes and metalaxyl sensitivity of *Phytophthora infestans* from Japan. Mycological Research DOI: 10.1016/S0953-7562(09)80860-5.
- Vesa-Velhartice a.s. Bohemia. Vesa Velhartice a.s., Velhartice. Available from <http://www.vesa-velhartice.cz/cz/bohemia.htm> (accessed February 2019).
- Věchet L. 2012. Mechanizmy interakcí hostitel - patogen a základy šlechtění na odolnost. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha.

- Vokál B, Bárta J, Bártová V, Čepl J, Čížek M, Doležal P, Domkářová J, Dohanyos M, Faltus M, Greplová M, Hamouz K, Hausvater E, Homolka P, Horáčková V, Hůla J, Kasal P, Kopačka V, Koukalová V, Mayer V, Melzoch K, Opatrný Z, Patáková P, Paulová L, Polzerová H, Rajchl A, Rychtera M, Šantrůček L, Šárka E, Ševčík R, Tajovský M, Vejchar D, Zámečník J. 2013. Brambory: šlechtění – pěstování – užití – ekonomika. Profi Press, Praha.
- Wastie RL. 1991. Breeding for resistance. Pages 193-224 in Ingram DS, Williams PH, editors. *Advances in Plant Pathology Phytophthora infestans, the cause of late blight of potato*. Academic Press, London.
- Whisson SC, Fonné-Pfister R, Csukai M. 2011. Molecular approaches to elucidate pathways and sites of fungicide resistance in Oomycetes. Pages 91-102 in Dehne HW, Deising HB, Gisi U, Kuck KH, Russell PE, Lyr H, editors. *Modern fungicides and antifungal compounds VI, Proceedings 16th international Reinhardtsbrunn symposium*. DPG Selbstverlag, Braunschweig.
- Wyenandt ChA, Maxwell N, Ward DL. 2008. Fungicide programs affect practical resistance development in cucurbit powdery mildew of pumpkin. *HortScience* **43**: 1838-1845.
- Zhang XZ, Ryu KY, Kim JS, Cheon JU, Kim BS. 2005. Changes in the sensitivity to metalaxyl, dimethomorph and ethaboxam of *Phytophthora infestans* in Korea. *The Plant Pathology Journal* DOI: 10.5423/PPJ.2005.21.1.033.
- Zhu GN, Huang FX, Feng LX, Oin BX, Yang YH, Chen YH, Lu XH. 2008. Sensitivities of *Phytophthora infestans* to metalaxyl, cymoxanil and dimethomorph. *Agricultural Sciences in China* DOI: 10.1016/S1671-2927(08)60120-0.

## Samostatné přílohy

**Příloha I** Přehled všech testovaných izolátů k účinné látce metalaxyl-M

Izolát	Lokalita	Reakce	EC <sub>50</sub> (µg/ml)	Třídy pro EC <sub>50</sub>
MB 1/16	Malý Bor	citlivý	0,0000000877	< 0,1
MB 2/16	Malý Bor	citlivý	0,0000331698	< 0,1
MB 3/16	Malý Bor	intermediární	8,8764546780	1-10
MB 4/16	Malý Bor	citlivý	-	< 0,1
MB 5/16	Malý Bor	citlivý	0,0501072333	< 0,1
MB 6/16	Malý Bor	citlivý	-	< 0,1
MB 7/16	Malý Bor	citlivý	-	< 0,1
MB 8/16	Malý Bor	citlivý	-	< 0,1
MB 21/16	Malý Bor	intermediární	8,2378786936	1-10
MB 22/16	Malý Bor	citlivý	-	< 0,1
MB 23/16	Malý Bor	citlivý	-	< 0,1
MB 24/16	Malý Bor	citlivý	-	< 0,1
MB 25/16	Malý Bor	citlivý	-	< 0,1
MB 26/16	Malý Bor	citlivý	-	< 0,1
D 1/16	Domanínek	citlivý	-	< 0,1
D 2/16	Domanínek	citlivý	-	< 0,1
D 3/16	Domanínek	citlivý	0,0109472071	< 0,1
D 4/16	Domanínek	citlivý	-	< 0,1
D 5/16	Domanínek	citlivý	-	< 0,1
D 6/16	Domanínek	citlivý	0,0044582926	< 0,1
D 10/16	Domanínek	citlivý	-	< 0,1
D 16/16	Domanínek	citlivý	-	< 0,1
D 17/16	Domanínek	citlivý	-	< 0,1
D 18/16	Domanínek	citlivý	-	< 0,1
D 19/16	Domanínek	citlivý	-	< 0,1
D 20/16	Domanínek	citlivý	-	< 0,1
D 22/16	Domanínek	citlivý	-	< 0,1
D 31/16	Domanínek	citlivý	0,0001811333	< 0,1
S 1/16	Praha-Suchdol	citlivý	0,0173103157	< 0,1
S 2/16	Praha-Suchdol	citlivý	0,0004035173	< 0,1
S 3/16	Praha-Suchdol	citlivý	0,0000392407	< 0,1
Lu 1/16	Lukavec	citlivý	-	< 0,1
Lu 2/16	Lukavec	citlivý	0,0012433989	< 0,1
Lu 3/16	Lukavec	citlivý	-	< 0,1
Lu 4/16	Lukavec	citlivý	-	< 0,1
Lu 5/16	Lukavec	citlivý	-	< 0,1
Lu 7/16	Lukavec	citlivý	0,0016418491	< 0,1
Lu 11/16	Lukavec	citlivý	0,0000067363	< 0,1
Lu 12/16	Lukavec	citlivý	0,0000300726	< 0,1
Ž 1/16	Želiv	citlivý	0,0000004107	< 0,1
Ž 2/16	Želiv	rezistentní	-	> 100



