

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra ochrany rostlin



**Citlivost původců fomového černání řepky –
Leptosphaeria spp. k fungicidům**

Diplomová práce

Autor práce: Barbora Slavětinská

Obor studia: Rostlinolékařství

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

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Citlivost původců fomového černání řepky – *Leptosphaeria* spp. k fungicidům" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12. 4. 2019

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala především vedoucí své práce Ing. Janě Mazákové, Ph.D. za její vstřícnost a trpělivost při konzultacích, odbornou pomoc, cenné rady, připomínky a poskytnuté materiály. Také děkuji své rodině a přátelům, kteří mě podporovali po celou dobu mého studia.

Citlivost původců fomového černání řepky – *Leptosphaeria* spp. k fungicidům

Souhrn

Řepka olejka je jednou z nejpěstovanějších plodin na území České republiky a její kvalita a výnos mohou být značně ovlivňovány houbovými patogeny. Mezi ně patří patogeny rodu *Leptosphaeria* spp. působící jednu z nejběžnějších chorob – fomové černání stonku.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit citlivost patogenu *Leptosphaeria maculans* k vybraným účinným látkám a fungicidům při různých koncentracích. Míra citlivosti byla zjištěna testováním 20 izolátů tohoto patogenu metodou otrávených ploten v *in vitro* podmínkách a následným vyhodnocením inhibice růstu mycelia, stanovením hodnoty MIC (minimální koncentrace fungicidní látky inhibující růst mycelia ze 100 %) a EC₅₀ (efektivní koncentrace fungicidní látky inhibující růst mycelia z 50 %) u jednotlivých fungicidních látek.

Pro většinu izolátů byla MIC ú. l. pyraklostrobin (85 %), propikonazol (85 %), tebukonazol (100 %) stanovena v hodnotách > 10 µg/ml a u ú. l. prothiokonazol (90 %) a prochloraz (85 %) v intervalu 1–10 µg/ml. U přípravku Tilmor a jeho ú. l. prothiokonazol byla MIC v rozmezí 10–100 µg/ml stanovena u 60 % izolátů a u přípravku Horizon stejné rozmezí MIC u 75 % izolátů. Pro druhou ú. l. tebukonazol fungicidu Timor byly hodnoty MIC dvojnásobné oproti ú. l. prothiokonazol. MIC přípravku Bumper u 100 % izolátů byla stanovena u ú. l. propikonazol 1–10 µg/ml a u ú. l. prochloraz 4,4–44 µg/ml. Hodnoty EC₅₀ byly nejčastěji stanoveny v intervalu 0,1–1 µg/ml u ú. l. pyraklostrobin (65 % izolátů), prothiokonazol (45 % izolátů), prochloraz (65 % izolátů) a také u ú. l. prothiokonazol obsaženém ve fungicidu Tilmor (70 % izolátů). U ú. l. tebukonazol přípravku Horizon byla EC₅₀ u 95 % izolátů v rozmezí 1–10 µg/ml. Nejvyšší hodnota EC₅₀ (> 10 µg/ml) byla stanovena u ú. l. tebukonazol (35 % izolátů) a propikonazol (55 % izolátů). Nejmenší inhibiční účinek vykazovala ú. l. tebukonazol a přípravek Horizon.

K dosažení vysokých výnosů, kvalitní produkce a také udržitelného zemědělství je nutné využívat veškerých metod ochrany rostlin vůči škodlivým organismům. Tou nejúčinnější a nejběžnější metodou je stále ochrana chemická, při jejímž nesprávném používání může docházet k tvorbě rezistentních kmenů škodlivých organismů. V této práci nebyla prokázána rezistence k testovaným fungicidním látkám, přesto lze říci, že vzhledem k výsledkům ú. l. tebukonazol a fungicidu Horizon je zde potencionální možnost vzniku rezistentních kmenů patogenů *Leptosphaeria* spp.

Klíčová slova: *Leptosphaeria* spp., fomové černání stonku, ochrana, fungicidy, citlivost

The sensitivity of phoma stem canker pathogens – *Leptosphaeria* spp. to fungicides

Summary

Oilseed rape is one of the most cultivated crops in the Czech Republic and its cultivation is growing in recent years. Quality and gain of this crop can be highly influenced by fungus phytopathogens in which belongs the most common fungus disease of this crop - phoma stem canker, which is caused by pathogen *Leptosphaeria* spp.

The aim of this diploma thesis was to determine the sensitivity of pathogen *Leptosphaeria maculans* to selected fungicides, taking into consideration their different concentration scale as well. The level of sensitivity was determined by *in vitro* testing 20 pathogen isolates by the poisoned-plate method and followed by evaluation of mycelial growth inhibition, determination of MIC (minimum inhibitory concentration) and EC₅₀ (half maximal effective concentration) for individual fungicides.

For the majority of isolates the determined MIC value of *pyraclostrobine* (85 %), *propiconazole* (85 %) and *tebuconazole* (100 %) was > 10 µg/ml and the MIC value of *prothioconazole* (90 %) and *prochloraz* (85 %) was in the range 1–10 µg/ml. For Tilmor and its fungicide *prothioconazole* was the MIC estimated in the range 10–100 µg/ml by 60% of isolates and for Horizon the same MIC range was determined by 75% of isolates. As for the second active inhibitor *tebuconazole* of Timor fungicide the MICs was twice as high as *prothioconazole*. The determined MIC value of Bumper was in 100 % of *propiconazole* in the range 1–10 µg/ml and *prochloraz* in the range 4,4–44 µg/ml. Concerning fungicides *pyraclostrobine* (65 % of isolates), *prothioconazole* (45 % of isolates), *prochloraz* (65 % of isolates) and concerning fungicide *prothioconazole*, which is contained in Tilmor (70% of isolates) the EC₅₀ values were most frequently situated in the range 0,1–1 µg/ml. As for *tebuconazole* of Horizon the EC₅₀ value by 95% of isolates was determined in the range 1–10 µg/ml. As a result, the highest EC₅₀ (> 10 µg/ml) was found by fungicide *tebuconazole* (35% of isolates) and *propiconazole* (55% of isolates). Minimal inhibitor activity showed out fungicide *tebuconazole* and Horizon.

To increase crop yields and to get higher efficiency, top quality production and maintain the course of sustainable agriculture is more than necessary to use all available techniques and methods to protect crop from harmful organisms. To the most traditional and efficient crop protections methods still belongs chemical protection, whose improper use

might cause formation of large resistant species of harmful organisms. In this diploma thesis no resistance to the tested fungicides was detected, however, when taking overall results into consideration we might be facing potential risk of resistant pathogen species origination, which may arise by fungicide *tebuconazole* and Horizon.

Keywords: *Leptosphaeria* spp., phoma stem canker, control, fungicides, sensitivity

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Cíl práce	2
3. Literární rešerše	3
3.1 Pěstování řepky olejky na území ČR.....	3
3.2 Choroby řepky a současný systém pěstování.....	4
3.3 Fomové černání stonku.....	5
3.3.1 Symptomy	5
3.3.2 Zdroje infekce	7
3.4 Původce fomového černání řepky	8
3.4.1 Životní cyklus patogenu a podmínky infekce	10
3.4.2 Taxonomické zařazení	13
3.5 Nepřímé metody ochrany	14
3.5.1 Odolnost rostlin k patogenu	14
3.5.2 Preventivní a agrotechnická opatření.....	16
3.5.3 Prognóza a signalizace.....	16
3.6 Přímé metody ochrany	19
3.6.1 Chemická ochrana.....	19
3.6.2 Biologická ochrana	20
3.7 Rezistence k fungicidům	21
3.7.1 Mechanismy rezistence	22
3.7.2 Diagnostika rezistence	22
3.7.3 Antirezistentní strategie	22
3.7.4 Rezistence patogenu <i>Leptosphaeria</i> spp.....	23
4. Materiál a metody	24
4.1 Příprava kultivačního média.....	25
4.2 Přeočkování izolátů	26
4.3 Založení testů citlivosti k fungicidním látkám.....	27
4.4 Vyhodnocení testů citlivosti.....	29
5. Výsledky	30
5.1 Účinné látky	30
5.1.1 Pyraklostrobin	30
5.1.2 Prothiokonazol	33
5.1.3 Tebukonazol.....	35
5.1.4 Propikonazol	37
5.1.5 Prochloraz	38
5.2 Fungicidy.....	40
5.2.1 Tilmor	40

5.2.2	Horizon	42
5.2.3	Bumper.....	44
6.	Diskuze	47
7.	Závěr.....	52
8.	Literární zdroje	53
9.	Internetové zdroje	61

1. Úvod

Vzhledem k dlouhodobému růstu světové populace a stále více se zmenšující výměře zemědělské půdy, a tedy omezenému prostoru pro pěstování plodin, je nutné dodržovat určitá pravidla správné zemědělské praxe a tím podporovat udržitelné zemědělství. Stejně tak důležité je brát v potaz postupné globální oteplování a s ním spojené výkyvy klimatu, které stálou a udržitelnou produkci zemědělských komodit ztěžují.

