

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra ochrany rostlin



Účinnost vybraných fungicidních látek vůči patogenu
Phytophthora cactorum

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Veronika Janoušková

Obor studia: Rostlinolékařství

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

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Účinnost vybraných fungicidních látek vůči patogenu *Phytophthora cactorum*" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 24. 7. 2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí své diplomové práce Ing. Janě Mazákové, PhD., především za odborné vedení mě i práce, za její vstřícnost, trpělivost, poskytnuté materiály, a hlavně za všechny cenné rady, připomínky a nápady. Také bych ráda poděkovala své rodině za veškerou poskytnutou podporu a toleranci za doby mého studia.

Ještě bych velmi ráda poděkovala pracovníkům Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Ruzyni, v.v.i., za poskytnutí materiálu pro tuto diplomovou práci, jmenovitě Ing. Ivaně Střížkové a Ing. Matěji Pánkovi, PhD.

Účinnost vybraných fungicidních látek vůči patogenu

Phytophthora cactorum

Souhrn

Snížení citlivosti škodlivých organismů vůči fungicidním látkám je problémem mnoha pěstitelů. Nemusí to být pouze v důsledku nedodržení všech zásad pro použití daného přípravku nebo zanedbání antirezistentní strategie. Mezi patogenními organismy se vyskytují jedinci, kteří mají genetické předpoklady k tomu, že budou proti určité fungicidní látce a jejímu mechanismu účinku odolnější než ostatní jedinci.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit úroveň citlivosti k vybraným fungicidním látkám u jednotlivých izolátů *Phytophthora cactorum*, a porovnat tak účinnost vybraných fungicidních látek na růst izolátů patogena *Phytophthora cactorum*. Bylo testováno 20 izolátů z 12 různých lokalit České republiky metodou otrávených ploten v podmínkách *in vitro*. Fungicidní látky byly testovány v rozdílných koncentracích. Dále byly u všech izolátů a fungicidních látek stanoveny hodnoty EC₅₀ (μg/ml), vyjadřující efektivní koncentraci fungicidní látky inhibující růst mycelia z 50 %, a MIC (μg/ml), vyjadřující minimální koncentraci fungicidní látky inhibující růst mycelia ze 100 %.

U účinné látky metalaxyl-M bylo zjištěno, že pro stanovení MIC u většiny izolátů (80 %), by bylo nutné použít koncentraci > 10 μg/ml. Hodnoty EC₅₀ byly velmi variabilní, v rozmezí hodnot 0,1–1 μg/ml (50 % izolátů) a vyšší než 10 μg/ml (30 % izolátů).

Hodnota MIC se u účinné látky dimethomorph pohybovala v rozmezí koncentrací 1–10 μg/ml (u 80 % izolátů) a hodnota EC₅₀ v intervalu koncentrací 0,1–1 μg/ml (u 70 % izolátů). U zbylých 30 % izolátů byla 50% inhibice růstu mycelia zaznamenána v rozmezí koncentrací 1–10 μg/ml.

U ostatních účinných látek (propamocarb, cymoxanil a fenamidone) a fungicidu (Aliette 80 WG s účinnou látkou fosetyl-aluminium) nebylo možné hodnoty EC₅₀ a MIC stanovit, jelikož se potřebná koncentrace pro jejich stanovení pohybovala nad maximální použitou v této práci (účinné látky 10 μg/ml, fungicid 100 μg/ml).

Klíčová slova: *Phytophthora cactorum*, fungicidy, citlivost, rezistence

Efficacy of selected fungicidal substances against *Phytophthora cactorum* isolates

Summary

Reducing the sensitivity of pathogens to fungicides is a problem for many farmers. This does not have to be due to a breach of all principles for the use of the preparation or neglect the anti-resistance strategy. Among pathogenic organisms, some individuals have the genetic predisposition to be resistant to a fungicidal substance and its effect mechanism than others.

The aim of this diploma thesis was to determine the level of sensitivity to selected fungicidal substances in individual isolates of *Phytophthora cactorum* and compare the efficacy of selected fungicidal substances on the growth of isolates of the pathogen *Phytophthora cactorum*. There were used 20 isolates from 12 different localities of the Czech Republic for testing by the method of poisoned plates *in vitro*. Fungicidal substances were tested in different concentrations. For all isolates were determined EC₅₀ values (µg/ml), expressing the effective concentration of fungicidal substance inhibiting the mycelial growth of 50 %, and MIC values (µg/ml), expressing the minimum concentration of fungicidal substance inhibiting the mycelial growth of 100 %.

For the fungicidal substance metalaxyl-M was found that a concentration of > 10 µg/ml would be required to determine the MIC for most isolates (80 %). EC₅₀ values were highly variable, ranging from concentration range 0.1–1 µg/ml (50 % isolates) and greater than 10 µg/ml (30 % isolates).

The MIC value for the fungicidal substance dimethomorph was in the concentration range 1–10 µg/ml (in 80 % isolates) and the EC₅₀ value was in the concentration range 0.1–1 µg/ml (in 70 % isolates). The remaining 30 % of isolates had 50% inhibition of mycelial growth in the concentration range of 1–10 µg/ml.

For the other fungicidal substances (propamocarb, cymoxanil and fenamidone) and fungicide (Aliette 80 WG with the fungicidal substance fosetyl-aluminum), the EC₅₀ and MIC values could not be determined, because the concentration required to determine them was above the maximum concentration used in this work (fungicidal substances 10 µg/ml, fungicide 100 µg/ml).

Keywords: *Phytophthora cactorum*, fungicides, sensitivity, resistance

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Vědecká hypotéza a cíl práce.....	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Jahodník (<i>Fragaria</i>).....	3
3.2	Fytoftorová krčková hniloba jahodníku, původce onemocnění – <i>Phytophthora cactorum</i>	6
3.2.1	Taxonomické zařazení patogena	6
3.2.2	Životní cyklus a biologie patogena	8
3.2.3	Infekční cyklus <i>P. cactorum</i> na jahodníku a příznaky onemocnění.....	10
3.3	Metody ochrany proti původci fytoftorové hniloby	12
3.3.1	Nepřímé metody ochrany.....	13
3.3.1.1	Agrotechnické metody ochrany.....	13
3.3.1.2	Organizační metody ochrany.....	14
3.3.1.3	Šlechtitelské metody ochrany a rezistence hostitelského druhu	15
3.3.2	Přímé metody ochrany	17
3.3.2.1	Monitoring výskytu onemocnění.....	17
3.3.2.2	Chemická ochrana	17
3.3.2.3	Biologická ochrana	19
3.4	Rezistence patogena <i>Phytophthora cactorum</i> k fungicidním látkám	20
3.4.1	Metody diagnostiky rezistence.....	21
3.4.2	Antirezistentní strategie.....	21
4	Materiál a metody	23
4.1	Původ izolátů	23
4.2	Fungicidní látky.....	25
4.3	Příprava živného média	26
4.4	Přeočkování izolátů	28
4.5	Založení testů citlivosti k fungicidním látkám.....	29
4.6	Vyhodnocení testů citlivosti	32
5	Výsledky.....	33
5.1	Účinnost fungicidních látek	33
5.1.1	Metalaxyl-M	33
5.1.2	Propamocarb	35
5.1.3	Dimethomorph.....	36
5.1.4	Cymoxanil.....	37

5.1.5	Fenamidone.....	38
5.1.6	Aliette 80 WG	38
6	Diskuze.....	39
7	Závěr	45
8	Literatura	46
9	Seznam použitých zkratk.....	53

Seznam obrázků

Obrázek 1 Jahodník obecný (<i>Fragaria vesca</i> L.) (scanzen.cz 2020)	3
Obrázek 2 Fylogenetické vztahy mezi jednotlivými druhy jahodníků (upraveno dle Staudt 1999).....	3
Obrázek 3 Zdravý jahodník (1) versus napadený jahodník (2) patogenem <i>Phytophthora cactorum</i> (upraveno dle NOHEL GARDEN 2011)	5
Obrázek 4 Schématické znázornění životního cyklu patogenů z rodu <i>Phytophthora</i> (upraveno dle Lamour 2013)	8
Obrázek 5 Životní cyklus hniloby plodů způsobený patogenem <i>Phytophthora cactorum</i> na jahodníku (upraveno dle The Ohio State University 2016)	11
Obrázek 6 Ředění účinných látek na požadovanou koncentraci za pomoci DMSO (dimethylsulfoxid)	29

Seznam tabulek

Tabulka 1 Biochemické odlišnosti <i>Oomycetes</i> versus houby (<i>Fungi</i>) (Němcová & Prášil 2010) 7	
Tabulka 2 Lokality sběru izolátů <i>P. cactorum</i> a jejich příslušné označení pro identifikaci	23
Tabulka 3 Ředění účinných látek na požadovanou koncentraci	30
Tabulka 4 Výsledné koncentrace fungicidních látek pro založení testů citlivosti	30
Tabulka 5 Hodnoty EC ₅₀ a MIC účinné látky metalaxyl-M u jednotlivých izolátů <i>P. cactorum</i>	34
Tabulka 6 Hodnoty EC ₅₀ a MIC účinné látky dimethomorph u jednotlivých izolátů <i>P. cactorum</i>	36

Seznam grafů

Graf 1 Schématické vyjádření výsledků testů citlivosti u zkoumaných dvaceti izolátů vůči účinné látce metalaxyl-M s hodnotami EC ₅₀ a MIC v (μg/ml)	35
Graf 2 Schématické vyjádření výsledků testů citlivosti u zkoumaných dvaceti izolátů vůči účinné látce dimethomorph s hodnotami EC ₅₀ a MIC v (μg/ml)	37

1 Úvod

Problematika kolem přípravků na ochranu rostlin je stále aktuálním tématem, a stejně tomu tak bude i v příštích letech. Jedním z problémů, který se velmi dotýká pěstitelů je zužující se spektrum povolených účinných látek. Důležitý a závažný dopad většinou v důsledku nesprávného použití přípravku na ochranu rostlin, jmenovitě například sníženého množství přípravku na plochu nebo užitím tank-mixů, je vznik rezistence škodlivých organismů proti používaným povoleným ochranným prostředkům. Mezi přímé dopady vzniku rezistence je možné zařadit i růst spotřebitelských cen v závislosti na snížení výnosu dané komodity, ceně ošetření porostu proti škodlivým organismům a výkupní ceně plodiny.

Phytophthora cactorum je polyfágní patogen napadající řadu kulturních, okrasných i plevelných rostlin. V České republice způsobuje především kořenové hniloby znemožňující rostlině dokončit svůj životní cyklus, a zejména u kulturních plodin to působí velké potíže vzhledem k potřebě optimálního a potřebného výnosu k vyvážené výživě lidstva a zajištění pokrytí poptávky na trhu.

Velké škody na výnosech, ale také až likvidační škody způsobuje patogen u některých druhů jahodníků, které i přes veškerou možnou a dostupnou ochranu nelze ubránit proti již zmíněnému původci fytoftorového onemocnění. Jako možná příčina se uvádí vznik rezistence a snížená citlivost patogena na účinné látky obsažené ve fungicidních přípravcích. Tento fakt vede ke zvýšenému užívání pesticidů, a právě mnohdy i jejich nesprávnému užití, aby rostlina byla za každou cenu chráněna a pěstitel ušetřen ztráty na výnosu.

V dnešní době ale takovýto přístup představuje obrovský problém z důvodu možných reziduí pesticidů v půdě, možnosti znečištění vod, fytotoxického působení na citlivé rostliny nebo také problém s ochrannou lhůtou u ovocných plodin, které *Phytophthora cactorum* nejčastěji napadá. Je tedy žádoucí odhalit, které pesticidy pozbyly účinku v důsledku snížení citlivosti a rezistence patogenů a zamezit jejich užívání či zvolit principy antirezistentní strategie.

2 Vědecká hypotéza a cíl práce

Vědecká hypotéza této diplomové práce je založena na tvrzení, že v populaci patogena *Phytophthora cactorum* existují izoláty vyznačující se různou úrovní citlivosti k fungicidním látkám a *vice versa* existují fungicidní látky, které se vyznačují různým inhibičním účinkem na růst izolátů patogena *Phytophthora cactorum*.

Cílem této diplomové práce je zjistit úroveň citlivosti k vybraným fungicidním látkám u jednotlivých izolátů *Phytophthora cactorum*, a porovnat tak účinnost vybraných fungicidních látek na růst izolátů patogena *Phytophthora cactorum*.

3 Literární rešerše

3.1 Jahodník (*Fragaria*)

Taxonomické zařazení:

Říše – Rostliny (*Plantae*)

Podříše – Cévnaté rostliny (*Tracheobionta*)

Oddělení – Krytosemenné (*Magnoliophyta*)

Třída – Vyšší dvouděložné (*Rodopsida*)

Řád – Růžotvaré (*Rosales*)

Čeleď – Růžovité (*Rosaceae*)

Rod – Jahodník (*Fragaria*)

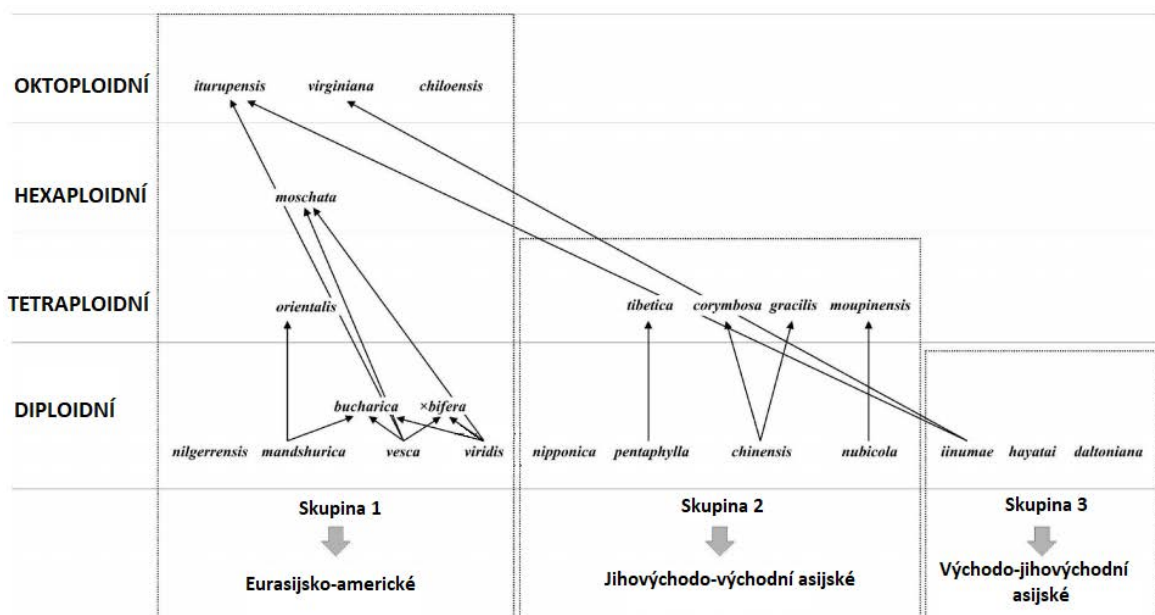


Obrázek 1 Jahodník obecný (*Fragaria vesca* L.)
(scanzen.cz 2020)

(Integrated

Taxonomic Information System 2020)

Jahodník (viz Obrázek 1) je vytrvalá rostlina, vysoká 5–30 cm (Chaoluan et al. 2003), z rodu *Fragaria*, čítající přes sto padesát druhů rostlin a nespočet kultivarů (Nečas & a kol. 2004). Jednotlivé jahodníky lze rozdělit do čtyř skupin dle původu druhů a oblasti pěstování na: euroasijské, asijské, východo-severoamerické a západoamerické (Nečas & a kol. 2004). Někteří autoři, například Staudt (1999), uvádí rozdělení původu jahodníků pouze do tří skupin: eurasijsko-americké, jihovýchodo-východní asijské a východo-jihovýchodní asijské, viz Obrázek 2. Bez ohledu na původ jednotlivých druhů se jedná nejčastěji o zástupce diploidní,



Obrázek 2 Fylogenetické vztahy mezi jednotlivými druhy jahodníků (upraveno dle Staudt 1999)

dále tetraploidní, hexaploidní a dokonce oktoploidní (Staudt 1999). Do původem evropských druhů mohou být zařazeny tři zástupci – jahodník obecný (*Fragaria vesca*), jahodník truskavec (*Fragaria moschata*) a jahodník trávence (*Fragaria viridis*) (Nečas et al. 2004).