Ž 3/16	Želiv	citlivý	0,0000034400	< 0,1
Ž 4/16	Želiv	citlivý	0,0002644342	< 0,1
Ž 5/16	Želiv	citlivý	-	< 0,1
Ž 6/16	Želiv	citlivý	0,0009259137	< 0,1
Ž 7/16	Želiv	citlivý	0,0002453152	< 0,1
L 2/16	Lípa	citlivý	-	< 0,1
L 3/16	Lípa	citlivý	-	< 0,1
L 4/16	Lípa	citlivý	-	< 0,1
L 12/16	Lípa	citlivý	-	< 0,1
L 15/16	Lípa	citlivý	-	< 0,1
L 16/16	Lípa	rezistentní	-	> 100
L 18/16	Lípa	citlivý	-	< 0,1
L 20/16	Lípa	citlivý	-	< 0,1
L 28/16	Lípa	citlivý	-	< 0,1
L 29/16	Lípa	citlivý	-	< 0,1
L 33/16	Lípa	citlivý	0,0000881312	< 0,1
V 1/16	Valečov (Okrouhlice)	citlivý	-	< 0,1
V 2/16	Valečov (Okrouhlice)	citlivý	0,8128740233	0,1-1
V 3/16	Valečov (Okrouhlice)	citlivý	0,8913524212	0,1-1
V 7/16	Valečov (Okrouhlice)	intermediární	5,6380272432	1-10
V 8/16	Valečov (Okrouhlice)	intermediární	9,1516756224	1-10
V 9/16	Valečov (Okrouhlice)	citlivý	0,4628994439	0,1-1
V 10/16	Valečov (Okrouhlice)	intermediární	5,5319955232	1-10
V 13/16	Valečov (Okrouhlice)	citlivý	0,7172985434	0,1-1
V 15/16	Valečov (Okrouhlice)	intermediární	6,3862825525	1-10
V 16/16	Valečov (Okrouhlice)	intermediární	5,0748691680	1-10
V 18/16	Valečov (Okrouhlice)	citlivý	0,5116022551	0,1-1
V 20/16	Valečov (Okrouhlice)	citlivý	0,2768634818	0,1-1
V 21/16	Valečov (Okrouhlice)	citlivý	0,8739899518	0,1-1
V 22/16	Valečov (Okrouhlice)	intermediární	12,2620016605	10-100
V 23/16	Valečov (Okrouhlice)	citlivý	0,9218568098	0,1-1
V2 1/16	Valečov (Okrouhlice)	intermediární	8,0040522374	1-10
V2 2/16	Valečov (Okrouhlice)	citlivý	0,8470964473	0,1-1
V2 5/16	Valečov (Okrouhlice)	citlivý	0,5432290743	0,1-1
V2 7/16	Valečov (Okrouhlice)	citlivý	0,7952657229	0,1-1
V2 8/16	Valečov (Okrouhlice)	intermediární	9,6696973718	1-10
V2 9/16	Valečov (Okrouhlice)	intermediární	14,3271351848	10-100
V2 11/16	Valečov (Okrouhlice)	intermediární	5,4457645940	1-10
V2 14/16	Valečov (Okrouhlice)	intermediární	42,4676893063	10-100
V2 19/16	Valečov (Okrouhlice)	citlivý	0,4886735605	0,1-1
V2 25/16	Valečov (Okrouhlice)	citlivý	0,4143828200	0,1-1
V2 26/16	Valečov (Okrouhlice)	citlivý	0,9626422938	0,1-1
V2 27/16	Valečov (Okrouhlice)	intermediární	14,3516025883	10-100
V2 28/16	Valečov (Okrouhlice)	intermediární	24,2617637295	10-100
V2 36/16	Valečov (Okrouhlice)	citlivý	0,3512758259	0,1-1
VŽ 1/16	Veselý Žďár	citlivý	0,9745921957	0,1-1