Na našem území došlo v průběhu let k rapidnímu snížení živočišné výroby, s čímž souvisí i snížení pěstování krmných plodin. Hlavní plodinou zůstávají obilniny a jednou z možných plodin ke střídání v osevním postupu je řepka olejka. Ta je tak jednou z nejvíce pěstovaných plodin v České republice, a to i díky jejímu mnohostrannému využití. Je plodinou s velmi dobrou rentabilitou a stává se tak vysoce vyhledávanou komoditou.

Na výnos řepky mají značný vliv jak abiotické faktory, tedy podmínky prostředí a klimatické vlivy, tak i živočišní škůdci, plevele a původci chorob. Mezi nejběžnější choroby řepky se řadí bílá hniloba, verticiliové vadnutí a fomové černání stonku.

V dnešní době se přistupuje k šetrnějším způsobům ochrany rostlin, a to mimo jiné vzhledem k možné tvorbě rezistence škodlivých organismů vůči chemickým přípravkům, která postupně vede ke zvýšení jejich dávky, kombinování přípravků a neefektivnímu používání. To má za následek i vyšší množství reziduí v životním prostředí a potravinách. Měly by být využívány zásady integrované ochrany, které jsou v souladu s ekologickými, ekonomickými a toxikologickými požadavky. Dochází k preferování nechemické ochrany před chemickou a k postupnému zpřísnování podmínek pro používání pesticidů. Jelikož zatím není možné zachovat produkci na stejné úrovni, a to bez využití chemické ochrany, je nutné hledat takové metody, které vedou ke snížení potřeby aplikace pesticidů při zachování kvality a intenzity produkce. Jednou z těchto možností je hledání a omezování výskytu a šíření rezistentních a méně citlivých druhů či kmenů patogenu vůči fungicidním látkám, jejichž přítomnost je příčinou nadměrného a neefektivního používání chemických prostředků v ochraně rostlin.

2. Cíl práce

Aktuální problematikou v zemědělském sektoru je vliv chemických prostředků na ochranu rostlin a rizika s nimi spojená – vznik rezistentních kmenů škodlivých organismů, snižování biodiverzity, rezidua v životním prostředí a jiné.

Hypotéza této diplomové práce je založena na tvrzení, že v populaci patogenů způsobujícího fomové černání stonku řepky – *Leptosphaeria* spp., existují izoláty vyznačující se různou úrovní citlivosti k fungicidním látkám, které se používají při ochraně řepky olejky vůči této chorobě.

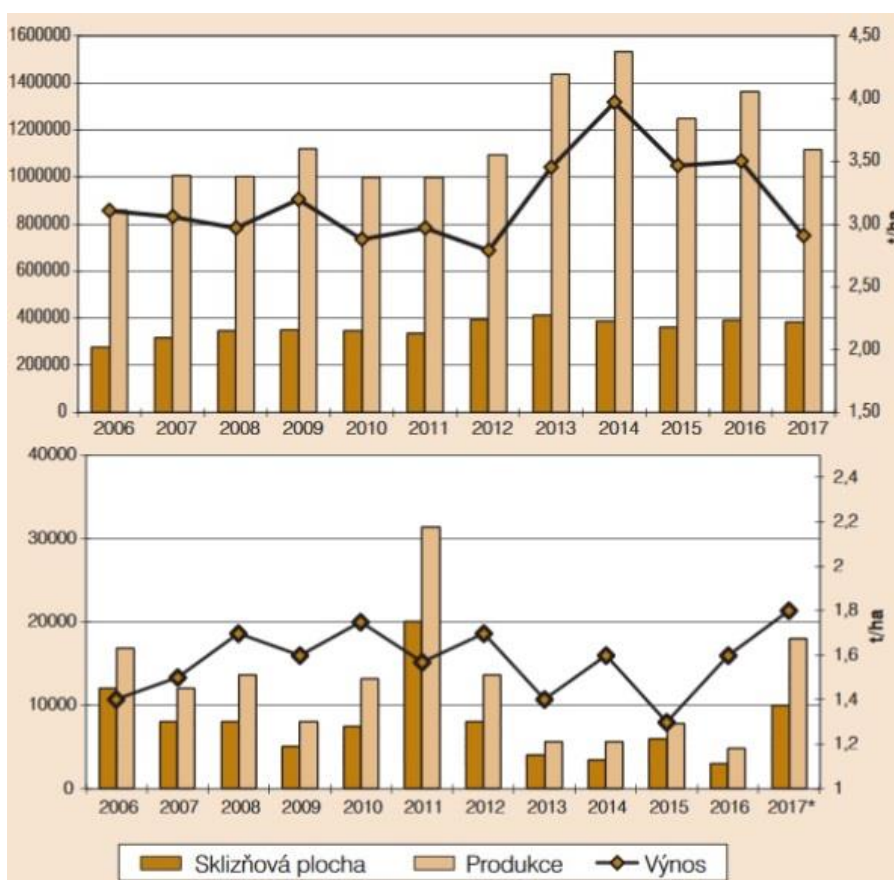
Cílem této práce bylo zjistit úroveň citlivosti jednotlivých izolátů *Leptosphaeria* spp. k běžně používaným fungicidům a účinným látkám při odlišné koncentraci.

3. Literární rešerše

3.1 Pěstování řepky olejky na území ČR

V České republice je řepka olejka (*Brassica napus* subsp. *napus*) dominující olejninou a zároveň i druhou nejvýznamnější plodinou po pšenici ozimé. Její semena se dají využít například k výrobě olejů a z nich odvozených výrobků, paliv pro vznětové motory, glycerínu či výrobě krmiv (Zehnálek 2018). Jedním z důvodů zvýšeného zájmu o řepkové semeno v posledních letech a s ním spojeného zvětšování osevních ploch řepky byl vznik směrnice Evropského parlamentu a Rady č. 2003/30/ES o zavedení povinného přimíchávání biosložek do pohonných hmot (Liška 2017).

Od roku 1999 do roku 2017 došlo na našem území k úbytku zemědělské půdy přibližně o 77 tis. hektarů, což představuje snížení asi o 11 hektarů denně (Hruška et al. 2018). Dle Českého statistického úřadu (2018) činí k datu 31. 5. 2018 osevní plocha ČR 2 460 939 hektarů, z toho zaujímaly olejnyiny přibližně 20 %, přičemž řepka pokrývala dominantní část 84 %. Níže je grafické znázornění vývoje ploch, produkce a výnosů řepky ozimé a jarní v období 2006–2017 (Obrázek 1).



Obrázek 1 Řepka ozimá (nahore) a jarní (dole) – vývoj ploch (ha), produkce (t) a výnosů (t/ha) za období 2006–2017 (Zehnálek 2018).

3.2 Choroby řepky a současný systém pěstování

Nebezpečí napadení a poškození rostlin se stejným okruhem škodlivých organismů může výrazně snížit dodržování osevního postupu, tedy pěstování těchto plodin nejdříve 3–4 roky po sobě. Stejně tak má negativní vliv pěstování stejných či příbuzných plodin v daném roce na blízkých pozemcích, ze kterých se mohou škodlivé organismy šířit (Kazda et al. 2010). Osevní postup zajišťuje snížení plevelných rostlin v porostech plodin, značnou eliminaci houbových chorob, ale také omezuje únavu půdy a podporuje její úrodnost (Kokaisl 2008).

Česká republika se řadí mezi hlavní evropské pěstitele řepky. Asi ztrojnásobení ploch jejího pěstování nastalo po roce 1990, kdy došlo k propadu chovu skotu a jiných zvířat, a tak i k produkci krmných plodin. I nyní tak zůstává řepka plodinou s významným podílem na osevní ploše a je plošně nezastupitelnou předplodinou mezi dvěma obilninami. V dnešní době se tedy dodržuje jen velmi úzký osevní postup, kdy bývá často střídána pouze řepka ozimá s obilninou a dochází tak k opakovanému výskytu a šíření řady původců chorob a škůdců (Bečka et al. 2007). Postupně došlo ke snížení přirozeného fyto-sanitárního efektu půdy, a tím ke zvýšení promoření půd sporamai hub a také rizika infekce porostů (Šaroun 2006). Spolu s procentuálním zastoupením řepky v osevních postupech tedy vzrůstá i tlak houbových chorob (Málek et al. 2011; Penaud & Walker 2015).