Listy rostlin jsou trojčetné nebo pětičetné, střídavé a lichozpeřené, formované do charakteristické přizemní listové růžice (Pilát & Ušák 1963). Květenství je nazýváno okolíkovitý vrcholík. Květy jsou oboupohlavné, složené z pěti bílých okvětních lístků tvořící korunu, kalich je taktéž formován pěti lístky, zelenými, trojbokými a ochlupenými. Plodem je apokarpické souplodí nažek, nazývané jahoda, dosahující v průměru 2 cm (Šimánek & Cvopová 1968).

Rozmnožování jahodníků probíhá převážně vegetativně za pomoci nadzemních šlahounů – stolonů. Stolony mají dvě očka, první zůstává dormantní a z druhého vyrůstá dceřiná rostlina (Hancock 1999).

Z pohledu Ministerstva zemědělství ČR (2017) je možné označit za největší abiotické nepříznivé faktory při pěstování jahodníků mrazová poškození a nedostatek dešťových srážek. V důsledku nižší sklizně než je obvyklé, došlo v roce 2017 i k navýšení spotřebitelských cen a zvýšení dovozu jahod (hlavně ze Španělska, Itálie, Polska, Německa a Belgie). Celková sklizeň v roce 2017 byla tedy 8 257 t, obvykle však bývá v průměru 9 000–10 000 t.

Biotické vlivy působící na rostliny z evropských druhů *Fragaria* čítají řadu škůdců a původců chorob. Podle Hessayon (2001) a Rostlinolékařského portálu (2020) jsou škůdci zastoupeny následujícími organismy: háďátko jahodníkové (*Aphelenchoides fragariae*), kovolesskec gamma (*Autographa gamma*), květopas jahodníkový (*Anthonomus rubi*), roztočik jahodníkový (*Phytonemus pallidus*), sviluška chmelová (*Tetranychus urticae*), mšice, slimáci a ptáci. Nejzávažnějšími z nich jsou:

- Háďátko jahodníkové způsobující ztráty na výnosu až 75 %. Při zjištění výskytu je vhodné napadené rostliny odstranit z pozemku a zničit, popřípadě zařadit registrované přípravky na ochranu rostlin a na zamořeném pozemku háďátky nepěstovat jahodníky ani jiné náchylné rostliny po dobu několika let (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský 2020a).
- Květopas jahodníkový dokáže znehodnotit až 80 % úrody nakousnutím květních pupat, které následně usychají a opadávají. Za účinnou se považuje chemická ochrana (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský 2020a).
- Roztočik jahodníkový, při jehož napadení rostliny během 2–3 let odumírají. Je tedy velmi důležité dbát na ochranu před jeho zavlečením, zejména na zdravý

rostlinný materiál, nekontaminovanou půdu a očistu nástrojů (Lanák et al. 1969).

Mezi původce chorob napadající jahodníky patří antraknózová skvrnitost jahodníku (*Colletotrichum acutatum*), bílá skvrnitost listů jahodníku [*Mycosphaerella fragariae* (teleomorfa) – *Ramularia tulasnei* (anamorfa)], červená hniloba kořenů jahodníku (*Phytophthora fragariae* var. *fragariae*), fialová skvrnitost listů jahodníku [*Diplocarpon earlianum* (teleomorfa) – *Marssonina fragariae* (anamorfa)], fytoftorová krčková hniloba jahodníku a kožovitá hniloba jahodníku (*Phytophthora cactorum*), padlí jahodníku (*Podosphaera aphanis*) a šedá hniloba jahod [*Botryotinia fuckeliana* (teleomorfa) – *Botrytis cinerea* (anamorfa)]. Houbové choroby snižují výnos, listovou plochu a končí až likvidací porostu pokud není zakročeno agrotechnickou, nechemickou, biologickou nebo chemickou ochranou (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský 2020a). Další kapitoly se budou zabývat onemocněním zvaným fytoftorová krčková hniloba jahodníku (viz Obrázek 3), způsobená původcem *Phytophthora cactorum*, vyznačujícím se 20–50% škodami na výnosech a velkou rozdílností v citlivosti vůči účinným látkám fungicidů (Rebollar-Alviter et al. 2005).



Obrázek 3 Zdravý jahodník (1) versus napadený jahodník (2) patogenem *Phytophthora cactorum* (upraveno dle NOHEL GARDEN 2011)

3.2 Fytoftorová krčková hniloba jahodníku, původce onemocnění –

Phytophthora cactorum

3.2.1 Taxonomické zařazení patogena

Doména (nadříše) – *Eukaryota*

Superskupina (podříše) – SAR

Skupina (infraříše) – *Stramenopiles*

Třída – *Oomycetes*

Řád – *Peronosporales*

Čeleď – *Peronosporaceae*

Rod – *Phytophthora*

Druh – *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schrot. 1886

(National Center for Biotechnology Information 2020)

První zmínka o původci fytoftorové krčkové hniloby z třídy *Oomycetes* pochází z roku 1870, kdy vědci H. Lebert a F. Cohn pojmenovali původce kořenové hniloby kaktusů jako *Peronospora cactorum* (Lebert & Cohn 1870). Samostatný rod *Phytophthora* byl pojmenován v roce 1876 vědcem Antonem De Bary. Ten téhož roku determinoval dalšího zástupce rodu, a to *Phytophthora infestans*.

Dnes je známo, že tento patogen napadá více než 200 druhů rostlin patřící do 150 rodů a 60 tříd (Hill & Hausbeck 2008).

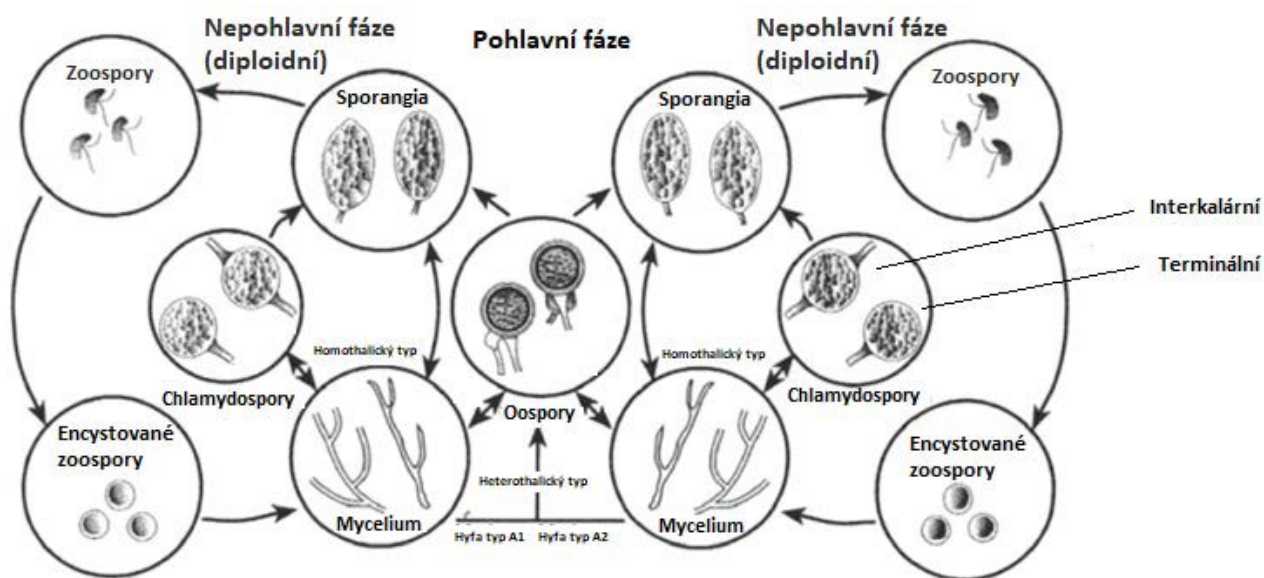
Patogen *P. cactorum* není v dnešním taxonomickém pojetí zařazen do říše hub (*Fungi*). Ačkoliv se podobá houbám v myceliálním růstu a způsobu výživy, na molekulární a morfologické úrovni byly zjištěny jisté odlišnosti (viz Tabulka 1), které zapříčinily zařazení patogena do výše zmíněného taxonomického zařazení (Heffer Link et al. 2002).

Tabulka 1 Biochemické odlišnosti *Oomycetes* versus houby (*Fungi*) (Němcová & Prášil 2010)

	<i>Oomycetes</i>	Houby (<i>Fungi</i>)
Výživa	Autotrofie	Heterotrofie
Buněčná stěna	Celulóza, další polysacharidy	Chitin
Zásobní látka	Mykolaminaran (β -1,3-polyglukan)	Glykogen
Syntéza lysinu	DAP (diaminopimelát)	AAD (aminoadipát)
Hlavní sterol	Fukosterol	Ergosterol
Kristy v mitochondriích	Trubkovité	Zploštělé

3.2.2 Životní cyklus a biologie patogena

Na Obrázku 4 je schématicky znázorněn životní cyklus patogenů z rodu *Phytophthora*. Během životního cyklu patogena dochází ke střídání diploidní a haploidní fáze, přičemž diploidní fáze převažuje (WIN-TIN 1973) a tím se rod *Phytophthora* odlišuje od hub, které jsou po většinu života haploidní (Lamour 2013).



Obrázek 4 Schématické znázornění životního cyklu patogenů z rodu *Phytophthora* (upraveno dle Lamour 2013)

Haploidní fáze je zastoupena pouze při průběhu pohlavního rozmnožování zvaného oogametangiogamie, jehož výsledkem jsou oospory (Němcová & Prášil 2010), kulovité útvary o velikosti 24–30 μm (Maas 1998). Z názvu lze odvodit, že se při oogametangiogamii jedná o splynutí dvou gametangií, a to samčího a samičího (antheridia a oogonia). Antheridia jsou obvykle monoklinní a paragynní, připojující se ke stěně oogonia v blízkosti jeho stopky (Hudler 2013).

Phytophthora cactorum je homothalický organismus (Yang et al. 2018), to znamená, že se gametangia opačných pohlaví mohou tvořit na téže hyfě, v téže kolonii. Po splynutí antheridia a oogonia plazmogamií a po karyogamii haploidních jader vznikne z oosféry oogonia diploidní oospora (Judelson 2009) chráněná původním obalem oogonia a novou vlastní stěnou (Blackwell 1943).

Oospory vzniklé pohlavní reprodukci jsou velmi odolné proti nepříznivým podmínkám prostředí, jako je mráz nebo sucho. Jsou dokonce schopny odolat i mikrobiální aktivitě organismů, proto dokáží přežít i několik let bez nutnosti stimulace rostlinnými exudáty a následného vyklíčení spory (Judelson 2009).

Oospora klíčí za vhodných podmínek hyfou se zakončením zvaným sporangium či tzv. zoosporangium (Gryndler & Němcová 2013). Vhodnými podmínkami pro vznik sporangií rozumíme dle Grove et al. (1985) ovlhčení po dobu 3–24 hodin při teplotě 15–25 °C. Nejvyššího optima s nejvyšší produkcí sporangií bylo dosaženo při ovlhčení více než 16 hodin při teplotě kolem 20 °C (Grove et al. 1985).

Hyfy, na kterých se dále tvoří sporangia, jsou nazývány sporangiofory. Zpravidla se jedná o útvary s průměrem o polovinu menším, než je hyfa, ze které sporangiofor pochází. Sporangia jsou na sporangioforech tvořena terminálně nebo interkalárně, jejich tvar je nejčastěji vejčitý, oválný až hruškovitý nebo sférický (Blackwell 1943), také mohou být zcela elipsoidní s rozměry $31,4 \pm 4,8 \times 26,4 \pm 4,0 \mu\text{m}$ (Krátká et al. 2008). Obsahují další haploidní útvary a to zoospory. Jedno sporangium může obsahovat až 50 zoospor (Maas 1998), které jsou uvolněny prasknutím ze zralého váčku sporangia. Sporangium lze považovat za zralé v některých případech již po 6 hodinách existence (Blackwell 1943). Tvorba zoospor je ovlivněna vlhkostí půdy a chladnější teplotou než byla potřeba pro tvorbu sporangií (Heffer Link et al. 2002).

Zoospory jsou uvolněny ze sporangia jako malé (11–18 μm), hruškovité, jednobuněčné útvary s absencí buněčné stěny (Ploetz 2003). Pro aktivní pohyb mají dva bičíky (Blackwell 1943) lišící se svou délkou. Bičík s mastigonematy ve směru pohybu je kratší, druhý bičík proti směru pohybu je čistě hladký (Erwin & Ribeiro 1996). Zoospory se pohybují na principu chemotaxe, tzn. jsou přitahovány na základě chemického potenciálu k rostlině vylučující organické látky do prostředí (Ploetz 2003). Dle Heffer Link et al. (2002) orientaci o poloze rostliny zprostředkovávají zoosporám především sacharidy a aminokyseliny. Je nezbytné, aby voda, ve které se zoospory přibližují k rostlině byla čerstvá a nezkažená jinak hrozí jejich úhyn (Blackwell 1943).

Po transportu zoospor k hostitelské rostlině dochází k iniciaci infekce a kolonizace zdravého rostlinného pletiva. Zoospory encystují, ztrácejí bičíky, vytváří se buněčná stěna a tvoří se klíční vlákno (Ploetz 2003).

Kolonizaci zdravého rostlinného pletiva zprostředkovávají hyfy, které se později formují do mycelia. Hyfy jsou tenké, velikostně variabilní (2–14 μm), pravoúhle se větvící a vykazující zúžení na bázi každé větve. Buněčné jádro nově vznikající hyfy je umístěno také poblíž báze a každé další se nachází ve vzdálenosti 10–20 μm . Mycelium není odděleno přepážkami, pouze vyplněné vakuolami (Blackwell 1943). Přepážky se tvoří jen v mladých

hyfách při pohlavním rozmnožování mezi jednotlivými gametangii, staré hyfy se reprodukce neúčastní (Lamour 2013).

V rámci životního cyklu se mohou ojediněle tvořit i útvary zvané chlamydospory. Podobně jako oospory jsou určeny k přežití patogena při nepříznivých teplotních podmínkách nebo při potížích s hostitelskou rostlinou (Serrano-Perez et al. 2017). Na rozdíl od oospor však mají chlamydospory jen jeden tlustý obal. Nejsou produktem pohlavního rozmnožování, proto jim chybí obal oogonia a nelze najít zbytek antheridia (Blackwell 1943). Velikostně jsou si ale velmi podobné – oospory měří 24–30 μm (Maas 1998), chlamydospory 25–39,5 μm (Krátká et al. 2008).

3.2.3 Infekční cyklus *P. cactorum* na jahodníku a příznaky onemocnění

Primárním inokulem je oospora čekající na vhodné klimatické podmínky a přítomnost hostitelských exudátů v půdě. Jakmile jsou podmínky splněny, oospora klíčí ve sporangium, z něhož jsou uvolňovány zoospory. Na základě chemotaxe a za pomoci bičíků jsou zoospory transportovány ke kořenům rostlin nebo dochází ke kontaktu s jinou částí rostliny, např. s plodem, který je následně infikován. Tuto fázi infekčního cyklu *P. cactorum* lze označit za primární infekci (The Ohio State University 2016).