VE 4/16	Velhartice	rezistentní	-	> 100
VE 5/16	Velhartice	rezistentní	-	> 100
VE 6/16	Velhartice	rezistentní	-	> 100
VE 7/16	Velhartice	rezistentní	-	> 100
VE 8/16	Velhartice	intermediární	16,3485080503	10-100
VE 10/16	Velhartice	rezistentní	-	> 100
VE 11/16	Velhartice	rezistentní	-	> 100
U 1/16	Únětice	citlivý	-	< 0,1
U 2/16	Únětice	citlivý	-	< 0,1
U 3/16	Únětice	citlivý	-	< 0,1
U 4/16	Únětice	citlivý	-	< 0,1
U 5/16	Únětice	citlivý	-	< 0,1
U 6/16	Únětice	citlivý	-	< 0,1

- EC<sub>50</sub> u těchto izolátů nebylo vzhledem k charakteru růstu mycelia možné spočítat

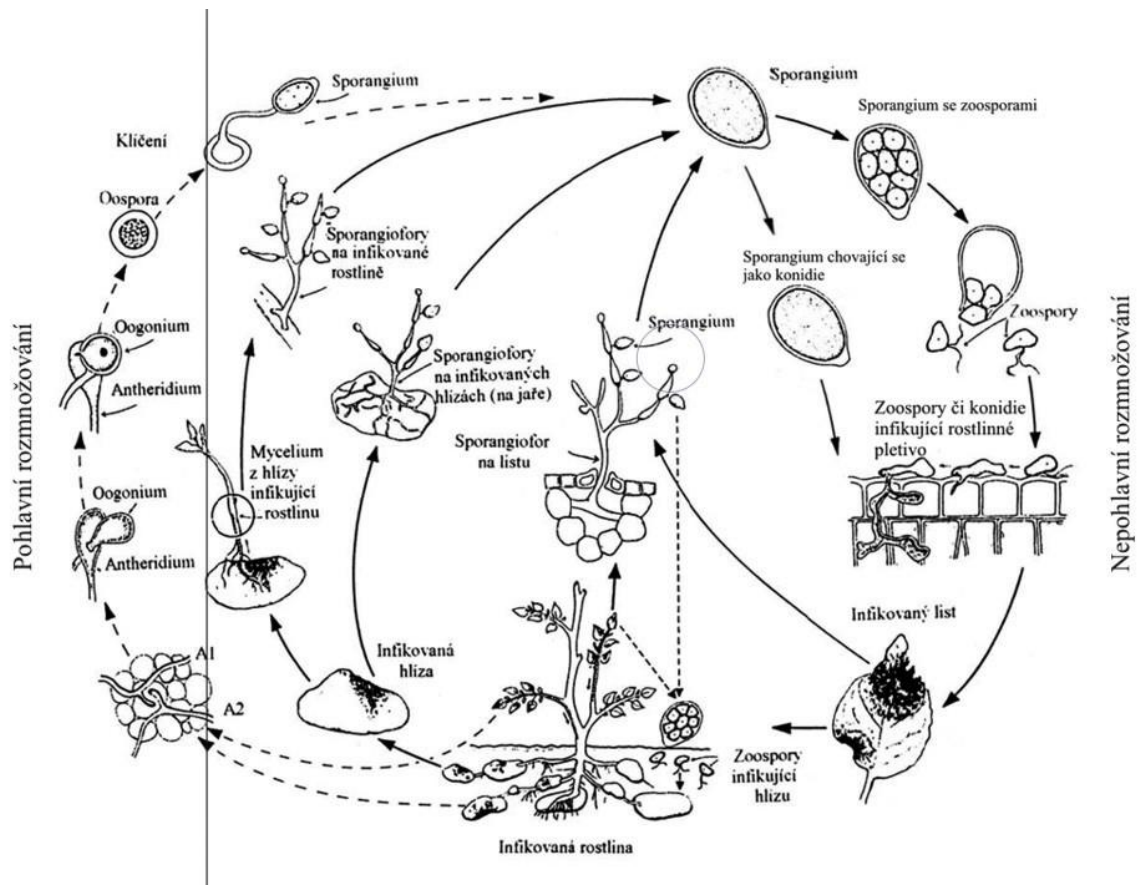
**Příloha II** Přehled všech testovaných izolátů k účinné látce propamocarb-hydrochlorid