Guo et al. (2008) uvádějí, že vhodná kombinace střídáných plodin v osevním postupu a zpracování půdy může redukovat inokulum původce choroby ve vzduchu (např. askospory) a snížit tak míru infekce porostů. Dle Málka et al. (2011) byl výskyt chorob řepky vždy primárně ovlivněn způsobem hospodaření, až v poslední dekádě se k působení změn v agrotechnice přidaly také změny klimatické, které se projeví i v zastoupení škůdců.

Řepka je hostitelskou rostlinou širokého spektra patogenních organismů, a to po celou dobu vegetace (Kazda et al. 2010). Důležitým faktorem, který výrazně ovlivňuje pokles úrody řepky ozimé, jsou problémy s rozvojem kořenového systému. Ty mohou nastat z důvodů zhutňování půdy, ale i díky přítomnosti řady patogenních hub, mezi které se řadí houby rodu *Verticillium*, *Rhizoctonia solani* a některé druhy z rodu *Fusarium* (Bokor 2018). Významnou chorobou napadající stonky řepky je bílá hniloba, způsobovaná houbou *Sclerotinia sclerotiorum* a v neposlední řadě fomové černání stonku, které je vyvoláno patogeny rodu *Leptosphaeria* (Kazda et al. 2010).

3.3 Fomové černání stonku

Fomové černání stonku je celosvětově významná choroba rostlin z čeledi *Brassicaceae* (brukvovité). Toto onemocnění postihuje několik druhů z rodu *Brassica*, včetně řepky ozimé a jarní, *Crambe* spp., *Eruca* spp., *Raphanus* spp., *Thlaspi* spp. a další (Kaczmarek & Jędryczka 2011). Řadí se mezi nejzávažnější onemocnění řepky a způsobuje výnosové ztráty nejen v Evropě, ale i v Austrálii a Severní Americe (Fitt et al. 2006). Původcem jsou patogeny rodu *Leptosphaeria*, způsobující padání klíčnic rostlin, poléhání a v některých případech i předčasné dozrávání (West et al. 2001).

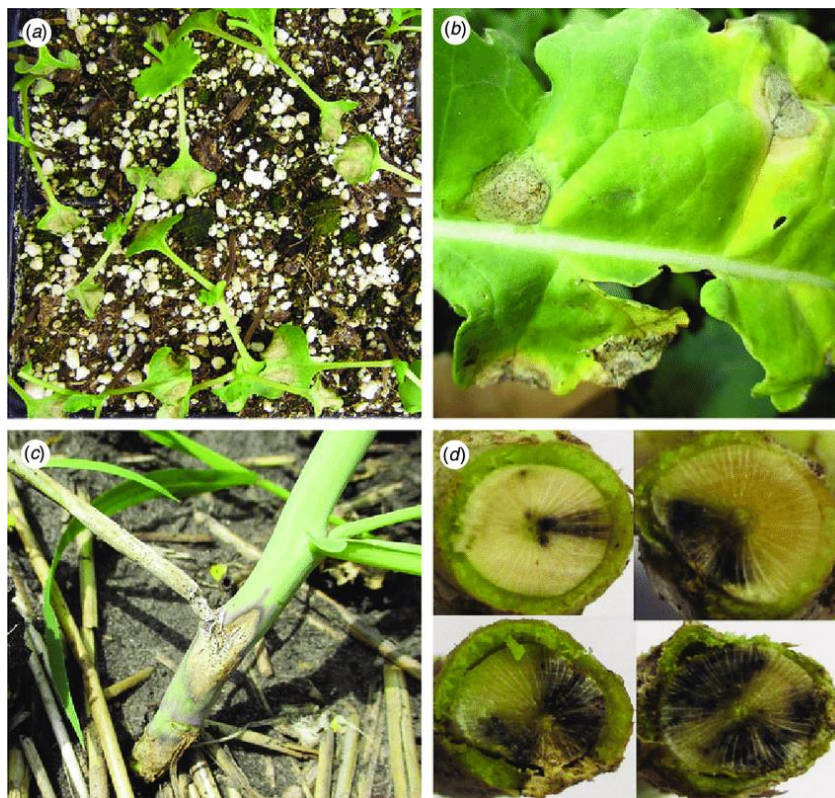
Na území ČR je choroba popisována již od začátku 80. let 20. století a to pouze jako ojediněle se vyskytující. Hospodářský význam tohoto onemocnění začal stoupat od poloviny 90. let, kdy došlo k výraznějšímu rozvoji pěstování řepky na našem území. Nyní patří původci choroby k nejvýznamnějším patogenům této plodiny (Kazda et al. 2008).

Výskyt choroby je v jednotlivých letech značně závislý na zdroji infekce, průběhu povětrnostních podmínek a míra napadení porostu je rozdílná dle intenzity pěstování řepky (Kazda et al. 2008). Dle Prokinové (2006) mají na výnos největší dopad podzimní infekce řepky ozimé, a to v závislosti na množství a intenzitě napadení v tomto období a také na průběhu počasí v zimě a předjaří. Dispozičními faktory pro výskyt choroby jsou mírné zimy s dostatkem či nadbytkem srážek, dlouhotrvající deštivé a chladné jarní období a teplejší, na srážky bohatý podzim (Kocourek et al. 2018). Výskyt této choroby je podporován setím infikovaného osiva, zakládáním řepkového porostu v okolí ploch s napadenými posklizňovými zbytky, při hustém a mohutném porostu řepky a také při vlhkém a teplém počasí v době setí a tvorby či dozrávání šesulí. Riziko napadení hrozí také na dlouhodobě zamokřených pozemcích v předjaří a v jarním období (Kazda et al. 2008). Nejvyšší ztráty na výnosu jsou z důvodu poléhání rostlin, způsobované rakovinou báze stonku, která vede k omezení toku vody a živin rostlinným tělem a dochází tak i k předčasnému dozrávání, semena a plody jsou scvrklé (Wretblad 2002). Je uvedeno, že zvýšená míra infekce může snížit předpokládaný výnos o 10 % a při silném napadení až o 30–50 % dle míry napadení (Kazda et al. 2008).

3.3.1 Symptomy

Příznaky této choroby mohou být viditelné po téměř celou dobu vegetace (Obrázek 2). Poprvé jsou rozpoznatelné již v říjnu na děložních lístcích, a to v podobě drobných, šedých skrvn, které nepředstavují závažnější hrozbu, ale mohou signalizovat napadení kořenového

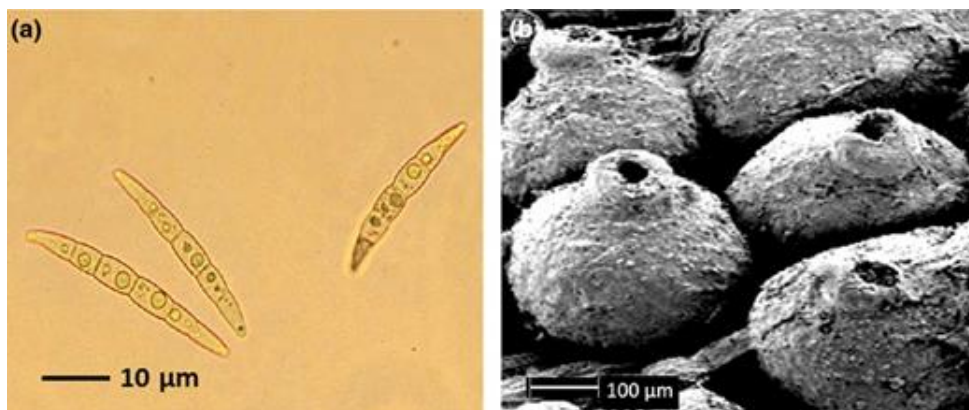
krčku. V extrémních případech napadení může dojít až k zaorání porostu (Kazda et al. 2008). Dle Fitt et al. (2006) se na pravých listech tvoří okrouhlé, žlutavě šedé skvrny s černými tečkami – pyknidami (nepohlavní stadia). Kaczmarek & Jędryczka (2011) uvádějí, že symptomy na listech jsou rozdílné podle druhu patogenu. U druhu *L. biglobosa* se tvoří tmavě hnědé či šedé skvrny lemované tmavým okrajem, zatímco v případě *L. maculans* dochází většinou k tvorbě světle zelených až světle béžových lézí bez ohraničení. Na starších rostlinách, především v jarním období, se pak mohou objevovat na kořenovém krčku hnědočerné až černé nepravidelné skvrny, které později šednou a mají tmavý okraj (Fitt et al. 2006). Od jiných nemocí na řepce je fomové černání stonku rozpoznatelné právě díky přítomnosti pyknid. Z těch se později uvolňují konidie (nepohlavní spory) šířící se dále do porostu. Při silném napadení lze na podzim pozorovat uvnitř kořene typicky nekrotizující pletivo, které se může vyskytovat i vně kořene a kořenového krčku. Rostliny s takovým napadením špatně přezimují, uhnívají a později odumírají. Pokud rostliny přežijí zimu a tlak patogenu, tvoří se ve fázi tvorby šešulí na stoncích a kořenech skvrny s černými tečkami pseudoperitheciemi (pohlavní stadium), kořeny a kořenové krčky rostlin trouchnivěji a nekrotizují. Při vysokém napadení rostliny předčasně odumírají a dochází k jejich nouzovému dozrávání (Poslušná & Plachká 2009).