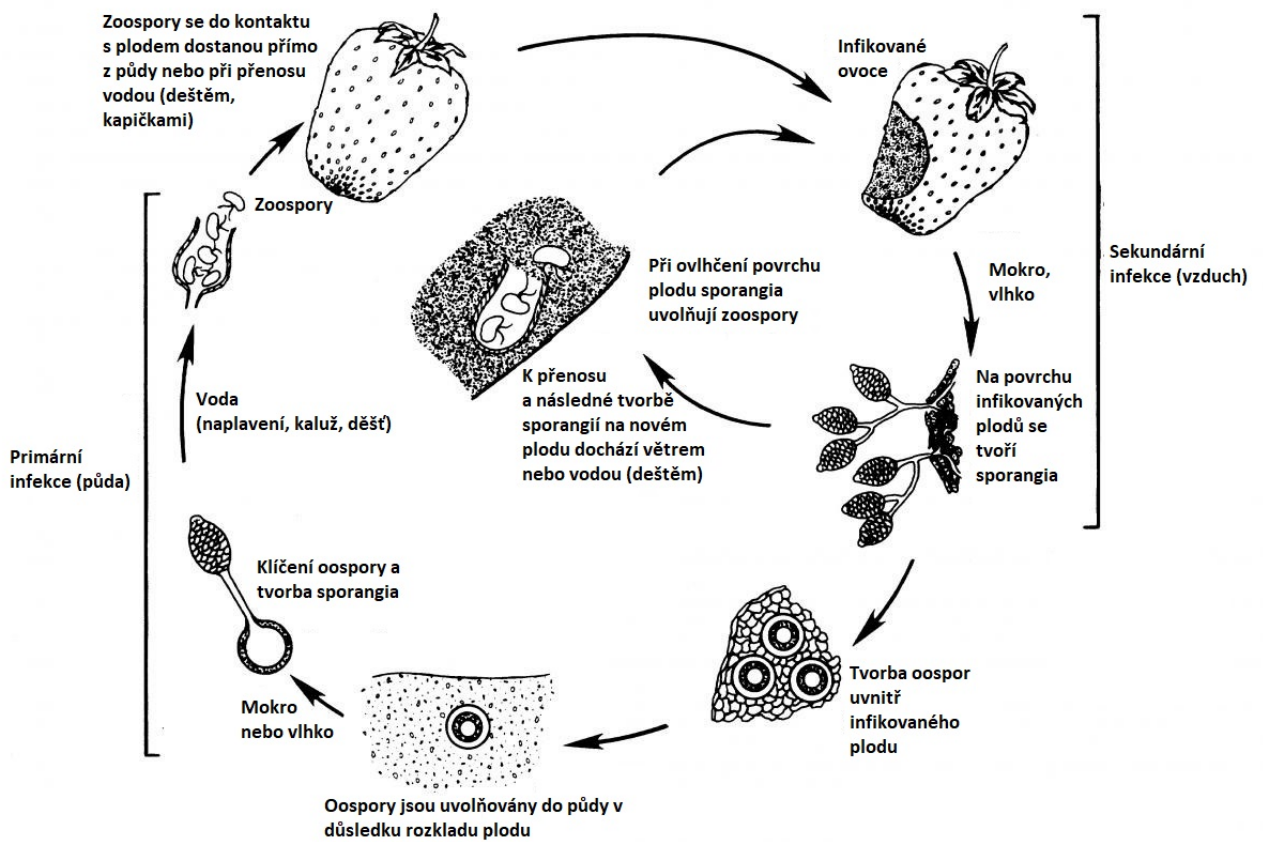
Napadá-li patogen plody jahodníku, za příznaky spojené s primární infekcí lze považovat diskolorace a změny na povrchu plodů. Nezralé infikované plody mají tmavě hnědou barvu a vypadají kožovitě. Naopak zralé plody mají jen lehké diskolorace v podobě bílých až nafialovělých skvrn, což působí velké problémy v jejich odlišení od zdravých plodů. Jejich pozdější identifikace je způsobena zápachem a nepříjemnou chutí, obzvláště pokud se dostanou do tržního oběhu a jsou z nich zpracovány potravinářské produkty (Rebollar-Alviter et al. 2005). Spolu se změnami na plodech se objevuje hniloba kořenů. Rostliny jsou v jejím důsledku chlorotické a často zakrňují v růstu. Infikované kořeny jsou měkké, vodnaté a zbarvené do tmavě hněda oproti zdravým bílým kořenům. Pokročilá infekce vede k úplnému omezení tvorby sekundárních a terciálních kořenů a končí degenerací kořenového systému (Drenth & Sendall 2001).

Sekundární infekce začíná formováním mycelia, sporangioforů a následně sporangií na infikovaném plodu za optimálních podmínek, tzn. vlhko a teplo. Ze sporangií se uvolňují

zoospory, které jsou následně větrem nebo vodou přenášeny na další jahodníky a ty jsou následně infikovány (The Ohio State University 2016).

Po dokončení vývojového cyklu patogena a kolonizování rostlin dochází k pohlavnímu rozmnožování a opětovné tvorbě oospor, které přežívají v půdě a slouží v budoucnu opět jako primární inokulum (The Ohio State University 2016).

Infekční cyklus patogena *Phytophthora cactorum* popisující vznik hniloby plodů na jahodníku je popsán na Obrázku 5 (The Ohio State University 2016).



Obrázek 5 Životní cyklus hniloby plodů způsobené patogenem *Phytophthora cactorum* na jahodníku (upraveno dle The Ohio State University 2016)

3.3 Metody ochrany proti původci fytoftorové hniloby

Při volbě ochranných prostředků proti škodlivým organismům je důležité vycházet z pokynů integrované ochrany rostlin (IOR). Jedná se o sjednocení jednotlivých opatření spojující nepřímé metody ochrany rostlin a následně, v případě potřeby, přímé metody ochrany rostlin (Kazda et al. 2010).

Integrovanou ochranu rostlin lze charakterizovat jako souhrn využívající všech ekonomických, ekologických a toxikologických požadavků pro udržení škodlivých organismů (ŠO) pod hranicí škodlivosti. Preferována jsou opatření využívající biologickou nebo nechemickou ochranu, tzn. metody přirozené regulace škodlivých organismů. Pokud tato opatření selžou, přistupuje se k ochraně chemické, tedy aplikaci pesticidů. Je důležité vybírat takové, které mají vysokou specifitu pro daný škodlivý organismus a spolu s tím mají co nejméně dopadů na lidské zdraví, životní prostředí a necílové organismy (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský 2020b).

Mezi základní komponenty IOR patří:

- metody ochrany užívané jako prevence proti vzniku onemocnění škodlivým organismem;
- užití prognóz a signalizace výskytu ŠO;
- sledování ekonomického prahu škodlivosti a rozhodnutí o ochraně;
- preference užití selektivních pesticidů, přirozených nepřátel ŠO, biologických prostředků a dalších strategií v ochraně rostlin před širokospektrálními pesticidy;
- využívání antirezistentních strategií a monitoring případného vzniku rezistence (Kocourek 2014).

Obecné zásady integrované ochrany rostlin jsou sepsány pro uživatele pesticidů a nachází se ve vyhlášce č.205/2012 Sb. k zákonu 326/2004 Sb. ve znění zákona č.191/2012 Sb. Vyhláška je platná od 18. 6. 2012 a nabyla účinnosti k 1. 1. 2014 (Ministerstvo vnitra České republiky 2012).

3.3.1 Nepřímé metody ochrany

Nepřímé metody ochrany mají preventivní charakter. Zahrnují metody agrotechnické, organizační a šlechtitelské (Kazda et al. 2010).

3.3.1.1 Agrotechnické metody ochrany

Jahodníky jsou obvykle pěstovány v režimu intenzivního zemědělství jako tříletá monokultura. Z tohoto důvodu je velmi důležitý výběr stanoviště, na kterém bude plodina pěstována, aby nedocházelo k abiotickým nedostatkům a stresům, a aby byl naopak zajištěn rychlý a bezproblémový vývoj rostliny (Mok et al. 2014). I přestože jsou jahodníky velmi přizpůsobivé ke klimatickým a půdním podmínkám, ukázalo se jako velmi vhodné jejich pěstování v nížinách do 600 m n. m., s vynecháním těžkých jílovitých a štěrkovitých půd (Dlouhá 2003). Položení plantáže by mělo být jihozápadním směrem, kde dochází ke střídání plného slunce a polostínu a drží se zde přiměřená vlhkost (Peiker 1962). Ovlhčení porostu by ale nemělo být dlouhodobějšího charakteru, protože tak dochází k podpoře rozvoje houbových onemocnění (Kazda et al. 2010). Jahodníky jsou teplomilné rostliny a preferují stanoviště s průměrnou roční teplotou kolem 20 °C (Dlouhá 2003). Pro klíčení spor patogena *P. cactorum* a iniciaci onemocnění je optimální teplota 21 °C (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský 2020c).

Před založením plantáže je velmi vhodné doplnit do půdy živiny s ohledem na víceletý charakter pěstování s omezením dodatečného doplňování živin v průběhu růstu rostlin. Jedná se jmenovitě o doplnění nebo o zvýšení obsahu organické hmoty na stanovišti a vyhnojení půdy fosforem, draslíkem a hořčíkem (je nutné vycházet z obsahu živin v půdě). Nezbytné je i vyvážení pozemku, pokud půdní pH není optimální pro pěstování a kvůli nasycenosti půdního sorpčního komplexu vápenatými a hořečnatými ionty (Vaněk et al. 2012).

Dle Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (2020c) jsou nejdůležitějšími faktory při dodržování preventivních metod proti fytoftorové hnilobě:

- zdravá a certifikovaná výsadba, tzn. bez obsahu škodlivých organismů (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský 2020c);
- vyloučení potenciaálně zamořených pozemků trvalými spory (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský 2020c); pokud je nezbytně nutná výsadba na rizikových

- pozemcích, je vhodné zvolit odolné odrůdy jahodníků, např. odrůda Karmen nebo Rumba, oproti náchylným, jako je např. odrůda Dagmar (JináZahrada 2020);
- dodržování osevního postupu, tzn. nařízený sled a střídání plodin (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský 2020c), zrušení plantáže do tří let po založení (Harant & Zacha 1975);
 - změna vodního režimu ve smyslu vyvarování se stojaté vody v porostu (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský 2020c), a to zřízením odtokových kanálů a svodů v meziřádcích (se šířkou minimálně 8 cm) ústících mimo stanoviště (Madden et al. 1991);
 - odstraňování napadených rostlin a jejich následná likvidace (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský 2020c).

3.3.1.2 Organizační metody ochrany

Organizační metody ochrany jsou definovány legislativou. Převážně se jedná o opatření proti zavlečení a šíření chorob na území České republiky, která jsou sepsána a podrobně charakterizována ve vyhlášce č. 5/2020 Sb., jejíž aktuální znění je účinné od 25. 1. 2020 do 12. 12. 2020. Obsahem vyhlášky jsou zejména nařízení týkající se importu a exportu rostlin a s nimi spojenými úkony, podrobností ohledně dopravy rostlinného materiálu (místo A, místo B, balení, kompetence přítomných osob, aj.) a vydávání osvědčení – tzv. rostlinolékařských pasů skládajících se z předvývozního osvědčení a rostlinolékařského dokladu o přesunu, jež informují profesionální provozovatele o provedení příslušných fyto-sanitárních postupů a nezávadnosti přepravovaného rostlinného materiálu (Ministerstvo vnitra České republiky 2019).

Velký důraz se klade především na opatření proti zavlečení a následnému šíření karanténních chorob. *Phytophthora cactorum* nepatří do této skupiny organismů, ale i na tohoto patogena, ostatně jako na všechny škodlivé organismy, se vztahují pravidla proti rozšíření onemocnění, aby se předešlo fatálnímu poničení rostlin a úrody. Preventivní a kurativní opatření jsou podrobně sepsána v kapitolách 3.3.1 Nepřímé metody ochrany a 3.3.2 Přímé metody ochrany. V souvislosti s vydáváním rostlinolékařských pasů souvisí testování a prohlídka nejen nezávadnosti rostlinného materiálu, ale také kontrola skladovacích prostor komodity, obalových materiálů, dopravních nebo přepravních prostředků, prohlídka místa pěstební plochy (jahodníkové plantáže) a s tím spojená kontrola náležitostí k provedenímu

ošetření (chemickému, biologickému, fyzikálnímu). Velký důraz je také kladen na znemožnění kontaminace škodlivými organismy při zpracování, balení a převozu nebo skladování rostlinných materiálů (Ministerstvo vnitra České republiky 2019).

3.3.1.3 Šlechtitelské metody ochrany a rezistence hostitelského druhu

V dnešní době je preferováno vysazování tolerantních či rezistentních odrůd kulturních rostlin. Vede to ke snížení užívání pesticidů, a tím pádem lze zaznamenat i pokles nákladů vynaložených na ochranu rostlin. Nejedná se ale o trvalé řešení, protože škodlivé organismy, proti kterým se šlechtění provádí, se stále přizpůsobují a po určitém čase jsou schopni prolomit ochrannou bariéru rostlin a daná odrůda se stává opět náchylnou (Kazda et al. 2010).

Šlechtitelská pracoviště se nachází po celé České republice, konkrétní pobočky zabývající se šlechtěním ovoce jsou následující – VŠÚ ovocnářský Holovousy, ŠS Těchobuzice, ŠS Velehrad a ŠS Velké Losiny. Odolné či rezistentní odrůdy si poté pěstitel může vybrat v Seznamu doporučených odrůd, který je každoročně aktualizován a vydáván Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským (ÚKZUZ). Minimální doba potřebná pro složení státních odrůdových zkoušek je 9–11 let. Poté smí být odrůda zařazena do seznamu a distribuována. K opětovné náchylnosti odrůd, dle autora, má dojít po 8–10 letech pěstování. Výchozí materiál pro šlechtění jahodníků, tzv. genové zdroje, byl nalezen v Severní Americe. (Chaloupek 2008). Genové zdroje zajistí potřebnou genetickou variabilitu sledovaného znaku s potencialem či aktuální hodnotou pro šlechtitelské účely (Food and Agriculture Organization 2001).

Pro evidenci všech genových zdrojů byl v České republice vytvořen samostatný Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiverzity, jehož cílem je uchovávat vegetativně, ale i semenně množené druhy rostlin, a tím zajišťovat potřebnou biodiverzitu rostlinných druhů (Dotlačil et al. 2013). Na tomto programu spolupracuje dvanáct českých institucí již od roku 1992 (Chaloupek 2008). Vegetativně množené materiály se uchovávají v polních genových bankách, *in vitro* podmínkách nebo v kryobankách. Úschovu semen zajišťují genové banky. Všechna data o rostlinných druzích a odrůdách, pasportová a popisná, jsou zanesena do informačního systému o genových zdrojích zvaného EVIGEZ – Evidence genetických zdrojů (Dotlačil et al. 2013) vyvíjeného od roku 1984 (Chaloupek 2008).

Rezistence je rozdělována na dvě formy a to:

- a) nespecifickou, horizontální – rostlina disponuje dlouhodobě schopností potlačit nebo zabrzdit vývoj škodlivého organismu vůči všem jeho rasám; průběh odpovědi na infekci je ale velmi pomalý, řízený ve velké míře vnějšími faktory a velkým množstvím genů (polygenně), proto je také velmi obtížné provést na tento druh rezistence šlechtění;
- b) specifickou, vertikální – rostlina je schopna odolat jen určité rase patogena, za to ale velmi rychle a s velkou účinností; odpověď na infekci je řízena oligenně (malým množstvím genů) nebo minorgenně (jedním genem), proto lze říci, že šlechtění na tento druh rezistence je snadno proveditelné, ale také patogenem snadno překonatelné (Umaerus & Umaerus 1994).

V průběhu infekce dochází k překonávání fyzikální bariéry hostitelské rostliny (buněčná stěna a cytosol) patogenem (Husaini et al. 2016). Při tomto ději rozpoznávají hostitelské receptory (PRRs) elicitory patogena (MAMPs, PAMPs) a dochází k vyhodnocování kompatibility obou jedinců pro vznik onemocnění. Pokud se jedná o hostitelskou rostlinu s R-geny a virulentního patogena je rostlinou šířen signál, že je nutné na škodlivý organismus použít příslušnou odpověď obranného systému a rozvíjející se infekci zastavit. V případě záporné odpovědi, zjednodušeně nehostitelská rostlina a avirulentní patogen, nedochází k rozpoznání a navázání vztahu (Věchet 2007; Husaini et al. 2016).

Obrannou odpovědí hostitelského druhu rostliny je kaskáda biochemických obranných mechanismů v čele s akumulací iontů v cytoplazmě (hlavně K^+ a Ca^{2+}), produkcí reaktivních forem kyslíku = ROS (peroxidu a superoxidu), zvýšené tvorbě ethylenu, kyseliny jasmonové a salicylové (složí jako přenašeči signálu, že je rostlina napadena), ale také strukturální obranné mechanismy jako například zesílení buněčné stěny v místě infekce (celulóza, lignin), zvýšení hustoty trichomů nebo obsahu kutinu atd. Tyto biochemické a strukturální změny vedou ke zpomalení či dokonce zastavení infekce v důsledku hypersenzitivní reakce u rostliny (Procházka et al. 1998; Věchet 2007; Husaini et al. 2016).

Odolnými odrůdami jahodníku vůči patogenu *P. cactorum* dle Rostlinolékařského portálu (2020) jsou: Elsanta, Senga Senga, Honeoye, Darselect, Korona, Pegasus, Dukat a Tenira. Podle studie Labanowska et al. (2004) jsou nejvíce odolné odrůdy Senga Senga, Dukat a Pegasus; naopak jako nejméně odolné jsou zde uváděny odrůdy Honeyone a Elsanta.

3.3.2 Přímé metody ochrany

Přímé metody ochrany rostlin se užívají kurativně či eradikativně, tzn. ve chvíli, kdy je populační hustota daného škodlivého organismu nad ekonomickým prahem škodlivosti a hrozí závažné škody na úrodě. Mezi tyto metody ochrany patří: mechanické, fyzikální, biologické a chemické. V návaznosti na výše zmíněná kurativní opatření je nezbytné užití monitoringu výskytu dané choroby, aby ochranné zásahy byly provedeny ve vhodnou dobu (Kazda et al. 2010).