Izolát	Lokalita	EC <sub>50</sub> (µg/ml)	Třídy pro EC <sub>50</sub>
MB 1/16	Malý Bor	13705,1982042677000000	> 100
MB 2/16	Malý Bor	75,3879355645021000	10-100
MB 3/16	Malý Bor	9,5113992839324300	1–10
MB 4/16	Malý Bor	133,7749548259860000	> 100
MB 5/16	Malý Bor	26,1689788647016000	10-100
MB 6/16	Malý Bor	15420,9875219791000000	> 100
MB 7/16	Malý Bor	241,3847343133120000	> 100
MB 8/16	Malý Bor	100,4925011490740000	> 100
MB 21/16	Malý Bor	19,6114411661962000	10-100
MB 22/16	Malý Bor	1057,8812551863600000	> 100
MB 23/16	Malý Bor	486,9441135454790000	> 100
MB 24/16	Malý Bor	179,4256017411790000	> 100
MB 25/16	Malý Bor	2234,9665197841900000	> 100
MB 26/16	Malý Bor	3507014,7193246400000000	> 100
D 1/16	Domanínek	6,8250417746795100	1–10
D 2/16	Domanínek	391,6185032953400000	> 100
D 3/16	Domanínek	17,6531730138401000	10-100
D 4/16	Domanínek	66,1927678608453000	10-100
D 5/16	Domanínek	25,8895572074656000	10-100
D 6/16	Domanínek	34,4691578877898000	10-100
D 10/16	Domanínek	33,2447123698244000	10-100
D 16/16	Domanínek	17,4772676321161000	10-100
D 17/16	Domanínek	209,8831310567070000	> 100
D 18/16	Domanínek	387,2518145705990000	> 100
D 19/16	Domanínek	94,7932409527706000	10-100
D 20/16	Domanínek	385,6791479040880000	> 100
D 22/16	Domanínek	16,4163994784981000	10-100
D 31/16	Domanínek	34,3442553838550000	10-100
S 1/16	Praha-Suchdol	52,0844343023821000	10-100
S 2/16	Praha-Suchdol	5,6739713506542600	1–10
S 3/16	Praha-Suchdol	20,3078001106882000	10-100
Lu 1/16	Lukavec	0,9200850602522720	0,1–1
Lu 2/16	Lukavec	52247,56246300000000	> 100
Lu 3/16	Lukavec	12,0816492625594000	10-100
Lu 4/16	Lukavec	12,4573154486778000	10-100
Lu 5/16	Lukavec	14,0255665860412000	10-100
Lu 7/16	Lukavec	151,4104015512410000	> 100
Lu 11/16	Lukavec	28,4702475019436000	10-100
Lu 12/16	Lukavec	17,1743352372128000	10-100
Ž 1/16	Želiv	1638,9445956012800000	> 100
Ž 2/16	Želiv	435,7074434856080000	> 100
Ž 3/16	Želiv	150,5712211013120000	> 100
Ž 4/16	Želiv	682942,3006695610000000	> 100