Obrázek 2 Příznaky fomového černání stonku na řepce: léze na děložních lístcích (a), léze na listech (b), patogen prorůstající směrem ke stonku (c), kolonizace báze stonku patogenem (d); (Zhang & Fernando 2017).

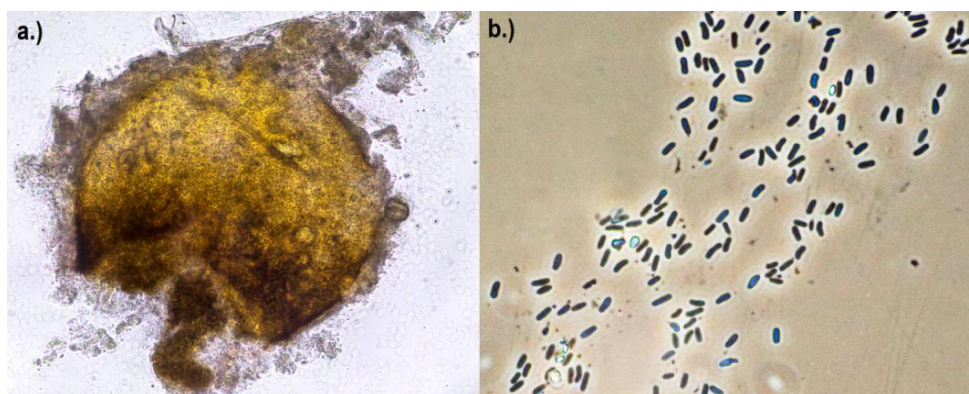
3.3.2 Zdroje infekce

Dle Fernanda et al. (2016) jsou primárním zdrojem infekce askospory (Obrázek 3a), tvořící se v pseudoperitheciích (Obrázek 3b), které jsou uvolněné z rostlinných zbytků z minulé sezóny. Toscano-Underwood et al. (2003) uvádějí, že jsou plodnice u *L. maculans* velké v průměru 300–500 μm a u *L. biglobosa* v rozmezí 280–350 μm . Uvnitř pseudoperithecií se tvoří ve vřeckách askospory, které v podzimním období infikují nový porost (Kazda et al 2008). Dle Plachké et al (2018) jsou šestibuněčné askospory velké okolo 35–70 \times 5–8 μm . Williams (1992) popisuje velikost askospor druhu *L. maculans* v průměru (45) 50–60 (68) \times 6–7 μm a u *L. biglobosa* v průměru 42–48 (60) \times 6–7 μm . Sprague et al. (2007) uvádějí, že po invazi hostitelské rostliny klíčovými askosporami se objevují na rostlinách listové léze.



Obrázek 3 Vzdušné askospory patogenu *Leptosphaeria maculans* nebo *Leptosphaeria biglobosa* (a), které jsou tvořeny v pseudoperitheciích (b); (Zhang et al. 2013).

Po napadení rostlin primárním inokulem a tvorbě skvrn se na listových lézích vytvářejí pyknidy (Obrázek 4a) produkující jednobuněčné pyknospory (Obrázek 4b), které se pomocí deště mohou šířit do okolí a jsou tak zdrojem sekundární infekce (Kaczmarek & Jędryczka 2011). V tomto anamorfním stadiu se patogen označuje jako *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm., a to pro oba druhy patogenu. Narozdíl od askospor mohou být pyknospory roznášeny deštěm pouze na krátké vzdálenosti – asi 2 až 40 cm (Travadon et al. 2007).



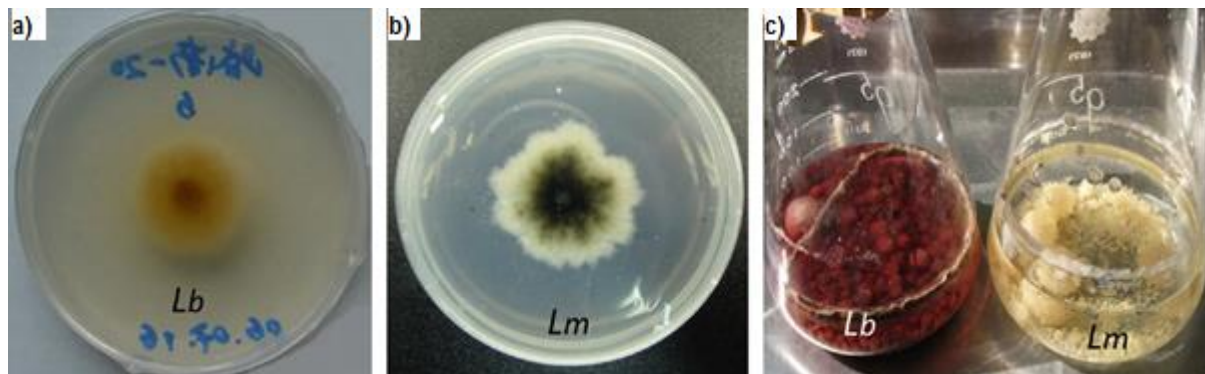
Obrázek 4 *Phoma lingam*: pyknida (a); pyknospory – konidie (b); (Koczor 2017).

3.4 Původci fomového černání řepky

Fomové černání stonku mohou způsobit dva druhy rodu *Leptosphaeria* a to *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. Et de Not. (1863) a *Leptosphaeria biglobosa* Shoemaker & Brun (2001), které spolu koexistují ve většině porostů řepky (Fernando et al. 2016; West et al. 2001). Dle Fitt et al. (2006) populace původce této choroby zahrnuje dva druhy a to *Leptosphaeria maculans*, způsobující rakovinu báze stonku a *Leptosphaeria biglobosa*, který je častěji spojován s mírnějším poškozením v podobě lézí na horní části stonku. Mazáková et al. (2017) ve své práci prokázali, že častější příčinou listových příznaků choroby na podzim byl patogen *L. maculans* a naopak v době zralosti byl v rostlinných pletivech častěji pozorován patogen *L. biglobosa*.

Dle West et al. (2000) se *L. maculans* vyskytuje na řepce ve dvou typech a to jako agresivní skupina A a méně agresivní skupina B, což je historické označení pro *L. maculans* (A) a *L. biglobosa* (B). Podobně tak označují ve své práci Koch et al. (1989) tyto dva druhy na základě jejich patogenity, na agresivní typ (A – aggressive) a neagresivní (NA – nonaggressive) nebo později Sippel & Hall (1995) jako vysoce virulentní (HV – highly virulent) a slabě virulentní typ (WV – weakly virulent). Tato dvojice se od sebe liší například rychlostí růstu, rychlostí sporulace, produkcí pigmentu (Obrázek 5) a biochemickými vlastnostmi (Brazauskienė et al. 2011). Jednou z odlišností je například produkce sekundárního metabolitu, fytotoxinu sirodesmin PL, který byl nalezen pouze u *L.*

maculans (Fernando et al. 2016). Kachlicki et al. (1996) ve své práci demonstrují, že ačkoli izolát typu B (*L. biglobosa*) neprodukuje sirodesmin, je schopný produkovat jiné metabolity a řada z nich má také fytotoxické účinky.



Obrázek 5 Testy na PDA (potato dextrose agar), ukazující produkci pigmentu pouze u *L. biglobosa* (Lb) (a), nikoli u *L. maculans* (Lm) (b); testy na Czapek–Dox mediu, ukazující produkci pigmentů pouze u *L. biglobosa* (Lb), nikoli u *L. maculans* (Lm) (c); (Zhang et al. 2013).