3.3.2.1 Monitoring výskytu onemocnění

Obecně se monitoringem neboli signalizací rozumí sledování vývoje výskytu škodlivých organismů. K zakročení proti jejich přítomnosti na stanovišti dochází při překročení určité hranice, obecně označované jako práh škodlivosti. K předpovědi výskytu a vývoji populace škodlivých organismů jsou v dnešní době užívány počítačové programy, které vycházejí ze souborů dat z minulých let a díky nim jsou uváděny prognózy pro pěstitele (Park et al. 2008).

P. cactorum je patogen vyskytující se na těžších půdách. K šíření a rozvoji infekce dochází za deštivého a teplého počasí (Agromanuál.cz 2020a). Dle výsledků studie Grove et al. (1985) lze konstatovat, že největší podíl na rozvoji choroby má teplota (17–25 °C) a ovlhčení (postačí dvě hodiny), proto je velmi důležité dbát na preventivní metody ochrany (kapitola 3.3.1 Nepřímé metody ochrany) rostlin ještě předtím, než dojde k založení jahodníkové plantáže, ale i poté, co již založena byla.

3.3.2.2 Chemická ochrana

Chemické ošetření kulturních plodin fungicidy je důležitou součástí ochrany vedoucí k dobrému zdravotnímu stavu rostlin a odpovídajícímu výnosu (Kazda et al. 2010). Mechanismy účinku fungicidů mohou být různého typu. Účinné látky se vážou na jedno nebo i více vazebných míst v organismu patogena a následně dochází k inhibici syntézy látek potřebných pro život a rozvoj patogenního organismu (Matthews 2018). Dle Ústředního kontrolního a zkušebního zemědělského ústavu (2020c) se doporučuje ošetřit rostliny ve velmi raných fázích infekce k zajištění nejlepší účinnosti fungicidní ochrany. V případě fytoftorové krčkové hniloby je doporučováno ošetřovat sadbu namáčením do fungicidních přípravků nebo u mladých porostů užít zálivku. Pro namáčení sazenic před výsadbou není v České republice registrován žádný přípravek z řad syntetických fungicidů. Je zde ale možnost užít přípravků na

biologické bázi, viz kapitola 3.3.2.3 Biologická ochrana (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský 2020c).

P. cactorum, jak již bylo zmíněno, patří do třídy *Oomycetes*, na kterou působí fungicidně jen omezená škála účinných látek. Na patogeny z této třídy nelze použít inhibitory syntézy sterolů (SBI; DMI fungicidy, aminy, KRI fungicidy) kvůli limitované produkci sterolů původcem onemocnění, dále také nelze použít fungicidy na bázi elementární síry. Naopak se velmi osvědčilo užití QoI fungicidů (tzv. strobilurinů), fenylamidů a měďnatých fungicidů (Leitner 2020).

Dle studie Rebollar-Alviter et al. (2007) se z řad strobilurinů prokázaly jako velmi spolehlivé látky pyclarostrobin a azoxystrobin, které pozastavují rozvoj infekce po 13 hodinách od aplikace fungicidu. Jedná se o QoI (quinone outside inhibitor) inhibitory, to znamená, že systémově inhibují mitochondriální respiraci blokadou elektronového transportu komplexem III, vázaným na cílové místo k cytochromu bc1. V důsledku toho způsobují narušení životního cyklu patogena – jeho výživy, reprodukce a klíčení spor (Gisi et al. 2002; Ackermann 2013).

Další látky označené jako fungicidně účinné proti fytoftorové krčkové hnilobě jsou metalaxyl-M a fosetyl-aluminium, jež jsou aplikovány v raných fázích infekce. Pokud budou aplikovány v terminální nebo intermediální fázi infekce, nelze zaručit jejich účinek a ochranu rostliny před uhynutím a zničením úrody (Utkhede 1987; Ellis et al. 1998). Metalaxyl-M patří do skupiny fenylamidů, systémových fungicidů, narušujících biosyntézu nukleových kyselin [rRNA] (Ackermann 2013). Fosetyl-aluminium je fungicidní látka ze skupiny fosfonátů (etylfosfonáty) se specifickým účinkem ovlivňující metabolismus aminokyselin a skladbu bílkovin. Je přijímána nadzemními i podzemními částmi rostlin a systémově rozváděna do celé rostliny, kde potlačuje infekci zabráněním klíčení spor, tvorbě spor a růstu mycelia. Také stimuluje obranné mechanismy rostliny, například zvýšenou produkcí fytoalexinů. Fosetyl-aluminium je doporučeno aplikovat ve fázi dlouhivého růstu rostliny. Vyznačuje se dlouhodobým účinkem (Agromanuál.cz 2020b).

Skupinu karbamátů, konkrétně propamocarb, zkoumala studie Thomidis & Michailidis (2002). Bylo zjištěno, že vybraná účinná látka potlačila do určité míry rozvoj choroby, při maximálním dávkování, ale ne s takovou účinností jako výše zmíněné fungicidní látky. Měďnaté fungicidy zkoumané taktéž v této studii vykazovaly podobný účinek jako propamocarb (Thomidis & Michailidis 2002).

V České republice je registrován na ochranu jahodníků proti fytoftorové krčkové hnilobě pouze přípravek Aliette 80 WG s účinnou látkou fosetyl-aluminium (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský 2020c).

3.3.2.3 Biologická ochrana

Užití dostupných biologických preparátů by mělo být prvním krokem při ochraně rostlin (Dušková & Kopřiva 2009). Toto tvrzení vychází i z vyhlášky č.205/2012 Sb., ve které jsou sepsány obecné zásady integrované ochrany rostlin (Ministerstvo vnitra České republiky 2012). Jedná se o přípravky na bázi mikroorganismů, sekundárních metabolitů rostlin, parazitických hub či bakterií a v neposlední řadě přirozených nepřátel daného patogenního organismu. Při ošetřování plodin nedochází k ohrožení rostlin či pěstitelů toxicitou přípravku, nejsou ohroženy necílové organismy a cílový organismus je udržován pod hranicí prahu škodlivosti a není zcela vyhuben (Dušková & Kopřiva 2009).

Jediným registrovaným biologickým přípravkem v České republice proti původci fytoftorové krčkové hniloby je preparát Polyversum s účinnou látkou, respektive organismem *Pythium oligandrum* M1 (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský 2020c). Obsahuje spory výše zmíněného mykoparazitického organismu, který indukuje systémovou rezistenci hostitele (jahodníku) vůči patogennímu organismu (*P. cactorum*) v důsledku syntézy proteinů POD-1, POD-2, POS-1 a oligandrinu (Masunaka et al. 2010). Dochází tedy k posílení ochranných bariér hostitele vůči patogennímu organismu, ale *Pythium oligandrum* také napadá mycelium *P. cactorum*, rozkládá jej a užívá ke své vlastní výživě (Boček et al. 2013).

Polyversum je přípravek, který byl vyvinut v České republice a je zde nadále vyráběn firmou Biopreparáty s.r.o. (Boček et al. 2013).

3.4 Rezistence patogena *Phytophthora cactorum* k fungicidním látkám

Užití fungicidů, přípravků na ochranu rostlin proti houbovým chorobám, sahá daleko do historie lidstva (Kazda et al. 2010). Nejdříve se jednalo o aplikaci anorganických látek (měď, síra), později látek organických (ditiokarbamáty, fenylamidy, Qo inhibitory a inhibitory syntézy sterolů), které jsou v dnešní době používány s nejvyšší četností (Ministerstvo zemědělství 2020). Stále je zde však snaha o tvorbu přípravků s inovativním složením nebo s nově objevenou účinnou látkou, která s největší pravděpodobností bude pocházet z přirozeně se vyskytujících sloučenin, například strobiluriny pochází z houbového organismu s názvem penízovka nahořklá – *Strobilurus tenacellus* (Kazda et al. 2010).

Z hlediska místa účinnosti se fungicidy dělí na systémové a kontaktní. Kontaktní fungicidy, například na bázi síry, působí pouze na místech, které byly přípravkem ošetřeny. Nejde tedy jen o jedno místo, ale o větší plochu pokrytou fungicidním přípravkem. Atakují také více cílových míst v organismu patogena, a tím jsou mnohem méně náchylné na vznik rezistence. Naopak systémové přípravky působí jen na jedno cílové místo v organismu patogena a ač jsou účinnější a dají se využít jak preventivně, kurativně tak i eradikativně, tak jsou také náchylnější ke vzniku rezistence. Ze systémových přípravků používaných proti třídě *Oomycetes* mají nejvyšší riziko vzniku rezistence chemické látky ze skupiny acylalaninů (fenylamidy), konkrétně účinná látka metalaxyl-M (Ministerstvo zemědělství 2020).

Samotná rezistence patogena *P. cactorum* vůči fungicidům může být vrozená či získaná. U vrozené rezistence se jedná o stav, kdy daný škodlivý organismus vykazuje dědičné znaky rezistence proti určité skupině či určité účinné fungicidní látce. U třídy *Oomycetes* se jedná o vrozenou odolnost vůči inhibitorům syntézy sterolů. Naopak získaná rezistence je důsledkem nesprávného či dlouhodobého užívání jednoho druhu fungicidů. K získané rezistenci se pojí dva pojmy, a to cross-rezistence a multiple-rezistence. Cross-rezistence neboli křížová rezistence je označení pro odolnost patogenního organismu k jedné účinné látce, která následně buduje rezistenci k ostatním fungicidním látkám se stejným mechanismem účinku. Multiple-rezistence, taktéž vícenásobná rezistence, označuje stav, kdy je patogen rezistentní vůči dvěma fungicidním účinným látkám s různým mechanismem účinku. Je to důsledek dvou na sobě nezávislých mutací vzniklých při opakovaném používání daných fungicidních látek (Ackermann 2013). Ještě je zde možnost objevu negativní cross-

rezistence. Tato možnost odolnosti je ale velmi málo pravděpodobná. Jedná se tedy o rezistenci patogena k jedné fungicidní látce, doprovázenou citlivostí na látku pocházející z rozdílné skupiny účinných látek (Kazda et al. 2010).

Hlavním předpokladem vzniku rezistence u houbových patogenů je jejich vysoká přizpůsobivost k měnícím se podmínkám prostředí a rychlost reprodukčního cyklu (Kazda et al. 2010). Dalším rizikem jsou rezistentní jedinci vyskytující se v populaci patogenního organismu i bez předchozího užití fungicidu. Ač zpočátku nepatří k nejvíce vyskytovaným zástupcům, vlivem selekčního tlaku nabývají na početnosti a fungicidní ošetření ztrácí na účinnosti. Dalším předpokladem pro vznik rezistence je aplikace fungicidního přípravku s účinkem na jedno cílové místo v organismu patogena. Snadněji je tak prolomena bariéra mechanismu účinku fungicidní látky a daný přípravek ztrácí na účinnosti (Ackermann 2013).

3.4.1 Metody diagnostiky rezistence

Diagnostika odolnosti jednotlivých houbových patogenních organismů k fungicidům je prováděna v laboratorních podmínkách, spolu se skleníkovými a polními pokusy. Je nutné provést molekulárně biologické testy, které odhalí změnu v genomu patogena nebo zvolit metodu otrávených ploten, která odhalí účinnost fungicidních látek. Rezistenci škodlivých organismů nelze určit na základě symptomů vykazovaných napadenou kulturní plodinou po aplikaci fungicidu (Kazda et al. 2010).

3.4.2 Antirezistentní strategie

Snahy o omezení vzniku jedinců s rezistencí vůči fungicidům se nazývají antirezistentní strategie. Jedná se o soubor doporučených opatření, které vedou k předcházení či alespoň oddálení vzniku rezistence. Níže uvedené zásady jsou výsledkem práce organizace FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) zahrnující zástupce firem vyrábějící fungicidní látky s potenciálním rizikem vzniku rezistence (Ackermann 2013).

Doporučené zásady jsou následující:

- nesnižovat aplikovanou dávku přípravku;
- střídat přípravky s různými účinnými látkami a rozdílným mechanismem účinku;
- užití tank-mixů pouze v případě, že je to povoleno výrobcem a nepoužívat tank-mix s účinnými látkami, které mají tentýž mechanismus účinku;

- aplikace fungicidů pouze v případě, že byla překročena prahová hodnota (práh škodlivosti daného patogena);
- aplikaci fungicidního přípravku přizpůsobit klimatickým podmínkám;
- dodržet maximální počet ošetření povolený výrobcem za určitý časový úsek v průběhu vegetace;
- upřednostnit preventivní ošetření nad kurativním a eradikativním;
- minimalizovat aplikaci rizikového fungicidu v systému integrované ochrany rostlin (Ackermann 2013; Kocourek et al. 2015).

V případě podezření na vznik rezistence daného škodlivého organismu je nutné provést laboratorní testy pod vedením Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZUZ), která později pěstitele informuje o výsledku. V případě pozitivního testování je pěstitel nucen provést následující kroky:

- vyloučit fungicidní přípravky obsahující účinné látky, ke kterým byla zjištěna rezistence;
- zabránit pěstování stejných plodin ihned po sobě, dodržovat oseední postup;
- používat co nejširší spektrum dostupných fungicidů;
- opakovaně testovat v místě stanoviště přítomnost odolného kmenu patogena (Kazda et al. 2010).

4 Materiál a metody

4.1 Původ izolátů

Testování citlivosti izolátů *Phytophthora cactorum* k fungicidům bylo provedeno v laboratoři České zemědělské univerzity v Praze, konkrétně na katedře ochrany rostlin, v letech 2019–2020 v *in vitro* podmínkách. Sledování růstu mycelia a následné vyhodnocení citlivosti k rozdílným koncentracím účinných látek probíhalo metodou otrávených ploten.

Sběr rostlinného materiálu a následná izolace patogena z rostlinného materiálu nebyla součástí této diplomové práce. Materiály k přeočkování a následnému testování citlivosti byly poskytnuty Výzkumným ústavem rostlinné výroby v Ruzyni, v.v.i. (Ing. Ivanou Střížkovou a Ing. Matějem Pánkem, PhD.). Celkem bylo testováno dvacet izolátů získaných z infikovaných jahodníků nebo ze zeminy obsahující oospory patogena *P. cactorum*, které pocházely z dvanácti různých lokalit. Podrobnosti jsou popsány v Tabulce 2.

Tabulka 2 Lokality sběru izolátů *P. cactorum* a jejich příslušné označení pro identifikaci

	Označení izolátu	Lokalita sběru	Kraj	Firma
1	17_4_7b	Praha-Kunratice	Hlavní město Praha	Kunratické jahody
2	17_4_9	Praha-Kunratice	Hlavní město Praha	Kunratické jahody
3	17-7-27a	Předměřice nad Jizerou	Středočeský	Předměřická a.s.
4	18-07-2-s12	Předměřice nad Jizerou	Středočeský	Předměřická a.s.
5	18-10-12	Břežany	Středočeský	Berry Servis s.r.o.
6	18-10-18c	Břežany	Středočeský	Berry Servis s.r.o.
7	18-33-3	Šakvice	Jihomoravský	Prodej jahod od výrobce, Zdeněk Jakubčík
8	17-57-F1	Vraňany	Středočeský	Jahodárna Vraňany
9	17-37-7c	Nové Dvory	Ústecký	Jahodárna Brožany nad Ohří
10	17-37-7a	Nové Dvory	Ústecký	Jahodárna Brožany nad Ohří

	Označení izolátu	Lokalita sběru	Kraj	Firma
11	17-45-1B	Veselá u Semil	Liberecký	Jahody Veselá
12	17-12-18b	Plzeň 3- Doudlevce	Plzeňský	Jahodalera.cz
13	17-12-23	Plzeň 3- Doudlevce	Plzeňský	Jahodalera.cz
14	17-30-3	Svádov	Ústecký	Zahrada Svadov
15	17-30-13	Svádov	Ústecký	Zahrada Svadov
16	17-24-5c	Lotouš	Středočeský	Farma Lotouš
17	17-24-4	Lotouš	Středočeský	Farma Lotouš
18	17-26-14	Sedlčánky	Středočeský	Albaflor
19	17-15-10	Holešov	Zlínský	Vaklima s.r.o.
20	17-15-1	Holešov	Zlínský	Vaklima s.r.o.

4.2 Fungicidní látky

K testování citlivosti bylo vybráno pět účinných látek (Sigma-Aldrich) a jeden fungicid. Fungicidní přípravek Aliette 80 WG byl vybrán jako jediný v ČR registrovaný přípravek proti původci fytoftorové hniloby kořenů jahodníku. Výběr ostatních látek vycházel z registru jiných států či ze zmínek v publikacích, kde byl zkoumán účinek těchto látek vůči *P. cactorum* nebo jiným organismům ze třídy *Oomycetes*.