Ž 5/16	Želiv	706,6615190748540000	> 100
Ž 6/16	Želiv	1062,7532423027200000	> 100
Ž 7/16	Želiv	4690,0758595904700000	> 100
L 2/16	Lípa	16,5935615176761000	10-100
L 3/16	Lípa	138,3119937500190000	> 100
L 4/16	Lípa	33,1313560441944000	10-100
L 12/16	Lípa	43,8380486424459000	10-100
L 15/16	Lípa	388,4466855549160000	> 100
L 16/16	Lípa	36,7275622953156000	10-100
L 18/16	Lípa	84,2388344796970000	10-100
L 20/16	Lípa	376,2924998582600000	> 100
L 28/16	Lípa	61,2526905574405000	10-100
L 29/16	Lípa	27,2596187231902000	10-100
L 33/16	Lípa	41,0872896446677000	10-100
V 1/16	Valečov (Okrouhlice)	7,9818781227300700	1-10
V 2/16	Valečov (Okrouhlice)	177,7917688785080000	> 100
V 3/16	Valečov (Okrouhlice)	183,0373243394630000	> 100
V 7/16	Valečov (Okrouhlice)	1267,6051937864500000	> 100
V 8/16	Valečov (Okrouhlice)	97,9666909906876000	10-100
V 9/16	Valečov (Okrouhlice)	89,7441588672873000	10-100
V 10/16	Valečov (Okrouhlice)	86,8418176378403000	10-100
V 13/16	Valečov (Okrouhlice)	87,8061484871829000	10-100
V 15/16	Valečov (Okrouhlice)	45,5739130084762000	10-100
V 16/16	Valečov (Okrouhlice)	64,0946773841966000	10-100
V 18/16	Valečov (Okrouhlice)	67,3312123294488000	10-100
V 20/16	Valečov (Okrouhlice)	74,3849896296129000	10-100
V 21/16	Valečov (Okrouhlice)	237,4152130229220000	> 100
V 22/16	Valečov (Okrouhlice)	160,2379249751470000	> 100
V 23/16	Valečov (Okrouhlice)	318,6934045641260000	> 100
V2 1/16	Valečov (Okrouhlice)	34,1127421831725000	10-100
V2 2/16	Valečov (Okrouhlice)	114,0749610911390000	> 100
V2 5/16	Valečov (Okrouhlice)	72,9857675632594000	10-100
V2 7/16	Valečov (Okrouhlice)	38,2267134417272000	10-100
V2 8/16	Valečov (Okrouhlice)	276,2738509784430000	> 100
V2 9/16	Valečov (Okrouhlice)	219,3069254694200000	> 100
V2 11/16	Valečov (Okrouhlice)	31,0544464036225000	10-100
V2 14/16	Valečov (Okrouhlice)	105,7000261021700000	> 100
V2 19/16	Valečov (Okrouhlice)	46,3863645828582000	10-100
V2 25/16	Valečov (Okrouhlice)	45,9651068178008000	10-100
V2 26/16	Valečov (Okrouhlice)	318,1617988804710000	> 100
V2 27/16	Valečov (Okrouhlice)	706,4478500567430000	> 100
V2 28/16	Valečov (Okrouhlice)	344,2374687047940000	> 100
V2 36/16	Valečov (Okrouhlice)	118,7098963956800000	> 100
VŽ 1/16	Veselý Žďár	191,7381401246640000	> 100
VE 4/16	Velhartice	55,7116549129019000	10-100
VE 5/16	Velhartice	36,7343979373577000	10-100