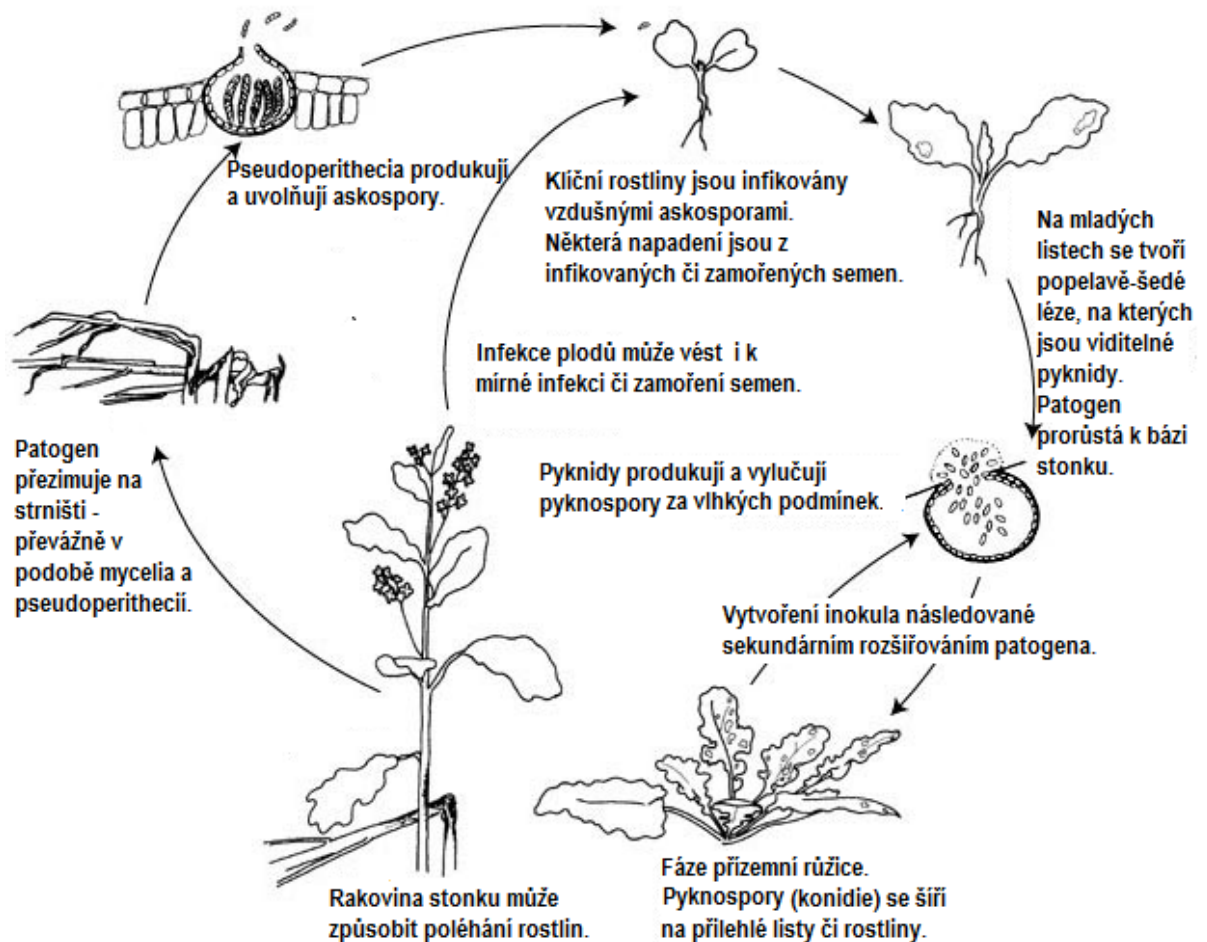
Jak již bylo řečeno, v porostech řepky se často vyskytují oba tyto druhy patogenu a společně mohou vést k závažnému onemocnění, a tím i k významným ztrátám na výnosech. Příznaky choroby jsou tedy připisovány dvěma druhům patogenu, přičemž *L. maculans* je agresivnější. Jelikož se patogenita izolátů *L. maculans* může značně lišit, je častěji využíván jako modelový druh pro studium genetických vztahů mezi hostitelem a patogenem (Kaczmarek & Jędrzycka 2011).

Fernando et al. (2016) při svém výzkumu jednotlivých šarží řepkových semen vyvážených ze západní Kanady zjistili, že v semenech řepky a příměsích byly nalezeny oba zmíněné druhy patogenu, přičemž v semenech převládala méně agresivní *L. biglobosa* a v příměsích *L. maculans*. Poslušná & Plachká (2011) ve svých výsledcích z průzkumu o výskytu této choroby na severní Moravě uvádějí, že druhové zastoupení patogenu (*L. maculans* a *L. biglobosa*) bylo na obou lokalitách rovnoměrné. Taktéž Ryšánek et al. (2010) ve své práci uvádějí, že při monitoringu původců této choroby v moravských regionech pomocí specifické PCR analýzy, byla zjištěna přítomnost obou druhů patogenů. Dle Fitt et al. (2006) byly smíšené populace patogenu pozorovány v několika zemích Evropy, a to v různém poměru. Převahu *L. maculans* demonstrují Kuusk et al. (2002) ve svých výsledcích z pokusu ve Švédsku v roce 2000, kde byly izoláty *L. maculans* rozděleny do dvou skupin (A nebo B) na základě rozdílu agresivity. Agresivní skupina A byla dále rozdělena na patogenní skupiny (PG – pathogenicity groups) PG2, PG3 a PG4, přičemž skupina B byla označována jako PG1. Pro zjištění míry zastoupení agresivní formy A byla provedena fyziologická a genetická charakterizace 120 izolátů, z toho 37 izolátů bylo klasifikováno jako

PG3, 63 izolátů jako PG4. Zbylých 20 izolátů (PG1) nezpůsobovaly příznaky. Izoláty byly poté analýzou PCR rozděleny na skupiny A a B, jejichž správná klasifikace byla zjištěna na základě schopnosti izolátu produkovat pigmenty.

3.4.1 Životní cyklus patogenů a podmínky infekce

Přestože je *L. maculans* agresivnější než *L. biglobosa*, jejich životní cyklus (Obrázek 6) je velmi podobný a oba druhy mohou kolonizovat všechny citlivé části rostlin – kořen, stonek v bazální i horní části, listy, semena a děložní lístky (Fernando et al. 2016). Za primární infekci rostlin jsou zodpovědné askospory produkované pseudoperitheciemi, jejichž zdrojem jsou nejčastěji rostlinné zbytky z předchozí sezóny (Aubertot et al. 2006). Bylo zjištěno, že pseudoperithecium může na rostlinných zbytcích přežít více než pět let, přičemž během prvních tří let je velmi účinným zdrojem inokula (Petrie 1986). Naseri et al. (2009) při svém studiu v jižní Austrálii zjišťovali vliv teplot, vlhkosti a tmy na tvorbu pseudoperithecií a také vliv teplot na dozrávání a uvolňování askospor. Zjistili, že čas potřebný k dosažení zralosti plodnic a uvolňování askospor se vlivem teploty snížil z 58 dní při teplotě 5 °C, na 22,2 dní při teplotě 15 °C. Optimální teplota pro zrání pseudoperithecií pak byla mezi 15–20 °C, přičemž při 20 °C bylo pozorováno méně plodnic než při 15 °C. Dále uvádějí, že při 12hodinové fotoperiodě byla tvorba pseudoperithecií vyšší než při kontinuální tmě a také, že za teplotních podmínek 15 °C a při závlaze jednou denně nedošlo k dozrání pseudoperithecií, zatímco při třech postřicích denně byla doba zrání plodnic snížena v porovnání se dvěma postřiky denně. Toscano-Underwood et al. (2003) zase uvádějí, že při stálé vlhkosti byla doba zrání plodnic snížena téměř lineárně s teplotou od 5 °C do 20 °C, ale za suchých podmínek se doba zrání prodloužila.



Obrázek 6 Životní cyklus patogenů *Leptosphaeria* spp. (přeloženo z: Ash 2000).

Dozrávání pseudoperithecií je tedy ovlivňováno především vlhkostí a teplotou vzduchu (Toscano-Underwood et al. 2003). Při teplotách nižších než 10 °C dozrávají rychleji plodnice u *L. maculans* než u *L. biglobosa*, a to vzhledem k faktu, že askospory u *L. biglobosa* jsou produkovány v pozdějším ročním období (Fitt et al. 2006).

Po dozrání pseudoperithecií jsou ve většině případů askospory uvolněny a rozneseny do vzdálenosti 0,5 km od zdroje (Aubertot et al. 2006), nicméně vzdušnými proudy mohou být unášeny až do okolí 5 km (Hall 1992). Podle Marcrofta et al. (2004) mohou být askospory unášeny dokonce do vzdálenosti 10 km a za suchých podmínek přežít více jak měsíc, a to při teplotě 5–20 °C. Následně po přistání askospor na děložních lístcích a mladých rostlinách, dochází k prvním příznakům v podobě listových skvrn (West et al. 1999) s tím, že symptomy jsou viditelné nejdříve několik dní po infekci (Sexton & Howlett 2001). Spory infikují rostliny skrze stomata nebo přes mechanická poškození, způsobená biotickými či abiotickými faktory (Chen & Howlett 1996). Dále se houba rozrůstá mezibuněčnými prostory mezofylových buněk (Jędryczka 2007) a roste asymptomaticky přes řapík k bázi stonku, kde způsobuje nekrózu, která může vést k poléhání rostlin a vysoké ztrátě na výnosech (Sprague et al. 2007).