- **Metalaxyl-M**
 - o Fenylamid
 - o Dochází k narušení biosyntézy nukleových kyselin (rRNA)
 - o methyl-N-(2,6-dimethylfenyl)-N-(methoxyacetyl)-D-alaninát
- **Dimethomorph**
 - o Amid kyseliny karboxylové (CAA)
 - o Dochází k narušení biosyntézy fosfolipidů a jejich ukládání do buněčné stěny
 - o (E,Z) 4-[3-(4-chlorofenyl)- 3-(3,4-dimethoxyfenyl)acryloyl]morfolin
- **Propamocarb**
 - o Karbamát
 - o Narušuje syntézu fosfolipidů a mastných kyselin
 - o propyl 3-(dimethylamino)propylkarbamát
- **Cymoxanil**
 - o Acetamid (cyanoacetamid-oxim)
 - o Antisporulant, podpora hypersenzitivní hostitelské reakce
 - o 1-[(E/Z)-2-kyano-2-methoxyiminoacetyl]-3-ethylmočovina
- **Fenamidone**
 - o QoI (quinone outside inhibitor)
 - o Narušuje výměnu elektronů v mitochondriích (buněčné dýchání)
 - o (S)-1-anilino-4-fenyl-4-methyl-2-(methylsulfanyl)imidazol-5-(4H)-on
- **Aliette 80 WG**
 - o Fosfonát (etylfosfonát)
 - o Dochází k narušení syntézy aminokyselin, a tím i skladby bílkovin
 - o Obsahuje účinnou látku fosetyl-aluminium

(Ackermann 2013; Agromanuál.cz 2020c)

4.3 Příprava živného média

Množení a testy citlivosti izolátů patogena *P. cactorum* byly prováděny na V8 agaru. Na přípravu kultivačního média byly použity následující pomůcky:

- Erlenmayerovy baňky o objemu 500 ml
- Plastová kádinka o objemu nejméně 1000 ml
- Odměrný válec
- Lžička, váženka, alobal
- Digitální váhy
- Magnetická míchačka, magnetické míchadlo
- Autokláv nebo Papinův hrnec
- Potřebné množství V8 agaru

Na 1000 ml V8 agaru bylo potřeba namíchat následující látky v příslušném poměru:

- 200 ml V8 džusu
- 3 g CaCO_3 (uhličitan vápenatý)
- 16 g agaru
- 800 ml destilované vody

Nejprve byl navážen CaCO_3 ve výše uvedené gramáži. 200 ml V8 džusu bylo odměřeno v odměrném válci a nalito do příslušné plastové kádinky, kam byl následně nasypán i CaCO_3 a vloženo magnetické míchadlo. Kádinka se směsí byla umístěna po dobu 10–15 minut na magnetickou míchačku za účelem rozpuštění CaCO_3 . Po dobu mísení směsi byly připraveny čtyři Erlenmayerovy baňky o objemu 500 ml a do každé z nich navážen sypký agar o hmotnosti 4 g.

Po uplynutí doby potřebné k rozpuštění uhličitanu vápenatého (CaCO_3) ve V8 džusu byla do kádinky vlita destilovaná voda o objemu 800 ml. Poté byla směs opět ponechána na magnetické míchačce po dobu v řádech minut. 250 ml směsi bylo následně odměřeno odměrným válcem a vlito do Erlenmayerovy baňky o objemu 500 ml, tedy dvojnásobnému objemu média. Předchází se tak nežádoucímu vypěnění a vylití agaru do autoklávu nebo Papinova hrnce. Každá Erlenmayerova kádinka byla na závěr přikryta dvěma čtverci z alobalu a vložena buď do autoklávu, nebo do Papinova hrnce ke sterilizaci při teplotě 121 °C.

Po uplynutí doby potřebné ke sterilizaci V8 agaru byly baňky jednotlivě vyjmuty a ochlazovány. Teplota živného média by neměla přesáhnout cca 50 °C, aby nedošlo k degradaci fungicidních látek a znehodnocení testů citlivosti.

4.4 Přeočkování izolátů

Před samotným založením testů citlivosti je nutné přeočkovat izoláty, aby bylo užito co možná nejčerstvější a nejmladší mycelium a nedošlo ke zkreslení testování.

Pro přeočkování bylo potřeba následujícího materiálu:

- V8 agar
- Petriho misky o průměru 90 mm
- Plynový kahan
- Skalpel
- Denaturovaný ethanol ve skleněné kádince
- Flowbox
- Parafilm
- Termostat

Zchlazený V8 agar (příprava viz kapitola 4.1. Příprava živného média) byl postupně naléván ve flowboxu do jednotlivých Petriho misek. Na dvacet izolátů se třemi opakováními bylo potřeba 60 Petriho misek se ztuhlým živným médiem. To znamenalo přípravu 1 l směsi V8 agaru.

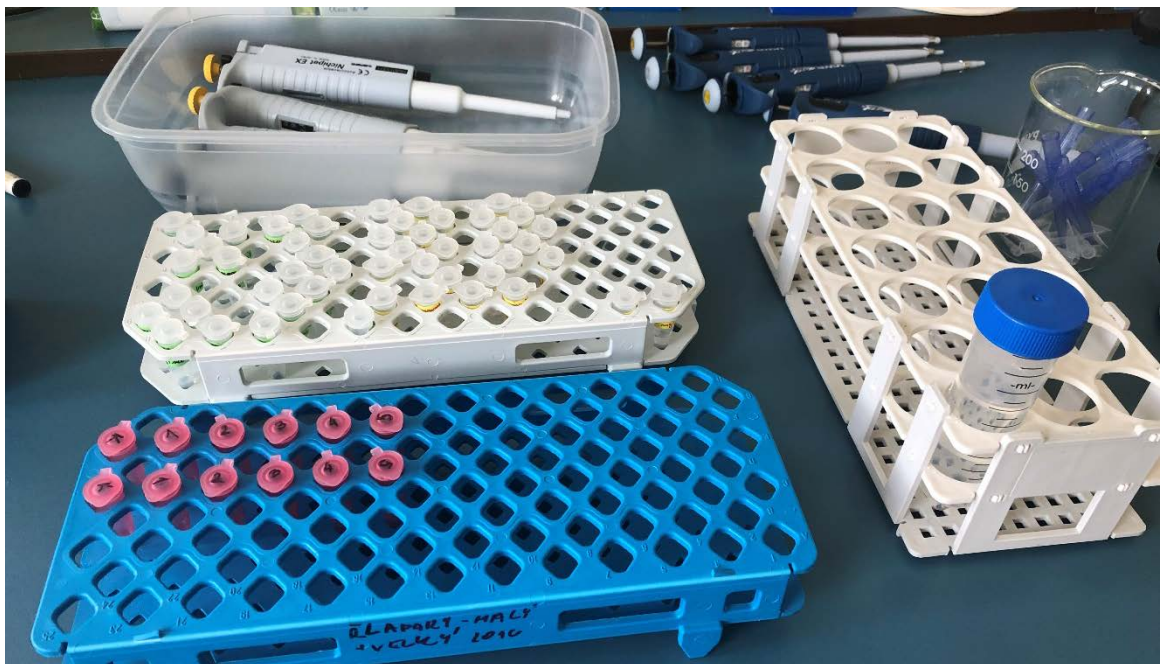
Do každé Petriho misky se ztuhlým V8 agarem byl skalpelem vložen vyříznutý čtverec z kraje Petriho misky původního izolátu. Každý izolát patogena byl tímto způsobem přeočkován na nové médium třikrát. Mezi přeočkováním jednotlivých izolátů byl skalpel sterilizován vložením do kádinky naplněné ethanolem do výšky cca 2 cm (aby došlo k ponoření ostří, které bylo užito pro přenos čtverce) a následným ožehnutím ohněm z plynového kahanu.

Po přeočkování byla každá Petriho miska omotána parafilmem, který zamezil průniku roztočů a možné kontaminaci nežádoucími škodlivými organismy. Poté byly izoláty vloženy do termostatu nastaveného na teplotu 20 °C, kde v průběhu kultivace ve tmě došlo k růstu mycelia. Nově vzniklé izoláty byly použity pro testy citlivosti k fungicidním látkám.

4.5 Založení testů citlivosti k fungicidním látkám

K založení testů citlivosti izolátů *Phytophthora cactorum* bylo potřeba následujícího materiálu:

- Přeočkované izoláty *Phytophthora cactorum* (viz kapitola 4.2. Přeočkování izolátů)
- Petriho misky o průměru 90 mm
- V8 agar v Erlenmayerových kádinkách
- Korkovrt
- Skalpel
- Skleněná kádinka s denaturovaným ethanolem
- Plynový kahan
- Pipety s různým rozsahem, příslušné špičky
- Parafilm
- Fungicidní látky
- DMSO (dimethylsulfoxid)
- Sterilní destilovaná voda
- Plastové mikrozkušavky
- Flowbox
- Termostat



Obrázek 6 Ředění účinných látek na požadovanou koncentraci za pomoci DMSO (dimethylsulfoxid)

Vybrané fungicidní látky vyjma fungicidu Aliette 80 WG byly naředěny v DMSO nejprve na zásobní roztoky o koncentraci 10 a 0,1 mg/ml. Následně byly tyto roztoky naředěny v plastových mikrozkušavkách (viz Obrázek 6) dle schématu uvedeného v Tabulce 3, tak aby bylo po přidání těchto roztoků do živného média dosaženo potřebných koncentrací uvedených v Tabulce 3 a 4. Přípravek Aliette 80 WG byl ředěn ve sterilní destilované vodě a pro testy citlivosti byly použity koncentrace uvedené v Tabulce 4.

Tabulka 3 Ředění účinných látek na požadovanou koncentraci

Varianta	Koncentrace (µg/ml)	Koncentrace účinné látky 10 mg/ml		Koncentrace účinné látky 0,1 mg/ml	
		Na 250 ml agaru		Na 250 ml agaru	
		Účinná látka (µl)	DMSO (µl)	Účinná látka (µl)	DMSO (µl)
K	0	0	250	0	250
1	0,001	-	-	2,5	247,5
2	0,01	-	-	25	225
3	0,1	-	-	250	0
4	1	25	225	-	-
5	10	250	0	-	-

Tabulka 4 Výsledné koncentrace fungicidních látek pro založení testů citlivosti

Fungicidní látka	Koncentrace (µg/ml)						
	K	1	2	3	4	5	6
Metalaxyl-M Dimethomorph Propamocarb Cymoxanil Fenamidone	0	0,001	0,01	0,1	1	10	-
Aliette 80 WG (fosetyl-Al)	0	0,001	0,01	0,1	1	10	100

Po naředění fungicidních látek na požadovanou koncentraci bylo nezbytné sterilizovat potřebné pomůcky pro založení testů citlivosti. Deska flowboxu byla otřena ethanolem, poté

na ni byl položen potřebný počet Petriho misek, kádinka s ethanolem, korkovrtem a skalpelem a bylo zapnuto UV světlo s časovačem na 15 minut. Po uplynutí doby nutné ke sterilizaci pomůcek byl na desku flowboxu položen stojan s rozředěnými fungicidními látkami. Dále bylo přikročeno k pipetování účinných fungicidních látek do připraveného agarů a k důkladnému rozmíchání směsi v Erlenmayerových kádinkách. Bylo také velmi důležité sledovat teplotu agarů, do kterého byly fungicidní látky pipetovány, aby nedošlo k jejich znehodnocení a následnému zkreslení výstupů.

Po důkladném rozmíchání směsi následovalo rozlévání média do připravených Petriho misek. Každá miska byla zvlášť popsána číslem izolátu, datem a variantou pro identifikaci a snadnou orientaci mezi vzorky. Poté co agar vychladnul a ztuhl, bylo možné přikročit k samotnému očkování jednotlivými izoláty *P. cactorum*. Výchozí miska s agarem a myceliem byla korkovrtem nařezána na potřebný počet terčků. Každý terčik byl skalpelem přenesen na misku s kultivačním médiem (agar, fungicidní látka v dané koncentraci, DMSO). Vše bylo provedeno ve třech opakováních. Kontrolní vzorky obsahovaly kultivační médium pouze s agarem a DMSO (viz Tabulka 3). Terčiky s myceliem z výchozích izolátů byly odebrány vždy z kraje Petriho misky.

Pro zamezení kontaminace po očkování terčiky s myceliem byly Petriho misky po obvodu dvakrát obaleny parafilmem. Dále byly uloženy do krabice s alobalem pro zamezení slunečního záření a uloženy do místnosti s konstantní laboratorní teplotou (cca 24 °C).

4.6 Vyhodnocení testů citlivosti

Pro vyhodnocení testů citlivosti byly použity následující pomůcky:

- Tmavá podložka (černá, modrá)
- Počítač s tabulkovým softwarem Microsoft Office Excel
- Digitální posuvné měřítko MITUTOYO 0–150/0,01 mm

Vyhodnocení bylo prováděno měřením radiálního růstu mycelia na ploše Petriho misky v živném médiu. Bylo sledováno, zda byl růst mycelia inhibován v důsledku přítomnosti určité koncentrace fungicidní látky či nikoliv. Měření bylo vždy provedeno po uplynutí doby cca 14 dní, kdy na kontrolních variantách bylo mycelium rozrostlé na celé ploše živného média.

Každé miska s myceliem byla měřena posuvným digitálním měřítkem připojeným k počítači, a s každým stlačením tlačítka pro zápis měření byla naměřená hodnota zapsána do souboru v tabulkovém softwaru Microsoft Office Excel. Měření bylo provedeno z protilehlých stran s opakováním. To znamená, že každá miska měla dvě naměřené hodnoty (průměry) v tabulkovém softwaru Excel, a každý izolát byl měřen ve třech opakováních.

Růst mycelia byl vyhodnocován ze spodní strany Petriho misky a proti černé nebo modré podložce kvůli lepší viditelnosti.

Naměřené hodnoty u jednotlivých izolátů byly zprůměrovány. Z každé hodnoty byly později vypočítány následující veličiny: MGI (inhibice růstu mycelia), EC_{50} (efektivní koncentrace fungicidní látky inhibující růst mycelia z 50 %) a MIC (minimální koncentrace fungicidní látky inhibující růst mycelia ze 100 %). Hodnoty MGI byly vypočítány za pomoci následujícího vzorce:

$$MGI \% = 100 - \left(\frac{dT}{dK} \times 100 \right)$$

kde:

dT = průměr mycelia (mm) testovaného izolátu na variantě s fungicidní látkou

dK = průměr mycelia (mm) testovaného izolátu na kontrolní variantě.

EC_{50} byla stanovena na základě regresní analýzy (inhibice růstu ku logaritmu koncentrací fungicidní látky). Pro výpočet hodnot EC_{50} byl použit statistický software GraphPad Prism8.

5 Výsledky

V této práci, jak je již uvedeno v kapitole 4 Materiál a metody, bylo testováno pět účinných látek a jeden fungicid v různých koncentracích (viz Tabulka 3 a Tabulka 4) na dvaceti izolátech pocházejících z infikovaných jahodníků nebo kontaminované zeminy sesbíraných z dvanácti různých lokalit pěstování jahodníku. Účinnost fungicidních látek byla ověřována *in vitro* testem na agaru obsahující V8 džus.

Ve výsledcích jsou výstupy, pokud je to možné, samostatně popsány tabulkou, popřípadě grafem s hodnotou EC_{50} a MIC v $\mu\text{g/ml}$.

5.1 Účinnost fungicidních látek

5.1.1 Metalaxyl-M

V Tabulce 5 jsou uvedeny hodnoty EC_{50} a MIC v $\mu\text{g/ml}$ u fungicidní účinné látky metalaxyl-M. U izolátů 17_4_7b, 17_4_9, 17-57-F1, 17-30-13, 17-24-5c a 17-15-10 nebylo možné stanovit hodnotu EC_{50} , protože koncentrace dané fungicidní látky nezpůsobila zastavení růstu mycelia z 50 %.