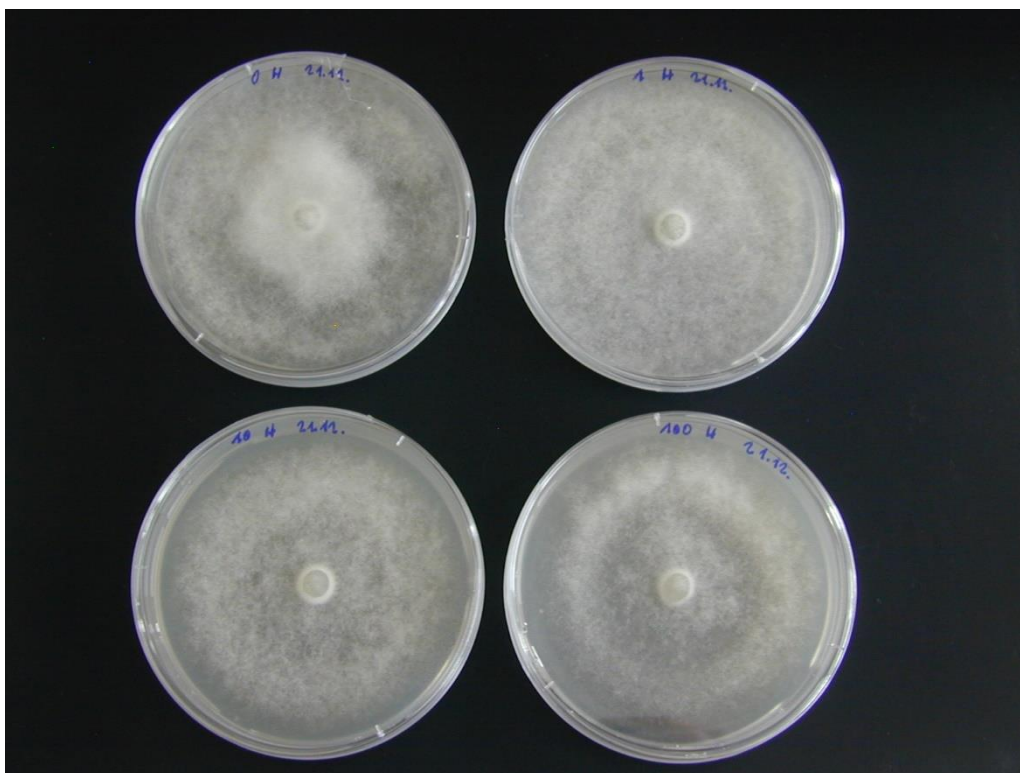
VE 6/16	Velhartice	7,0503903257407200	1–10
VE 7/16	Velhartice	89,5030734996282000	10-100
VE 8/16	Velhartice	27,1686124847283000	10-100
VE 10/16	Velhartice	26,2856892514673000	10-100
VE 11/16	Velhartice	25,4375916697810000	10-100
U 1/16	Únětice	3,9256618296632900	1–10
U 2/16	Únětice	418,0481186176550000	> 100
U 3/16	Únětice	51,9939885570298000	10-100
U 4/16	Únětice	15,7228670138891000	10-100
U 5/16	Únětice	15,1145320381595000	10-100
U 6/16	Únětice	22,0960627780876000	10-100