Na listových lézích se později tvoří nepohlavní stadia – pyknidy. V těch se vytváří pyknospory, které se za vlhkých podmínek šíří do blízkého okolí a stejně jako askospory, mohou způsobovat infekci listů (Hall 1992). Bylo zjištěno, že za stejných podmínek vyžadují pyknospory delší dobu zrání než askospory (Li et al. 2003). Kazda et al. (2010) uvádějí, že rostliny napadené krytonosem řepkovým (*Ceutorhynchus napi*) v jarním období, jsou náchylnější ke vzniku sekundární infekce, jelikož dospělci tohoto škůdce vyžírají do stonků otvory, které mohou být vstupní branou pro patogeny.

Na počátku infekce je mycelium houby omezeno pouze na malou listovou plochu, ale poté se rozrůstá přes žilnatinu do řapíku listů. Nyní dochází k latentní fázi, kdy nejsou viditelné žádné makroskopické příznaky onemocnění. Postupně se patogen rozrůstá cévním systémem do stonků, kde se později objevují symptomy infekce, v podobě tmavých skvrn se šedým nebo hnědým okrajem. Uvnitř rostlin může patogen částečně či úplně blokovat cévní svazky, což vede ke zpomalení nebo potlačení transportu vody a živin rostlinným tělem a postupně může docházet k předčasnému dozrání rostlin (West et al. 2001). Infekce se ve stoncích může rozšířit až k plodům (šešulím), kde se uvnitř opět vytváří tmavé pyknidy a dochází k přímé kontaminaci semen (Li et al. 2003). Důsledkem napadení jsou pak malá, deformovaná a špatně vyzrálá semena. Symptomy na semenech mohou být ovšem také latentní, houba zde přežívá ve formě mycelia (Prokinová 2003). Takto infikovaná semena mohou být dalším zdrojem infekce (Li et al. 2003).

V saprofytické fázi může houba produkovat fytotoxické metabolity ze skupiny sirodesminů (Ferezou et al. 1977). Jak již bylo naznačeno, druh *L. biglobosa* tyto fytotoxiny neprodukuje a bylo zjištěno, že mohou dokonce u tohoto druhu zpomalit růst a vývoj, stejně jako u několika dalších mikroorganismů (Elliott et al. 2007).

Jak bylo naznačeno, přítomnost spor v aeroplanktonu souvisí s meteorologickými podmínkami (Grinn–Gofrón 2009). Burge (1986) pozoroval vyšší výskyt askospor z rodu *Leptosphaeria* ve vzduchu za deštivého počasí. Pro kvantifikaci poměru jednotlivých druhů patogenu ve vzorcích vzduchu se ukázala být užitečnou například metoda Real–Time PCR (Kaczmarek et al. 2009). Identifikace druhového složení spor ve vzduchu je velmi důležitou součástí nepřímé ochrany proti této chorobě vzhledem k tomu, že se od sebe dva zmíněné druhy patogenu liší jak agresivitou, tak citlivostí k fungicidním látkám (Kaczmarek et al. 2009) a je tak možno předpovídat závažnost onemocnění a optimalizovat načasování chemické ochrany (Piliponyte–Dzikiene et al. 2014).

3.4.2 Taxonomické zařazení

Dle taxonomické databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information 2019) jsou patogeny *Leptosphaeria* spp. zařazeny následovně:

- Oddělení: *Ascomycota*
- Pododdělení: *Pezizomycotina*
- Třída: *Dothideomycetes*
- Podtřída: *Pleosporomycetidae*
- Řád: *Pleosporales*
- Čeleď: *Leptosphaeriaceae*

Nicméně druhové názvy patogenů *L. maculans* a *L. biglobosa* mohou být v budoucnu reklasifikovány spolu s dalšími druhy rodu *Phoma*, a to na základě molekulární fylogenetické analýzy nrDNA do rodu *Plenodomus*, tedy *Plenodomus lingam* a *Plenodomus biglobosus* comb. Nov. (de Gruyter et al. 2009, 2013).

3.5 Nepřímé metody ochrany

Nepřímé metody ochrany rostlin jsou založeny na vytváření ideálních podmínek pro růst a vývoj kulturních rostlin a zároveň vytvoření nepříznivých podmínek pro škodlivý organismus, a to pomocí agrotechnických, šlechtitelských či organizačních prostředků (Kazda et al. 2010). Jak uvádějí Matušinsky et al. (2013), mnohé z nepřímých metod jsou často účinnější a levnější než aplikace pesticidů. Je dokonce popsáno, že některé aplikace pesticidů zvýšily toxicitu houbového patogenu, který ve stresu z působení chemického přípravku začal produkovat více toxických látek.

3.5.1 Odolnost rostlin k patogenu

Přestože existují k potlačení fomového černání stonku řepky různé pěstelské strategie, jako je střídání plodin, aplikace fungicidů, obdělávání půdy, tou nejslibnější je využívání odolných odrůd (Zhang & Fernando 2017). Jak bylo naznačeno, je snahou omezovat používání chemických prostředků a preferovat ostatní metody ochrany rostlin. Příkladem je využívání biologických látek, které v rostlinách indukují odolnost, aniž by působily antimikrobiálně, nebo šlechtění a pěstování již zmíněných odolných odrůd. Pro využití těchto metod je ovšem nutné znát interakce mezi patogenem a hostitelem na molekulární úrovni (Šašek et al 2007).

Takovou interakcí je například aktivace signálních drah v rostlinách po napadení patogenem, kde hlavní roli hrají tři hormony: kyselina salicylová, kyselina jasmonová a ethylen. Ačkoli se signální dráhy těchto hormonů prolínají, velmi zjednodušeně lze říci, že na rezistenci rostlin vůči nekrotrofním patogenům se podílí především kyselina jasmonová a naopak vůči biotrofním kyselina salicylová (De Vos et al. 2005). Rostliny odpovídají na infekci obrannými reakcemi, mezi které se řadí i tvorba antimikrobiálních sloučenin a enzymů, které degradují buněčnou stěnu patogenu, dále zvýšená exprese genů s různou funkcí či zpevnění buněčné stěny rostlin (Glazebrook 2005). Šašek et al. (2007) ve své práci uvádějí, že po ošetření rostlin elicitorem z *L. maculans* došlo k akumulaci ROS (reaktivní formy kyslíku), které kromě signální funkce mají i přímý toxický účinek na patogen. Tvorba ROS po napadení rostlin patogenem je základní raná fáze mechanismu rezistence v rostlinné buňce (Bowell et al. 2002). Dále došlo k aktivaci antioxidantních mechanismů v děložních listech řepky, a to pomocí antioxidantních enzymů, podílejících se na regulaci ROS – GPX (guajakol dependentní peroxidasa), APX (askorbátperoxidasa), GR (glutathionreduktasa); (Šašek et al. 2007). Odolnost může být tedy vyvolána ošetřením rostlin různými látkami, například

kyselinou β -aminomáselnou (BABA – β -aminobutyric acid), která indukuje syntézu kyseliny salicylové a má tak pozitivní vliv na rezistenci rostlin vůči mnoha patogenům. Příkladem je antifungální účinnost na patogeny *Leptosphaeria* spp. u řepky (Šašek et al. 2012).

Využití odolných odrůd je poněkud komplikované, jelikož zatím známe prakticky pouze rezistenci řepky vůči *L. maculans* (Ryšánek & Burketová 2017). Odolnost rostlin řídí různé geny v různých růstových fázích (Zhu & Rimmer 2003). Podobně uvádí Ryšánek & Burketová (2017), že některé geny rezistence vůči *L. maculans* jsou účinné jen u mladých rostlin a jiné pouze u rostlin starších. U kvalitativní rezistence platí, že každému genu rezistence u hostitele odpovídá gen avirulence u patogenu, tedy odolnost či náchylnost je závislá na přítomnosti jednoho majorgenu pro rezistenci (v rostlině) a korespondujícího genu avirulence (u patogenu). Po tomto specifickém rozpoznání dochází k okamžitému spuštění obranných reakcí rostlin. Šlechtění odrůd s tímto typem rezistence je relativně nevýhodné vzhledem k tomu, že rasově specifická rezistence znamená odolnost pouze vůči konkrétní rase patogenu a také bývá rychle patogenem překonána, především díky bodovým mutacím (Rouxel et al. 2003). Příkladem rasově specifických genů rezistence přítomných hlavně u ozimých odrůd řepky jsou – *Rlm1*, *Rlm2* a *Rlm4*. Proti evropským kmenům tohoto patogenu byly nalezeny geny odolnosti *Rlm5* a *Rlm6* u druhu *Brassica juncea* (Balesdent et al. 2002). Ryšánek & Burketová (2017) uvádějí, že u řepky je zatím známo 16 genů rezistence – *Rlm1-Rlm11*, *RlmS* a *LepRI-LepR4*. Zmíněné majorgeny zajišťují rezistenci hlavně u mladých rostlin a tato odolnost může být testována pomocí tzv. kotyledonových testů, kdy se po inokulaci děložních listů konidii *L. maculans* u rostlin s genem rezistence objevují typické nekrotické skvrny. Ty vznikají po rozpoznání patogenu rostlinou a spuštění hypersenzitivních reakcí. V Evropě je zatím funkční gen *Rlm7*, přičemž počet ras virulentních k tomuto genu vzrůstá vzhledem k rozsáhlému využívání odrůd řepky s tímto genem a je jen otázkou času, kdy bude patogenem překonán.