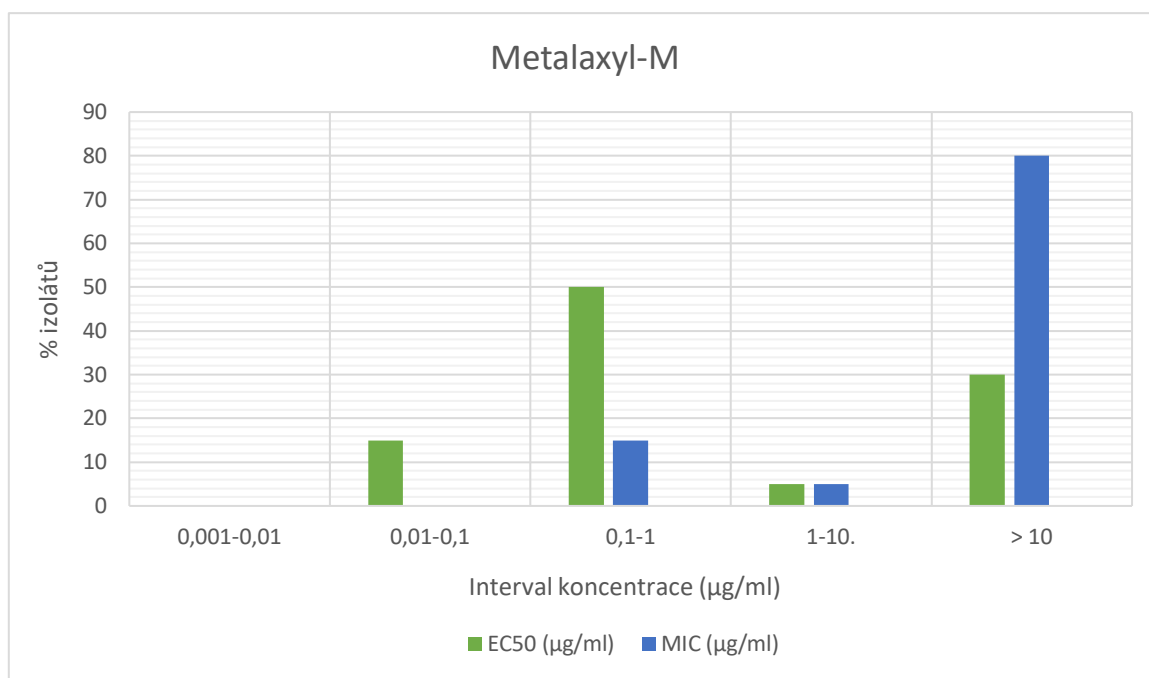
U izolátu 17-12-23, který je původem z lokality Plzeň 3-Doudlevec, byla stanovena nejnižší potřebná koncentrace pro zastavení růstu patogena z 50 %, a to ve výši 0,04373 $\mu\text{g/ml}$. Druhým izolátem s nejnižší hodnotou EC_{50} (0,04794 $\mu\text{g/ml}$) byl izolát 17-37-7a.

Nejvyšší koncentrace pro zastavení růstu patogena z 50 % byla zaznamenána u izolátu 18-33-3, kde by bylo nutné použít koncentraci látky metalaxyl-M ve výši 1,035 $\mu\text{g/ml}$. Tento izolát byl získán v lokalitě Šakvice v Jihomoravském kraji.

Minimální koncentrace inhibující růst mycelia ze 100 % v rozmezí koncentrací 0,1–1 $\mu\text{g/ml}$ byla zjištěna u izolátů 17-37-7a, 17-30-3 a 17-15-1. Druhou nejnižší hodnotou MIC disponuje izolát 17-12-23 s intervalem koncentrace v rozmezí 1–10 $\mu\text{g/ml}$. Všechny ostatní izoláty mají hodnotu inhibující růst mycelia ze 100 % nad maximální testovanou koncentrací, a to nad 10 $\mu\text{g/ml}$.

Tabulka 5 Hodnoty EC₅₀ a MIC účinné látky metalaxyl-M u jednotlivých izolátů *P. cactorum*

	Označení izolátu	EC ₅₀ (µg/ml)	MIC (µg/ml)
1	17_4_7b	-	> 10
2	17_4_9	-	> 10
3	17-7-27a	0,3149	> 10
4	18-07-2-s12	0,2403	> 10
5	18-10-12	0,2944	> 10
6	18-10-18c	0,8965	> 10
7	18-33-3	1,035	> 10
8	17-57-F1	-	> 10
9	17-37-7c	0,6886	> 10
10	17-37-7a	0,04794	0,1-1
11	17-45-1B	0,1058	> 10
12	17-12-18b	0,3282	> 10
13	17-12-23	0,04373	1-10
14	17-30-3	0,1245	0,1-1
15	17-30-13	-	> 10
16	17-24-5c	-	> 10
17	17-24-4	0,3509	> 10
18	17-26-14	0,6601	> 10
19	17-15-10	-	> 10
20	17-15-1	0,06975	0,1-1



Graf 1 Schématické vyjádření výsledků testů citlivosti u zkoumaných dvaceti izolátů vůči účinné látce metalaxyl-M s hodnotami EC₅₀ a MIC v (µg/ml)

V Grafu 1 jsou schématicky znázorněny výsledky zkoumaných izolátů spolu s hodnotami EC₅₀ a MIC v µg/ml. U většiny izolátů (80 %) se nepodařilo stanovit hodnotu MIC, protože se vyskytovala za hranicí maximální koncentrace účinné látky použité v této práci (10 µg/ml). Zbylé izoláty byly hodnotou MIC rozděleny do intervalu koncentrací 0,1–1 µg/ml (15 %) a jeden izolát disponoval hodnotou koncentrací v rozmezí 1–10 µg/ml (5 %). Hodnoty EC₅₀ byly ve 30 % případů nad maximální hranicí koncentrace užitě v této práci. U 50 % izolátů se hodnota EC₅₀ pohybovala v rozmezí koncentrací 0,1–1 µg/ml, u 15 % izolátů v intervalu 0,01–0,1 µg/ml a u nejmenšího počtu izolátů (5 %) se hodnota pohybovala v rozmezí koncentrací 1–10 µg/ml.

5.1.2 Propamocarb

U účinné látky propamocarb ze skupiny karbamátů nebylo možné u jednotlivých izolátů patogena *Phytophthora cactorum* stanovit hodnotu EC₅₀ (µg/ml), protože žádná koncentrace neinhibovala růst mycelia patogena z 50 % a více. Taktéž nebylo možné stanovit hodnotu MIC (µg/ml) u žádného z izolátů, protože u žádného z nich nebyl inhibován růst ze 100 %.

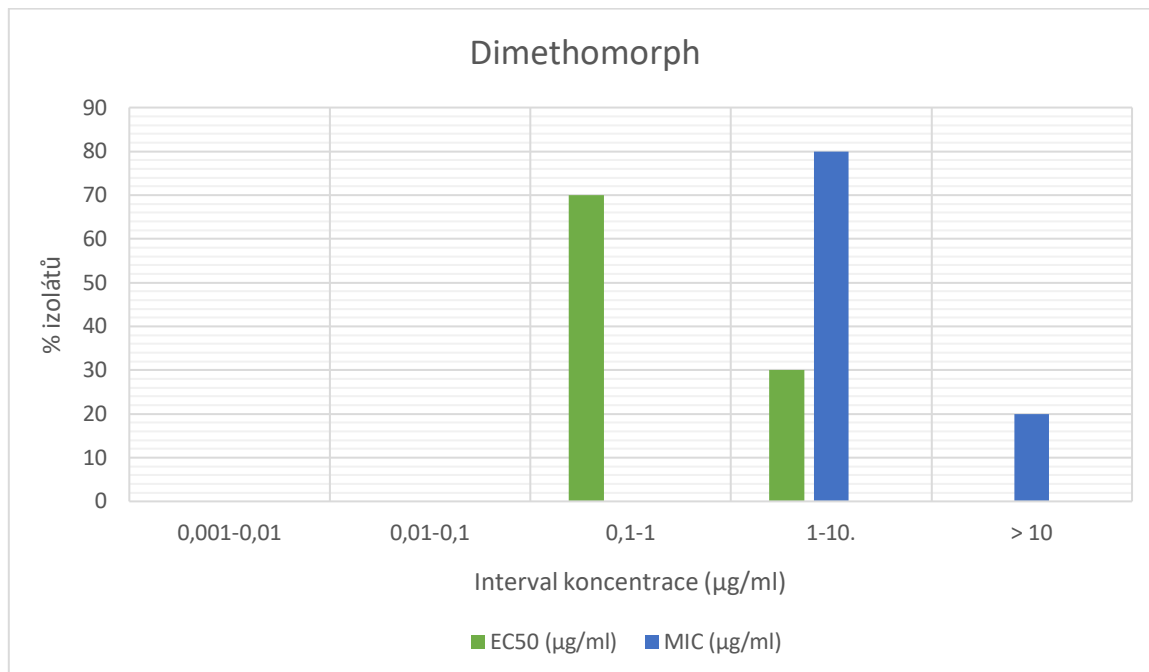
5.1.3 Dimethomorph

V Tabulce 6 jsou uvedeny hodnoty EC_{50} a MIC v $\mu\text{g/ml}$ pro jednotlivé izoláty. Nejnižší koncentrace pro hodnotu EC_{50} byla naměřena u izolátu 17_4_7b pocházejícího z lokality Praha-Kunratice, a to 0,4804 $\mu\text{g/ml}$. Naopak nejvyšší hodnoty EC_{50} byly naměřeny u izolátů 18-07-2-s12 (Předměřice nad Jizerou), 18-33-3 (Šakvice) a 17-24-4 (Lotouš), kde hodnota EC_{50} přesahovala koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$. Konkrétně nejvyšší hodnota koncentrace byla naměřena u izolátu 18-07-2-s12, kde $EC_{50} = 1,893 \mu\text{g/ml}$.

Tabulka 6 Hodnoty EC_{50} a MIC účinné látky dimethomorph u jednotlivých izolátů *P. cactorum*

	Označení izolátu	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
1	17_4_7b	0,4804	1-10
2	17_4_9	0,5806	1-10
3	17-7-27a	0,7514	1-10
4	18-07-2-s12	1,893	> 10
5	18-10-12	0,7657	1-10
6	18-10-18c	0,6335	1-10
7	18-33-3	1,671	> 10
8	17-57-F1	0,7179	1-10
9	17-37-7c	0,7049	1-10
10	17-37-7a	0,5742	1-10
11	17-45-1B	0,4824	1-10
12	17-12-18b	0,5981	1-10
13	17-12-23	0,5477	1-10
14	17-30-3	0,6964	1-10
15	17-30-13	0,5602	1-10
16	17-24-5c	0,8859	1-10
17	17-24-4	1,133	1-10
18	17-26-14	0,8288	1-10
19	17-15-10	0,6636	1-10
20	17-15-1	0,4966	1-10

Z Tabulky 6 lze vyčíst také hodnoty MIC, které se skoro u všech izolátů pohybují v rozmezí intervalu koncentrací 1–10 µg/ml. Pouze dva izoláty 18-07-2-s12 a 18-33-3 mají hodnotu koncentrací inhibující růst mycelia 100 % nad maximální testovanou koncentrací, tzn., že MIC > 10 µg/ml.



Graf 2 Schématické vyjádření výsledků testů citlivosti u zkoumaných dvaceti izolátů vůči účinné látce dimethomorph s hodnotami EC₅₀ a MIC v (µg/ml)

V Grafu 2 jsou schématicky znázorněny výsledky testovaných izolátů přiřazené k odpovídajícím hodnotám MIC a EC₅₀. Jen u velmi malého procenta izolátů (20 %) byla stanovena MIC, jejíž hodnota či interval hodnot přesáhl maximální koncentraci, která byla v této práci použita. U zbylých izolátů (80 %) byla hodnota MIC stanovena v intervalu koncentrací 1–10 µg/ml. U většiny izolátů (70 %) byla vypočítána EC₅₀ v rozmezí koncentrací 0,1–1 µg/ml, u zbylých 30 % izolátů se hodnoty EC₅₀ řadí do intervalu koncentrací 1–10 µg/ml.

5.1.4 Cymoxanil

U účinné látky cymoxanil nebylo možné stanovit efektivní koncentraci inhibující růst mycelia z 50 %. Důvodem je fakt, že žádná testovaná koncentrace nezpůsobila zastavení růstu patogena. Taktéž nebylo možné definovat hodnoty MIC, protože u žádného izolátu nedošlo ke 100% inhibici růstu. Hranice inhibice se pohybuje až za nejvyšší hranicí testované koncentrace (10 µg/ml).

5.1.5 Fenamidone

Fenamidone, fungicidní látka ze skupiny Qol, taktéž nezastavila myceliální růst patogena *P. cactorum*, proto nebylo možné stanovit hodnoty EC₅₀ ani MIC. Hodnota obou veličin se nejspíše pohybuje daleko nad hranicí maximální testované koncentrace (10 µg/ml).

5.1.6 Aliette 80 WG

U jediného použitého fungicidu v této práci, s účinnou látkou fosetyl-aluminium, nebylo možné taktéž jako u fungicidních látek propamocarb, cymoxanil a fenamidone určit potřebné hodnoty EC₅₀ a MIC. U žádného izolátu nedošlo při použití maximální možné hranice koncentrace fungicidu (100 µg/ml) k inhibici růstu patogena z 50 %, natož ze 100 %.

6 Diskuze

Snahy o ochranu jahodníku před původci chorob by měly vždy začínat u nepřímé ochrany, tzv. prevence před onemocněním (Ministerstvo vnitra České republiky 2012). Jelikož se jahodník řadí mezi monokultury, je nezbytné dbát na vhodný výběr stanoviště s dostatkem makro- i mikroživin, popřípadě je doplnit před založením plantáže (Vaněk et al. 2012; Mok et al. 2014). Je také vhodné použít odolné odrůdy jahodníků, které svou obrannou reakcí dokáží zpomalit či úplně zastavit rozvíjející se infekci patogena způsobující fytoftorovou krčkovou hnilobu jahodníku (Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský 2020c).

Pokud tyto snahy o nepřímou ochranu selžou, lze přistoupit k ochraně přímé (Ministerstvo vnitra České republiky 2012). Podle podstaty Integrované ochrany rostlin by měla být preferována ochrana biologická a až později, pokud tato nenabyde potřebného účinku, ochrana chemická (Dušková & Kopřiva 2009). V České republice se k použití biologického přípravku nabízí pouze preparát Polyversum (účinná látka *Pythium oligandrum*), který parazituje a rozkládá mycelium patogena *P. cactorum* a indukuje systémovou rezistenci jahodníku proti tomuto původci onemocnění (Masunaka et al. 2010; Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský 2020c).

Co se týče chemické ochrany, v první řadě je důležité dbát na správné užití přípravků a dodržovat antirezistentní strategii (Ackermann 2013). Vznik rezistence škodlivých organismů na účinné látky může být velmi rychlý, vzhledem k rychlosti rozmnožování patogena, jeho šíření a překonávání ochranných bariér rostlin (Kazda et al. 2010).

V této práci byla testována citlivost dvaceti izolátů patogena *Phytophthora cactorum*, sesbíraných z dvanácti různých lokalit České republiky k vybraným fungicidním látkám. Bylo vybráno pět účinných látek fungicidů a jeden fungicidní přípravek. Mezi vybranými fungicidními látkami byly metalaxyl-M, propamocarb, dimethomorph, cymoxanil a fenamidone. Zástupcem přímo z řad fungicidních přípravků byl přípravek Aliette 80 WG s účinnou látkou fosetylaluminium.

Při testech citlivosti byly sledovány hodnoty koncentrací účinných látek a s nimi spojené změny v myceliálním růstu patogena. S jistotou lze konstatovat, že nejnižší či v podstatě žádný inhibiční efekt na růst patogenního organismu měly účinné látky propamocarb, cymoxanil a fenamidone. Zde se nedala stanovit hodnota EC₅₀ ani MIC kvůli minimální změně v růstu mycelia.

Dle studie Thomidis & Michailidis (2002), ve které byla testována účinná látka propamocarb, bylo zjištěno, že v podmínkách *in vitro* by mělo být dosaženo mnohem větší účinnosti této látky než při jejím použití *in vivo*. V *in vivo* podmínkách byl použit rozsah koncentrací této látky 0, 10, 100, 500 a 1000 µg/ml, přičemž průměrné hodnoty EC₅₀ se pohybovaly okolo 30 µg/ml, která je ale mnohonásobně vyšší než koncentrace použité v této práci (10 µg/ml). Dále bylo zjištěno, že se stoupající koncentrací účinné látky taktéž nestoupá inhibiční efekt na růst mycelia (Thomidis & Michailidis 2002). Studie Hoover & Bates (2012) se přiklání publikovanými výsledky k této práci. Zde bylo taktéž dokázáno, že propamocarb má zanedbatelnou úlohu při ochraně rostlin v případě napadení patogenem *P. cactorum*. V této studii byl testován účinek fungicidní látky namáčením sadby do fungicidu Banol (není registrován v České republice) jako prevence proti vzniku fytoftorového onemocnění. Rostlina ale i po ošetření vykazovala velmi malé změny v případě příznaků v porovnání s kontrolní variantou, a posléze i v průběhu *in vitro* testování při měření růstu mycelia patogenního organismu nebyl zaznamenán inhibiční účinek látky v porovnání s kontrolní variantou (Hoover & Bates 2012).