**Příloha III** Životní cyklus patogena *Phytophthora infestans*

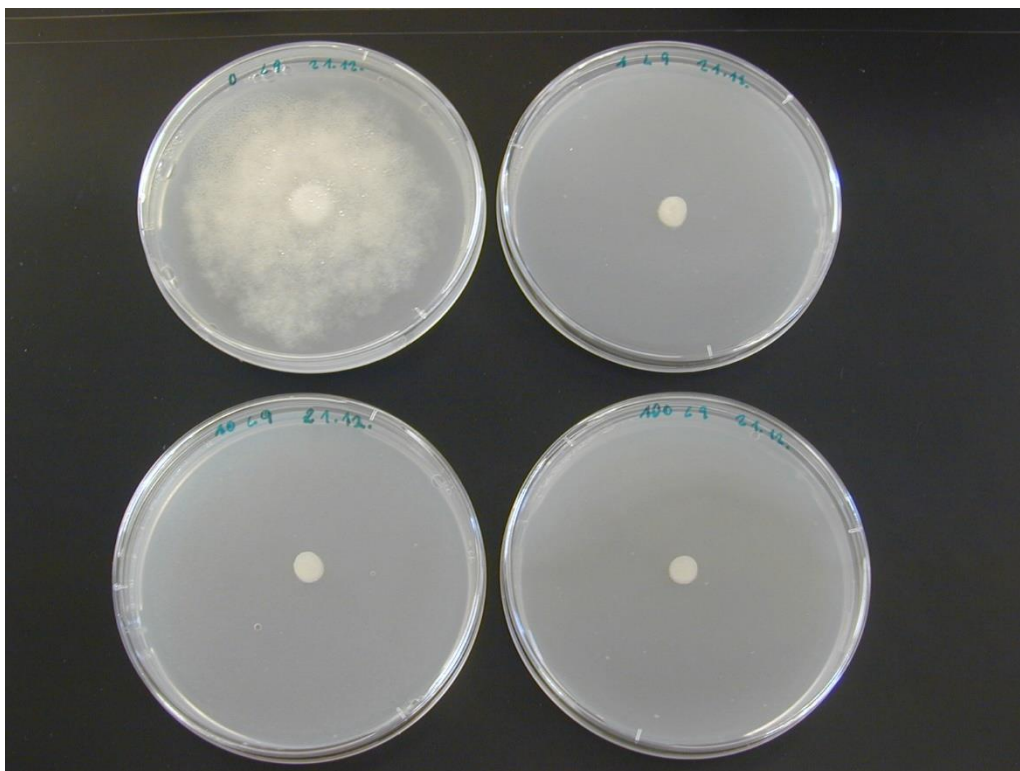


(Převzato z Agrios, G. N. Plant Pathology. Fourth edition. Academic Press. p. 635)

**Příloha IV** Příklad rezistentního izolátu k účinné látce metalaxyl-M



**Příloha V** Příklad citlivého izolátu k účinné látce metalaxyl-M



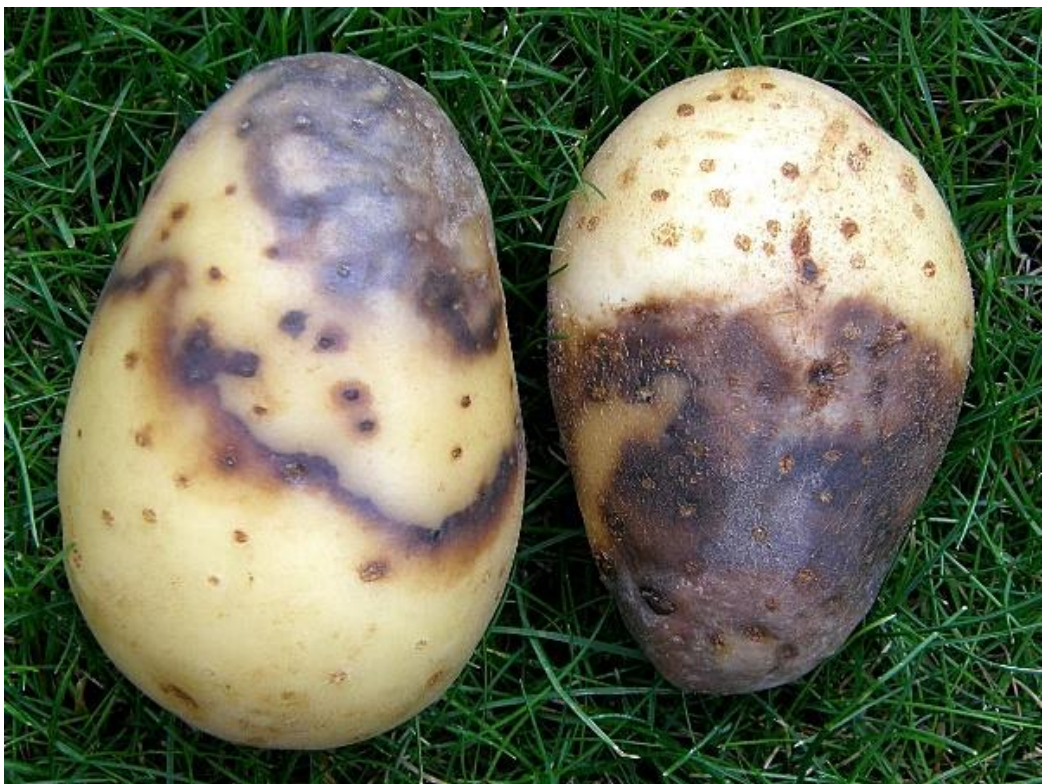


**Příloha VI** Plíseň bramboru – příznaky na listech bramboru



([https://www.agro.basf.cz/cs/Doporuceni/atlas-chorob-plevelu-a-skudcu/Pest-detail\\_11406.html](https://www.agro.basf.cz/cs/Doporuceni/atlas-chorob-plevelu-a-skudcu/Pest-detail_11406.html))

**Příloha VII** Plíseň bramboru – příznaky na hlízách bramboru



(<https://www.agromanual.cz/cz/atlas/choroby/choroba/plisen-bramboru>)

**Příloha VIII** Plíseň bramboru na rajčatech – příznaky na plodech rajčete



(<https://www.agromanual.cz/cz/atlas/choroby/choroba/plisen-bramboru-na-rajcatech>)