Při šlechtění na odolnost se obvykle doporučuje tzv. pyramidizace více genů současně. Tímto systémem lze dosáhnout kumulace několika genů rezistence do jednoho genotypu, a tím ztížení možnosti překonání každého z nich patogenem (Ryšánek & Burketová 2017; Schwander et al. 2011). Nejvhodnější se zatím zdá být kombinace kvalitativní a kvantitativní rezistence (Ryšánek & Burketová 2017). Kvantitativní rezistence je založena polygenně a je zpravidla účinná vůči širokému spektru ras a také je trvalejší. Negativem je ovšem náročnější šlechtění (Delourme et al. 2004). Na rozdíl od rasově specifické rezistence nemá takový význam u mladých rostlin, ale především v době asymptomatické fáze infekce patogenem *L. maculans* (Ryšánek & Burketová 2017).

3.5.2 Preventivní a agrotechnická opatření

Preventivní ochranou proti napadení porostu škodlivým činitelem může být tedy i výběr odolné odrůdy. Co se týče houbových chorob, mezi významné hospodářské vlastnosti registrovaných odrůd se řadí právě odolnost vůči fomovému černání stonku brukvovitých, ale také k bílé hnilobě a verticiliovému vadnutí. Nyní je registrováno několik odrůd s větší či menší odolností k fomovému černání stonku (Zehnálek 2018).

Základní prevencí proti zamoření porostu houbami *Leptosphaeria* spp., ale i jinými druhy patogenů, je osevní postup, kdy je nutné dodržovat odstup v pěstování řepky na stejném pozemku minimálně 3–4 roky, což se dnes z výše uvedených důvodů příliš nedodrжуje. Dalším agrotechnickým opatřením může být zaorání rostlinných zbytků, což napomáhá urychlit jejich rozklad, a tím zkrátit dobu přežívání patogenu. Stejně tak je účinná likvidace rostlin z výdrolu, které slouží mimo hlavní vegetační dobu jako hostitelé patogenů a jsou tak zdrojem infekce pro okolní nové porosty řepky (Prokinová 2003).

Jak bylo uvedeno, patogeny se mohou rozšířit až k plodům a do semen, proto je základním ochranným opatřením setí kvalitního, zdravého a uznaného osiva (Kazda et al. 2010; Prokinová 2003). Dle registru přípravků na ochranu rostlin (ÚKZÚZ 2019) je aktuálně povolen přípravek na moření osiva řepky – Scenic Gold a Vitavax. Dle Prokinové (2006) může být dispozičním faktorem choroby i příliš vysoký výsev a také nekvalitně založený porost.

Při nepřímé ochraně je samozřejmostí udržovat porost řepky v bezplevelném stavu, a to vzhledem k podmínkám vyšší vlhkosti vzduchu v přehuštěném porostu, které přirozeně podporují výskyt houbových patogenů (Prokinová 2003).

3.5.3 Prognóza a signalizace

K určení nejvhodnějšího termínu ochrany rostlin před patogeny, ale i živočišnými škůdci slouží metody prognózy a signalizace. Prognóza nám určuje s předstihem riziko výskytu škodlivého organismu, což vzhledem k nynějším výkyvům počasí nemusí být vždy přesné. Signalizací je pak myšlena nejvhodnější doba pro ošetření porostu, určena intenzitou výskytu patogenu, průběhem počasí a jeho krátkodobou předpovědí (Kazda et al. 2010).

Jednou z možností signalizace původců fomového černání řepky je sledování letu askospor, které se provádí pomocí lapačů spor. Příkladem je lapač typu Burkard, fungující na principu zachytávání spor v 7denních intervalech na Melinex pásku. Ta je ošetřena lékárenskou vazelínou a horizontálně umístěna na otočný válec. Monitoring letu askospor se provádí zpravidla v podzimním období (září až listopad), v době dozrávání a uvolňování

askospor. Po uplynutí zmíněné doby je z této pásky připraveno 7 preparátů, každý za jeden den. Poté je na základě denního odečtu askospor stanoveno doporučené fungicidní ošetření (Plachká et al. 2018). Moderním typem lapače spor výrobce Burkard Manufacturing Ltd. je 'DNA auto spore trap', který umožňuje přímou detekci sledovaného patogenu včetně vyhodnocení průběhu počasí díky přítomnosti vlastní meteostanice (Burkard Manufacturing Ltd. 2019; Plachká et al. 2018).

Hlavní vliv na šíření patogenu a infekci řepky, jak již bylo naznačeno, má teplota a intenzita srážek (Plachká et al. 2018). Proto další metodou signalizace mohou být programy, pracující s meteorologickými údaji v daném regionu pěstování (Kocourek et al. 2018). Tyto údaje jsou měřeny a sledovány především v kritickém období pro vývoj patogenu (setí, vzházení, podzimní vegetace) pomocí meteorologických stanic rozmístěných po celém území ČR (Plachká et al. 2018). Plachká et al. (2017) uvádějí jako příklad německý systém ProPlant, fungující na principu měření hlavních klimatických údajů, na základě kterých dokáže stanovit nejvhodnější termín ošetření, předpovědět míru rizika infekce konkrétním patogenem a také pomáhá s výběrem fungicidů. Výstupem je pak grafické vyobrazení dnů s vhodnými infekčními podmínkami pro patogen. Přesnost tohoto programu je ovšem různá dle řady autorů.

Jak bylo výše naznačeno, rostliny napadené krytonoscem řepkovým mohou být následně náchylnější k infekci houbovými patogeny. Proto je často stonkové napadení patogenem spojováno s přítomností tohoto druhu krytonosce (Prokinová 2006). Kazda et al. (2008) uvádějí, že na napadení se může v jarním období také podílet krytonosec čtyřzubý. Právě v letech, kdy nejsou ideální podmínky pro rozvoj fomového černání stonku, může docházet k napadení rostlin i při velmi nízkém infekčním tlaku, a to díky mechanickému poškození pletiv krytonoscem, které pak ztrácí přirozenou obranyschopnost vůči houbovému patogenu (Prokinová 2006). V roce 2000 a 2001 byl sledován výskyt choroby ve vztahu k poškození stonků krytonoscem řepkovým, kdy v prvním roce byla zjištěna pozitivní vazba mezi počtem napadení stonků patogenem a jejich poškození krytonosci. Naopak v dalším roce tato vazba prokázána nebyla, výskyt choroby byl vyšší, a to pravděpodobně vzhledem k tomu, že v roce 2001 byl průběh počasí pro rozvoj této choroby mnohem příznivější než v roce 2000 (Prokinová 2003). Proto ochrana proti krytonoscům může nepřímo chránit také řepku proti napadení těmito fytopatogeny (Prokinová 2006).

Poslušná & Plachká (2015b) popisují, že po několikaletém pozorování této choroby se ukázalo, že signalizaci fungicidního ošetření řepky proti *Leptosphaeria* spp. lze velmi úspěšně provádět na základě osevního postupu, znalosti o průběhu počasí a detekce zdroje napadení.

Z víceletých dat měření povětrnostních podmínek v kritických fenofázích řepky pro napadení patogeny *Leptosphaeria* spp. a současného hodnocení průběhu infekce rostlin, lze poté vypracovat matematické modely vhodné pro signalizaci ošetření (Plachká et al. 2018).