Účinná látka cymoxanil byla zkoumána studií vedenou Thomidis & Elena (2001). Ač byla tato studie prováděna na broskvoních, a ne na jahodnicích, došla ke stejnému závěru, jaký uvádí tato práce. V laboratorních podmínkách, i v polních pokusech byla látka cymoxanil aplikovaná ve fungicidu Diametan (v České republice není registrovaný) o koncentraci 150 g/l shledána neúčinnou proti patogenu *P. cactorum*. Při laboratorních i polních pokusech nebyla zaznamenána rozdílnost oproti kontrole. Žádný z příznaků způsobený patogenem *P. cactorum* nebyl potlačen ani při takto vysoké dávce fungicidního přípravku. A při měření růstu mycelia byla tato skutečnost potvrzena.

Fenamidone, účinná látka ze skupiny QoI, byla zkoumána ve studii Hill & Hausbeck (2008). Studie nebyla opět prováděna na jahodnicích, nýbrž na jabloních a ženšenu, ale jednalo se o zkoumání totožného patogena, a to *P. cactorum*. Zde šlo o testování citlivosti dané fungicidní látky aplikované ve formě fungicidu s názvem REASON 500 SC (v České republice není registrovaný) v dávce 0,31 µg/ml. Výsledkem studie bylo konstatování, že účinná látka fenamidone ochrání jabloně proti onemocnění fytoftorovou hnilobou, a že ji dokonce předchází, jak ukazují výstupy zkoumání v porovnání s neošetřenou kontrolou. Oproti neošetřené kontrole měly ošetřené jabloně i nižší úmrtnost, a to o 75 %. U ženšenu bylo provedeno ošetření účinnou látkou fenamidone namáčením sadby. Bylo zjištěno, že po

ošetření je úmrtnost rostlin nulová, oproti neošetřené kontrole, a účinná látka obsažená ve fungicidu se jeví jako velmi účinná k předcházení fytoftorového onemocnění. Zde se ale studie rozchází s touto prací. Je možné, že tato rozdílnost je způsobena smáčedly a přídatnými látkami v použitém fungicidu REASON 500 SC, který ale v České republice není registrovaný, a proto nemohl být použitý pro zkoumání citlivosti fungicidních látek k izolátům *P. cactorum* v této práci. Dále je také nutné brát v potaz rozdílnost podmínek, za které byly obě práce prováděny. Pro budoucí práce by bylo vhodné ke zvážení, zda účinnou látku fenamidone nezkoumat *in vivo*, a potvrdit či vyvrátit tím její účinky na patogena *P. cactorum*.

Dalšími účinnými látkami testovanými na citlivost vůči izolátům patogena *P. cactorum* byly v této práci metalaxyl-M a dimethomorph. Jedná se o látky ze skupin fenylamidů a amidů kyseliny karboxylové (CAA). Tyto dvě fungicidní látky, jak ukazují výsledky uvedené v této práci, viz kapitola 5.1. Účinnost fungicidních látek, prokázaly fungicidní účinek vůči patogenu *P. cactorum* při testování v podmínkách *in vitro*. Účinná látka dimethomorph vykazuje vyšší účinnost a nižší průměrné hodnoty MIC v $\mu\text{g/ml}$ oproti účinné látce metalaxyl-M. K účinné látce dimethomorph taktéž nebyla dosud zjištěna rezistence patogena *P. cactorum* oproti fungicidní látce metalaxyl-M, kterou ve své práci zmiňují Hill & Hausbeck (2008).

V této práci bylo dokázáno, že vybrané izoláty patogena *P. cactorum* jsou vůči účinné látce metalaxyl-M užití v maximální možné koncentraci pro testy citlivosti ($10 \mu\text{g/ml}$) rezistentní, respektive ani nejvyšší koncentrace účinné látky vůbec neinhibovaly růst mycelia. Jedná se o následujících šest izolátů: 17_4_7b, 17_4_9, 17-57-F1, 17-30-13, 17-24-5c a 17-15-10. U žádného z nich se nebylo možné určit hodnotu EC_{50} a hodnotu MIC lze stanovit až za hranicí maximální testované koncentrace, tzn. $> 10 \mu\text{g/ml}$. U ostatních izolátů byla průměrná hodnota EC_{50} rovna $0,3715 \mu\text{g/ml}$, ale hodnota MIC přesahovala maximální možnou koncentraci užitou v této práci. Pouze u izolátů 17-37-7a, 17-30-3 a 17-15-1 byl růst mycelia inhibován ze 100 % v koncentraci účinné látky v rozmezí $0,1\text{--}1 \mu\text{g/ml}$ a u izolátu 17-12-23 v koncentraci účinné látky v rozmezí $1\text{--}10 \mu\text{g/ml}$. Podle studie Ellis et al. (1998) se za neúčinnější látky užívané proti fytoftorové krčkové hnilobě považují metalaxyl-M a fosetyl-aluminium (účinná látka fungicidu Aliette 80 WG), pokud je účinná látka metalaxyl-M aplikována před květem nebo do rozkvetu 10 % květů. Tato studie taktéž uvádí, že v rámci antirezistentních strategií je vhodné střídat tyto dvě zmíněné účinné látky kvůli jejich rozdílnému mechanismu účinku. Ale ve výsledku bude plodina chráněna obdobně (Ellis et al. 1998). Studie Thomidis & Michailidis (2002) dokonce udává, že účinná látka

metalaxyl-M byla jediným fungicidním přípravkem, u kterého postačila dávka doporučená výrobcem pro zastavení rozvoje fytoftorové hniloby. A práce autorů Thomidis & Elena (2001) dodává, že při aplikaci fungicidní látky metalaxyl-M do substrátu byla zastavena infekce patogenem *P. cactorum* a takto ošetřené rostliny byly bez příznaků fytoftorové hniloby po dobu 21 dní. Z výše uvedeného souhrnu vyplývá, že fungicidní látka metalaxyl-M je velmi účinná vůči patogenu *P. cactorum*. Aby její účinnost byla zachována, musí se dbát na dodržování zásad antirezistentní strategie uvedených v kapitole 3.4.2 Antirezistentní strategie. Z výsledků této práce však vyplývá, že pokud jde o účinnost látky metalaxyl-M, tak je velmi variabilní. U některých izolátů byla stanovena hodnota EC_{50} v setinách $\mu\text{g/ml}$, u některých v řádech desetin $\mu\text{g/ml}$. U šesti izolátů nebylo možné hodnotu EC_{50} vůbec stanovit. Rovněž hodnoty MIC se u 80 % izolátů pohybují až za maximální hranicí testované koncentrace ($> 10 \mu\text{g/ml}$).

Další účinnou látkou testovanou v této práci s výsledným velmi dobrým inhibičním efektem na rozvoj patogena *P. cactorum* je dimethomorph. Průměrná hodnota EC_{50} byla v této práci vyhodnocena ve výši $0,7833 \mu\text{g/ml}$. Je to poněkud vyšší koncentrace než byla stanovena u předchozí fungicidní látky metalaxyl-M, ale k inhibici růstu z 50 % a více došlo u všech dvaceti izolátů, kdežto u metalaxylu-M nebylo možné tuto hodnotu stanovit u šesti izolátů. Taktéž hodnota MIC byla stanovena u skoro u všech izolátů v rozmezí koncentrací $1\text{--}10 \mu\text{g/ml}$, kromě dvou izolátů (18-07-2-s12 a 18-33-3), které měly hodnotu MIC vyšší, než je nejvyšší možná koncentrace, se kterou se v této práci testovalo, a to $> 10 \mu\text{g/ml}$. Dimethomorph má taktéž oproti metalaxyl-M výhodu, že k němu zatím není zjištěna rezistence (Hill & Hausbeck 2008) a výsledky v této práci toto tvrzení podporují. Ve studii Thomidis & Elena (2001) je ale uváděno, že při použití účinné látky dimethomorph není dosaženo takového účinku jako při použití fungicidní látky metalaxyl-M. Dimethomorph dokáže inhibovat rozvoj patogena *P. cactorum*, ale ne v takové míře jako metalaxyl-M nebo Aliette 80 WG (fosetyl-aluminium). Naopak v práci publikované Erwin & Ribeiro (1996) se dimethomorph spolu s účinnou látkou cymoxanil řadí mezi nejvíce účinné fungicidní látky proti hnilobám způsobeným *Phytophthora* spp. Thomidis & Elena (2001) ale oponují, že při jejich výzkumu nebyla účinná látka dimethomorph nijak zvláště účinná jak v laboratorních, tak v polních podmínkách, a to při maximální povolené koncentraci (dimethomorph + propineb 150 g/l). Studie Hill & Hausbeck (2008) uvádí, že při použití účinné látky dimethomorph byly spatřeny rozdíly mezi neošetřenou kontrolou a ošetřeným vzorkem. Po aplikaci účinné látky dimethomorph byla rostlina chráněna proti

patogenu *P. cactorum* a rozvoj škodlivého organismu byl inhibován. Pro ošetření zde byl použit fungicid ACROBAT 50 WP (není v této formě registrovaný v České republice) s účinnou látkou dimethomorph v koncentraci 0,48 g/l. K této fungicidní látce lze konstatovat, že vzhledem k proměnlivým závěrům zmíněných prací záleží zřejmě opět na podmínkách, ve kterých byla studie prováděna, na poskytnutém materiálu a izolátech *P.cactorum*. V této práci je dimethomorph nejvíce účinnou látkou proti patogenu *P. cactorum*. Toto tvrzení vyplývá ze získaných výsledků, které jsou oproti výsledným hodnotám EC₅₀ a MIC účinné látky metalaxyl-M stabilní. U 80 % izolátů byla stanovena hodnota MIC v rozmezí koncentrací 1–10 µg/ml a u 70 % hodnota EC₅₀ v intervalu koncentrací 0,1–1 µg/ml.

Jediným použitým fungicidem v této práci je přípravek Aliette 80 WG, s účinnou látkou fosetyl-aluminium. Důvodem je, že je jediným fungicidem registrovaným na ochranu jahodníků proti patogenu *Phytophthora cactorum*. V tomto případě ale nebyly pokusy o inhibici růstu patogena *P. cactorum* úspěšné. Nepodařilo se zastavit rozvoj patogena z 50 %, natož ze 100 %. Hodnoty EC₅₀ ani MIC nebylo možné stanovit, jelikož se nacházely nad maximální koncentrací, která byla použita v této práci (100 µg/ml).

Výsledky této diplomové práce lze také porovnat s výsledky diplomové práce Baudyšové (2019). V její práci byla také testována citlivost izolátů patogena *P. cactorum* ke stejným fungicidním látkám, které byly vybrány pro testování v této práci (chybí jen azoxystrobin). Také koncentrace účinných látek byla totožná. U fungicidních látek propamocarb, cymoxanil a fenamidone bylo dosaženo totožných výsledků jako v této práci. Hodnoty EC₅₀ a MIC se nedaly stanovit, protože pravděpodobně leží nad maximální koncentrací použitou k testování v této práci. Účinné látky metalaxyl-M a dimethomorph také prokázaly fungicidní účinek vůči izolátům *P. cactorum*. Metalaxyl-M se v této práci jeví jako účinnější oproti práci Baudyšové (2019), kde u 19 izolátů byla hodnota EC₅₀ vyšší než nejvyšší použitá koncentrace (> 10 µg/ml). V této práci se alespoň u 10 izolátů hodnotu EC₅₀ podařilo vypočítat, a to v rozmezí koncentrace 0,1–1 µg/ml. Látka dimethomorph dosahuje obdobných výsledků v obou pracích. To se ale ovšem nedá konstatovat o fungicidu Aliette 80 WG s účinnou látkou fosetyl-aluminium. V této práci byl sledován tento přípravek jako neúčinný při maximální použité koncentraci (100 µg/ml), která neměla žádný inhibiční účinek na izoláty patogena. Avšak v práci (Baudyšová 2019) je vyhodnocen jako jedna z neúčinnějších fungicidních látek z výše vybraných. Jeho hodnoty EC₅₀ byly stanoveny v rozmezí koncentrací

1–10 µg/ml (7 izolátů) a 10–100 µg/ml (7 izolátů) a hodnoty MIC v rozmezí koncentrací 0,1–1 µg/ml (9 izolátů) a 1–10 µg/ml (7 izolátů).

Důvodů, proč Aliette 80 WG neinhiboval růst mycelia patogena může být několik. V zemědělské praxi se při aplikaci přípravku na jahodníky používá dávka postřikové jichy o objemu 1000 ml/ha s koncentrací fungicidu 0,25 % v případě namáčení sazenic a 1 % v případě závlivky, což odpovídá koncentraci účinné látky 2000 µg/ml (máčení) a 8000 µg/ml (závlivka). V důsledku ale opět budou všechny směřovat k dodržování zásad antirezistentní strategie, uvedených v kapitole 3.4.2 Antirezistentní strategie. Dalším důvodem může být tvrzení zmíněné na začátku odstavce, že na ochranu proti fytoftorové krčkové hnilobě na jahodníku je registrován pouze tento fungicid s příslušnou účinnou látkou a citlivost jednotlivých izolátů patogena *P. cactorum* k fungicidu mohla být touto skutečností narušena. Ve studiích Hill & Hausbeck (2008), Thomidis & Michailidis (2002), Thomidis & Elena (2001) nebo Utkhede (1987) byl totiž fungicid Aliette 80 WG shledán velmi vhodným přípravkem na ochranu rostlin proti patogenu *P. cactorum*, a to jak v preventivní aplikaci, tak v kurativní, protože po aplikaci docházelo k inhibici růstu mycelia patogena a ochraně před samotnou infekcí.

7 Závěr

V této práci byla testována účinnost celkem pěti účinných látek (metalaxyl-M, propamocarb, dimethomorph, cymoxanil a fenamidone) a jednoho fungicidu (Aliette 80 WG s účinnou látkou fosetyl-aluminium), a to v rozdílných koncentracích na dvaceti získaných izolátech patogena *Phytophthora cactorum*.

Vědecká hypotéza této diplomové práce byla založena na tvrzení, že v populaci patogena *Phytophthora cactorum* existují izoláty vyznačující se různou úrovní citlivosti k fungicidním látkám a *vice versa* existují fungicidní látky, které se vyznačují různým inhibičním účinkem na růst izolátů patogena *Phytophthora cactorum*. Hypotéza je na základě výsledků z předchozích kapitol potvrzena. Stejně tak jako je splněn cíl práce, ve kterém měla být porovnávána citlivost izolátů k fungicidním látkám a jejich vliv na růst patogena *Phytophthora cactorum*.

Nejnižší či skoro žádná citlivost izolátů patogena byla zjištěna vůči fungicidním látkám propamocarb, cymoxanil a fenamidone, u kterých nebylo možné určit efektivní koncentraci inhibující růst mycelia z 50 % (EC_{50} v $\mu\text{g/ml}$) ani minimální koncentraci inhibující růst mycelia ze 100 % (MIC v $\mu\text{g/ml}$). Stejně tak nebylo možné stanovit hodnoty EC_{50} a MIC v $\mu\text{g/ml}$ u fungicidu Aliette 80 WG. U všech těchto látek ležely požadované hodnoty za maximální koncentrací (účinné látky 10 $\mu\text{g/ml}$, fungicid 100 $\mu\text{g/ml}$) užitou v této práci.

Naopak nejvyšší citlivost izolátů byla prokázána u účinné látky dimethomorph. Nejúčinnější rozmezí koncentrací, ve kterém došlo alespoň k 50% inhibici růstu mycelia patogena *P. cactorum* u 70 % izolátů, bylo rozmezí 0,1–1 $\mu\text{g/ml}$. Zbýlých 30 % izolátů bylo z 50 % růstu inhibováno v intervalu koncentrací 1–10 $\mu\text{g/ml}$. U 80 % izolátů byla MIC stanovena v rozmezí koncentrací 1–10 $\mu\text{g/ml}$.

Druhou fungicidní látkou s prokázaným fungicidním efektem byl metalaxyl-M. Zde byla nejvyšší účinnost látky v rozmezí koncentrací 0,1–1 $\mu\text{g/ml}$, kde došlo k zastavení růstu mycelia alespoň z 50 % u 50 % izolátů, a v tom samém intervalu koncentrace došlo ke 100% inhibici růstu mycelia u 15 % izolátů.

Vzhledem k získaným výsledkům je také nutné položit si otázku, zda opravdu izoláty *P. cactorum* jsou vůči zmíněným účinným látkám rezistentní, či zda jen tyto látky postrádají účinnost vůči tomuto patogenu.

8 Literatura

- Ackermann P. 2013. Problematika rezistence oomycet a houbových patogenů révy k fungicidům a antirezistentní strategie. Brno. Available from http://www.ekovin.cz/uploads/Soubory/rezistence_2013_11_03.pdf.
- Agromanuál.cz. 2020a. Fytophthorová hniloba rhizomů. Available from <https://www.agromanual.cz/cz/atlas/choroby/choroba/fytophthorova-hniloba-rhizomu-a-plodu-jahodniku>.
- Agromanuál.cz. 2020b. Fungicidy. Available from <https://www.agromanual.cz/cz/pripravky/fungicidy/fungicid/aliette-bordeaux>.
- Agromanuál.cz. 2020c. Přípravky a účinné látky. Available from <https://www.agromanual.cz/cz/pripravky/ucinne-latky>.
- Baudyšová V. 2019. Citlivost izolátů patogena *Phytophthora cactorum* k vybraným fungicidním látkám. Česká zemědělská univerzita v Praze.
- Blackwell E. 1943. THE LIFE HISTORY OF PHYTOPHTHORA CACTORUM (LEE. & COHN) SCHROET. Transactions of the British Mycological Society **26**:71–89.
- Boček S, Salaš P, Sasková H, Mokričková J. 2013. Effect of Alginure® (seaweed extract), MycoSin® VIN (sulfuric clay) and Polyversum® (*Pythium oligandrum* Drechs.) on yield and disease control in organic strawberries. Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis **60**:19–28.
- Chaloupek O. 2008. Genetická diverzita, šlechtění a semenářství. Academia.
- Chaoluan L, Ikeda H, Ohba H. 2003. 39. FRAGARIA Linnaeus, Sp. Pl. 1: 494. 1753. Flora of China **9**:335–338. Available from <http://flora.huh.harvard.edu/china/PDF/PDF09/Fragaria.PDF>.
- Dlouhá J. 2003. Pěstujeme jahodník, maliník a ostružiník. Brázda, Praha.
- Dotlačil L, Holubec V, Papoušková L. 2013. Genetické zdroje rostlin v ČR – historie a současnost. Pages 10–19 in L. Papoušková, editor. Genetické zdroje rostlin v ČR po 20 letech existence Národního programu, VÚRV. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Praha - Ruzyně, Praha. Available from <https://www.vurv.cz/sites/File/Publications/ISBN978-80-7427-152-6.pdf>.
- Drenth A, Sendall B. 2001. Practical guide to detection and identification of *Phytophthora*. CRC for Tropical Plant Protection, Brisbane, Australia.

- Dušková L, Kopřiva J. 2009. Ochrana rostlin proti chorobám a škůdcům. Grada. Available from <https://books.google.cz/books?id=p0frxijBt4IC>.
- Ellis MA, Wilcox WF, Madden L V. 1998. Efficacy of Metalaxyl, Fosetyl-Aluminum, and Straw Mulch for Control of Strawberry Leather Rot Caused by *Phytophthora cactorum*. *Plant disease* **82**:329–332. United States.
- Erwin DC, Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora diseases worldwide*. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2001. *International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture*. Rome.
- Gisi U, Sierotzki H, Cook A, McCaffery A. 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science*.:859–867.
- Grove GG, Madden L V., Ellis MA. 1985. Influence of Temperature and Wetness Duration on Sporulation of *Phytophthora cactorum* on Infected Strawberry Fruit. *Phytopatology* **75**:700–703. Available from https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1985Articles/Phyto75n06_700.pdf.
- Gryndler M, Němcová L. 2013. *Fylogeneze a systém nižších rostlin*. Available from http://old.biology.ujep.cz/vyuka/file.php/1/opory_2014/Opora_Fylogeneze_a_system_N%0AR.pdf.
- Hancock JF. 1999. *Strawberries*. CABI Publishing, Wallingford.
- Harant M, Zacha V. 1975. *Jahody*, 2nd edition. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.
- Heffer Link V, Powelson ML, Johnson KB. 2002. *Oomycetes. The Plant Health Instructor*. Available from [apsnet.org/edcenter/disandpath/oomycete/labexercises/Pages/Oomycetes.aspx](https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/oomycete/labexercises/Pages/Oomycetes.aspx).
- Hessayon DG. 2001. *The Pocket Garden Troubles Expert*, 1st edition. Transworld Publisher Ltd., London.
- Hill SN, Hausbeck MK. 2008. Virulence and Fungicide Sensitivity of *Phytophthora cactorum* Isolated from American Ginseng Gardens in Wisconsin and Michigan. *PLANT DISEASE* **92**:1183–1189.
- Hoover BK, Bates RM. 2012. Fungicide Efficacy in Prevention of Root Rot Incited by *Phytophthora cactorum* and *Phytophthora drechsleri* in Fraser Fir Seedlings. *HortTechnology hortte* **22**:470–475. American Society for Horticultural Science,

- Washington, DC. Available from
<https://journals.ashs.org/horttech/view/journals/horttech/22/4/article-p470.xml>.
- Hudler GW. 2013. *Phytophthora cactorum*. *Forest Phytophthoras* **3**. Available from
<http://journals.library.oregonstate.edu/index.php/ForestPhytophthora/article/view/3396/3166>.
- Husaini AM, Santos B de los, Neri D, Aguado A, Baruzzi G, Cantoral JM, Capote N, Carbú M, Chalfoun NR, Chamorro M. 2016. *Strawberry : Growth, Development and Diseases*. CABI, Oxford, UNITED KINGDOM. Available from
<http://ebookcentral.proquest.com/lib/czup/detail.action?docID=4767090>.
- Integrated Taxonomic Information System (ITIS). 2020. *Fragaria vesca* L. Available from
https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=24634#null (accessed January 17, 2020).
- JináZahrada. 2020. Vybíráme sazenice jahod. Available from
<http://www.jinazahrada.cz/rady-inspirace/79-sazime-jahody>.
- Judelson HS. 2009. *Oomycete Genetics and Genomics: Diversity, Interactions and Research Tools*. Page (Lamour K, Kamoun S, editors). John Wiley & Sons, Inc., California. Available from
https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=AIL_q4VNbFsC&oi=fnd&pg=PA121&dq=oomycetes+life+cycle+sexual&ots=Hr_2gsH4ei&sig=JN8OZgpvqsLD0Me70i49sM36tA4&redir_esc=y#v=onepage&q=oomycetes life cycle sexual&f=false.
- Kazda J, Mikulka J, Prokinová E. 2010. *Encyklopedie ochrany rostlin* 1. vyd. Profi Press, Praha.
- Kocourek F. 2014. *Integrovaná ochrana rostlin – příležitosti a obtíže při jejím uplatňování v ČR*. Available from <http://www.chizatec.cz/download/page6934.pdf>.
- Kocourek F, Stará J, Hubert J, Zichová T, Nesvorná M. 2015. *Metody diagnostiky rezistence škůdců k zoocidům a antirezistentní strategie v systémech integrované ochrany rostlin* první. Power print s.r.o., Praha.
- Krátká J, Křížková I, Novotný D. 2008. DETEKCE PHYTOPHTHORA CACTORUM A P.CAMBIVORA V PLETIVECH JABLONÍ KLASICKÝMI A IMUNOCHEMICKÝMI METODAMI. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Available from <https://docplayer.cz/11803953-Detekce-phytophthora-cactorum-a-p-cambivora-v-pletivech-jabloni-klasickymi-a-imunochemickymi-metodami.html>.
- Labanowska BH, Meszka B, Bielenin A, Olszak R. 2004. A FIELD EVALUATION OF DISEASE AND

- INSECT RESISTANCE OF SEVERAL STRAWBERRY CULTIVARS IN POLAND. Pages 255–258
Acta Horticulturae. International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven,
Belgium. Available from <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2004.649.48>.
- Lamour K. 2013. *Phytophthora: A Global Perspective*. CABI Publishing, Knoxville, USA.
- Lanák J, Šimko K, Vaněk G. 1969. *Atlas chorob a škůdců ovocných plodin, révy vinné a zeleniny*, 1st edition. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.
- Lebert H, Cohn F. 1870. Ueber die Fäule der Cactusstämme. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* **1**:51–57.
- Leitner L. 2020. *Fungicidy*. Available from <http://rl.zf.jcu.cz/docs/ruzne/ruz-fungicidy-c8bac3b5b1.pdf>.
- Maas JL. 1998. *Compendium of Strawberry Diseases*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Madden L V., Ellis MA, Grove GG, Reynolds KM, Wilson LL. 1991. Epidemiology and Control of Leather Rot of Strawberries. *PLANT DISEASE* **75**:440–446. Available from https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1991Articles/PlantDisease75n05_439.PDF.
- Masunaka A, Sekiguchi H, Takahashi H, Takenaka S. 2010. Distribution and Expression of Elicitin-like Protein Genes of the Biocontrol Agent *Pythium oligandrum*. *Journal of Phytopathology* **158**:417–426. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2009.01641.x>.
- Matthews GA. 2018. *Fungicides. Pages 115–134 A history of pesticides*. Imperial College London, London, UK, London.
- Ministerstvo vnitra České republiky. 2012. Vyhláška č. 205/2012 Sb. Available from <https://www.mvcr.cz/clanek/sbirka-zakonu-stejnopisy-sbirky-zakonu.aspx>.
- Ministerstvo vnitra České republiky. 2019. Vyhláška č. 5/2020.
- Ministerstvo zemědělství. 2017. *Situační a výhledová zpráva ovoce*. Ústav zemědělské ekonomiky a informací, Praha. Available from http://eagri.cz/public/web/file/611600/SVZ_Ovoce_12_2018.pdf.
- Ministerstvo zemědělství. 2020. *Přípravky na ochranu rostlin*. Available from http://eagri.cz/public/web/file/527826/POR___clanek_ver_4.pdf.
- Mok H-F, Williamson VG, Grove JR, Burry K, Barker SF, Hamilton AJ. 2014. Strawberry fields forever? Urban agriculture in developed countries: a review. *Agronomy for Sustainable*

- Development **34**:21–43. Available from <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0156-7>.
- National Center for Biotechnology Information. 2020. *Phytophthora cactorum*. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=29920&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>.
- Nečas T, a kol. 2004. Multimediální učební texty Ovocnictví. Available from tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/551/ustav_551/eltronic_ovoc/index.htm.
- Němcová Y, Prášil K. 2010. Botanika bezcévných rostlin. Available from [https://botany.natur.cuni.cz/prasil/ucitelska-pred/BBR 06. lekce 2010.pdf](https://botany.natur.cuni.cz/prasil/ucitelska-pred/BBR_06_lekce_2010.pdf).
- NOHEL GARDEN. 2011. Fytoftorová hniloba kořene jahodníku. Available from <https://www.nohelgarden.cz/zahradkarska-poradna/skudci/fytoftorova-hniloba-korene-jahodniku/82/fytoftorova-hniloba-korene/56/>.
- Park J et al. 2008. *Phytophthora* Database: A Forensic Database Supporting the Identification and Monitoring of *Phytophthora*. *Plant Disease* **92**:966–972. Scientific Societies. Available from <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-6-0966>.
- Peiker J. 1962. *Jahody Ovocnická*. Československá akademie věd, Praha.
- Pilát A, Ušák O. 1963. *Kapesní atlas rostlin*, 1st edition. Státní pedagogické nakladatelství, Praha.
- Ploetz RC. 2003. *Diseases of Tropical Fruit Crops*. CABI Publishing, Florida, USA. Available from https://books.google.cz/books?id=ttl_tu6rpgC&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.
- Procházka S, Macháčková I, Krekule J. 1998. *Fyziologie rostlin*,. Academia, Praha.
- Rebollar-Alviter A, Madden L V., Ellis MA. 2005. Efficacy of azoxystrobin, pyraclostrobin, potassium phosphite and mefenoxam for control of strawberry leather rot caused by *Phytophthora cactorum*. *Plant Health Progress*.
- Rebollar-Alviter A, Madden L V, Ellis MA. 2007. Pre- and Post-Infection Activity of Azoxystrobin, Pyraclostrobin, Mefenoxam, and Phosphite Against Leather Rot of Strawberry, Caused by *Phytophthora cactorum*. *Plant Disease* **91**:559–564. Scientific Societies. Available from <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-5-0559>.
- scanzen.cz. 2020. *Jahodník obecný (Fragaria vesca L.)*. Available from <http://www.scanzen.cz/kytky/jahodnik/>.

- Serrano-Perez P, Palo C, del Carmen Rodriguez-Molina M. 2017. Efficacy of Brassica carinata pellets to inhibit mycelial growth and chlamydospores germination of *Phytophthora nicotianae* at different temperature regimes. *SCIENTIA HORTICULTURAE* **216**:126–133. ELSEVIER SCIENCE BV, PO BOX 211, 1000 AE AMSTERDAM, NETHERLANDS.
- Šimánek J, Cvopová E. 1968. Jahody, pestovanie a zužitkovanie, 1st edition. Slovenské vydavateľstvo pôdohospodárskej literatúry, Bratislava.
- Staudt G. 1999. Systematics and Geographic Distribution of the American Strawberry Species: Taxonomic Studies in the Genus *Fragaria* (Rosaceae: Potentilleae). University of California Press. Available from https://books.google.cz/books?id=LU29C_V3DNkC.
- The Ohio State University. 2016. Ohioline. Available from <https://ohioline.osu.edu/factsheet/plpath-fru-09> (accessed May 15, 2016).
- Thomidis T, Elena K. 2001. Effects of Metalaxyl, Fosetyl-Al, Dimethomorph and Cymoxanil on *Phytophthora cactorum* of Peach Tree. *Journal of Phytopathology* **149**:97–101. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2001.00584.x>.
- Thomidis T, Michailidis Z. 2002. Preliminary evaluation of nine fungicides for control of *Phytophthora cactorum* and *P. citrophthora* associated with crown rot in peach trees. *Phytoparasitica* **30**:52–60. Available from <https://doi.org/10.1007/BF02983970>.
- Umaerus V, Umaerus M. 1994. Inheritance of resistance to pests and diseases, Late blight. Pages 365–401 *Potato Genetics* Cambridge. CAB International, University Press.
- Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZUZ). 2020a. Rostlinolékařský portál. Available from http://eagri.cz/public/app/srs_pub/fytoportal/fy-public/?key=%22cc2ed38a2c348617a4b9b393d7017ba4%22#ior%7Cmet:cc2ed38a2c348617a4b9b393d7017ba4%7Ckap1:skudci%7Ckap:skudci.
- Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZUZ). 2020b. Integrovaná ochrana rostlin. Available from <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/skodlive-organismy/integrovana-ochrana-rostlin/>.
- Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZUZ). 2020c. Rostlinolékařský portál.
- Utkhede RS. 1987. Control of crown rot (*Phytophthora cactorum*) of apple trees with the systemic fungicides metalaxyl and fosetyl-aluminium. *Pesticide Science* **19**:289–295. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <https://doi.org/10.1002/ps.2780190406>.
- Vaněk V, Balík J, Černý J, Pavlík M, Pavlíková D, Tlustoš P, Valtera J. 2012. Výživa zahradních rostlin, 11211th edition. Nakladatelství Academia, Praha.

- Věchet L. 2007. Význam interakcí hostitel patogen a poznávací systémy v interakci hostitel-patogen. Page Interakce mezi rostlinami a patogenními mikroorganismy. Praha. Available from <https://www.vurv.cz/sites/File/Publications/ISBN978-80-87011-08-9.pdf#page=3>.
- WIN-TIN MWD. 1973. THE DEVELOPMENT OF CYTOLOGICAL THEORY IN THE OOMYCETES. *Biological Reviews* **48**:133–158. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1469-185X.1973.tb01116.x>.
- Yang M et al. 2018. The *Phytophthora cactorum* genome provides insights into the adaptation to host defense compounds and fungicides. *Scientific Reports* **8**.

9 Seznam použitých zkratek

P. cactorum = *Phytophthora cactorum*

cm = centimetr

mm = milimetr

μm = mikrometr

t = tuna

l = litr

ml = mililitr

μl = mikrolitr

g/l = gram na litr

mg/ml = miligram na mililitr

μg/ml = mikrogram na mililitr

m. n. m. = metrů nad mořem

DAP = diaminopimelát

AAO (AAA) = aminoacidopát

°C = stupně celsia

IOR = integrovaná ochrana rostlin

ŠO = škodlivé organismy

č. = číslo

Sb. = sborník

tzv. = takzvané

např. = například

atd. = a tak dále

VŠÚ = výzkumný a šlechtitelský ústav

ŠS = šlechtitelská stanice

ÚKZUZ = Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

s. r. o. = společnost s ručením omezeným

a. s. = akciová společnost

CaCO₃ = uhličitan vápenatý

DMSO = dimethylsulfoxid

K⁺ = draselný iont

Ca²⁺ = vápenatý iont

ROS = reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)

UV = ultrafialové záření (ultrafialové světlo)

PRRs = pattern recognition receptors

PAMPs = pathogen-associated molecular patterns

MAMPs = microbe-associated molecular patterns

rRNA = ribonukleová kyselina podílející se na tvorbě ribozomů

WG = formulace fungicidu, ve vodě dispergovatelný granulát

QoI = quinone outside inhibitor

KRI = Keto reductase inhibitors

spp. = species, druhy