3.6 Přímé metody ochrany

3.6.1 Chemická ochrana

Používání fungicidních přípravků se stalo nedílnou součástí při snižování negativních vlivů fytopatogenních organismů na výnos a kvalitu pěstovaných plodin. Mezi nejpoužívanější přípravky se řadí fungicidy ze skupiny DMI (inhibitory demetylace při syntéze ergosterolu), dále QoI (strobiluriny) a SDHI (inhibitory sukcinát dehydrogenasy), přičemž všechny tři mají specifické místo účinku (Leadbeater 2015). Skupina DMI, nazývaná také jako azolové fungicidy, zahrnuje podtřídu triazoly (Wouw et al. 2017), které inhibují demetylaci v pozici 14 lanosterolu nebo 24 metyldihydrolanosterolu, prekurzorů syntézy sterolů u hub (Ackermann 2013). Dle Ziogas & Malandrakis (2015) zahrnují DMI-fungicidy největší část ze skupiny inhibitorů biosyntézy sterolů a také jsou nejvíce využívanými registrovanými fungicidy proti fytopatogenům ze tříd *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* a dříve označované skupiny *Fungi imperfecti*. Strobiluriny zase narušují mitochondriální dýchání navázáním na Qo vazebné místo (ubichinon) na cytochromálním komplexu bc1, proto jsou často označovány jako Qo inhibitory (Bartlett et al. 2002). Poslední skupinou jsou SDHI fungicidy, které inhibují enzym sukcinát dehydrogenázy, působící taktéž v mitochondriálním dýchání (Sierotzki & Scalliet 2013).

Chemickou ochranu je třeba provést v ranných fázích infekce, než se patogen dostane do stonkové části rostlin (Gladders et al. 1998). Proto je třeba znát čas a podmínky, za kterých dochází k dozrávání plodnic a uvolňování askospor (West et al. 2002).

Za základní a velmi efektivní ošetření je považováno použití regulátorů růstu či kombinace morforegulátorů s fungicidním účinkem v podzimním období, které pomáhá zpevnit rostlinná pletiva a tak částečně bránit pronikání patogenu do pletiv (Kazda et al. 2010). Taktéž Prokinová (2006) uvádí, že podzimní aplikace regulátorů růstu s fungicidním účinkem je velmi účelným opatřením při přímé ochraně proti napadení, přičemž dávka těchto přípravků se odvíjí od toho, v jaké míře jsou podmínky pro infekci v daném roce ideální a zda byl porost založen kvalitně, ze zdravého a prověřeného osiva. Podobně popisuje Šaroun (2006), že podzimní aplikace regulátorů růstu podporují zakořenění rostlin, vytváří se mohutný křovitý kořen a také silný kořenový krček, díky čemuž řepka lépe přezimuje a je odolnější vůči stresorům. V jarním období je pak vhodné použít fungicidní ošetření v případě, že se jedná o rizikové porosty – vyšší vlhkost, pravidelný výskyt fomového černání stonku, neuznané osivo (Kazda et al. 2010).

Současně nejvíce používané jsou proti *Leptosphaeria* spp. fungicidy ze skupiny DMI – inhibitory demetylase (Šaroun 2008). Taktéž Van de Wouw et al. (2017) potvrzují, že v Austrálii přispělo používání azolových fungicidů k několikanásobnému zvýšení produkce řepky, ovšem rozsáhlá aplikace fungicidů postupně vedla k vyselektování populací hub s určitým stupněm rezistence vůči těmto látkám.

3.6.2 Biologická ochrana

Biologická ochrana je jednou z možností snižování zátěže životního prostředí chemickými prostředky. Tento typ ochrany funguje na základě antagonistických mikroorganismů, jež potlačují růst a vývoj škodlivého organismu, v tomto případě houbového fytopatogenu (Věchet 2012).

Vzhledem k tomu, že se fytopatogenní houby často udržují na rostlinných zbytcích a na plevelích, kde zasahují až do kořenové oblasti rostlin, může docházet v půdním prostředí ke kontaktu mezi patogenní a antagonistickou houbou. Antagonista patogenu vylučuje do prostředí různé látky, které negativně působí na cílový fytopatogenní organismus a tlumí jeho růst a vývoj (Hýsek et al. 2008).

Nyní je registrováno několik přípravků na bázi biopreparátu, které se dají použít k ochraně řepky proti fomovému černání stonku. Jedním z nich je přípravek s obchodním názvem Polyversum, který je ve formě smáčitelného prášku a obsahuje aktivní biologickou složku, houbu *Pythium oligandrum*. Tento přípravek podporuje růst rostliny a zároveň indukuje obranné reakce rostlin vůči patogenním houbám, stimulací produkce fytohormonů (Hýsek et al. 2008).

3.7 Rezistence k fungicidům

Každý organismus má schopnost se postupem času adaptovat na měnící se podmínky prostředí a vytvořit si tak určitou odolnost vůči některým látkám. U mikroorganismů dochází k tomuto přizpůsobení mnohem rychleji než u vyšších organismů, a to vzhledem k jejich rychlému množení. Výsledkem je rezistence (odolnost), což je v tomto případě dědičné přizpůsobení se fungicidním látkám, kdy nedochází při jejich použití k ohrožení přežití populace patogenu (Kazda et al. 2010).

V současném systému zemědělství je fungicidní ochrana běžnou praxí k docílení zdravého porostu, stabilních výnosů a kvality plodin. Dříve měli pěstitelé a zemědělci přístup k řadě fungicidních látek, které byly účinné již při nízkých koncentracích a poskytovaly tak vysokou míru ochrany vůči patogenům (Russell 2005). Postupně se ale objevila rezistence k mnoha fungicidním přípravkům a rozšířila se v populacích patogenů, čímž došlo k ohrožení efektivní ochrany rostlin (Lucas et al. 2015). Dokonce u některých fytopatogenů hrozí, že možnosti chemické ochrany vůči nim budou značně omezené nebo i zcela nedostupné (Spellberg et al. 2008).

V poslední době význam rezistence stále stoupá a ovlivňuje úspěšnost používání fungicidních přípravků a také způsob jejich používání (Kazda et al. 2010). Dříve využívané typy fungicidů, kontaktní, působily v organismu na celé spektrum buněčných procesů a byly tak inhibitory s více místy účinku (Lucas et al. 2015). Později ale začaly být aplikovány fungicidy systémové, které jsou specifické v mechanismu účinku a patogen si tak snáz vytvoří odolnost vůči nim, například změnou jediného genu (Kazda et al. 2010).

Základním požadavkem pro vznik rezistence v populaci patogenu je variabilita jedinců v citlivosti vůči fungicidním látkám (Georgopoulos & Skylakakis 1986). Systémové fungicidy se specifickým účinkem jsou velmi účinné i při nízkých dávkách, jelikož se distribuují celým rostlinným tělem a poskytují tak vysoký stupeň ochrany. Na druhou stranu dochází k vyhubení mnoha citlivých jedinců v populaci patogenu, což vede k výběru (přežívání) jedinců odolných. Jak bylo naznačeno, mnoho patogenních hub má velmi krátkou generační obměnu a rychlou reprodukční schopnost a proto postupně dochází k posílení rezistentních kmenů patogenu a potlačení těch citlivých (Lucas et al. 2015).

Rezistence může být vrozená, tedy dědičně vložená odolnost patogenu k určité látce, nebo získaná, která je vyvolána až používáním fungicidu, kdy patogen reaguje na opakované používání stejné či podobné účinné látky se stejným principem působení. Rozlišuje se křížová rezistence (cross-resistance), kdy vznik odolnosti vůči jedné látce vyvolá odolnost i k jiným

látkám se stejným mechanismem působení (Ackermann 2013). Dalším typem je vícenásobná rezistence nebo multirezistence, kdy vzniká odolnost ke dvěma či více fungicidům z různých chemických skupin (Plachká et al. 2016). Výsledkem jsou pak dvě na sobě nezávislé mutace, k nimž došlo vzhledem k opakovanému používání přípravků z obou (všech) skupin fungicidů (Ackermann 2013).

3.7.1 Mechanismy rezistence

Dle Ma & Michailides (2005) může rezistence vůči fungicidním látkám vzniknout například:

- modifikací místa účinku, kde dochází ke snížené schopnosti navázání účinné látky;
- syntézou odlišného enzymu, který nahradí cílový enzym;
- zvýšenou syntézou cílových míst, ve kterých má fungicid působit;
- nižším příjmem fungicidu či jeho metabolickým rozkladem.

3.7.2 Diagnostika rezistence

Jelikož se od sebe rezistentní a citlivé kmeny patogenních hub nijak neliší v příznacích na rostlině nebo jakoukoli morfologickou strukturou, je třeba k jejich determinaci využít laboratorních testů, případně i pokud lze molekulárně-biologických. U fakultativních patogenů se takové testy provádějí metodou otrávených ploten, spočívající v kultivaci hub na umělém mediu, které slouží jako zdroj živin a zároveň je v něm obsažen v různých koncentracích testovaný fungicid. Následně je třeba doplnit laboratorní test o skleníkové a polní pokusy (Kazda et al. 2010). Poslušná & Plachká (2015a) ve své práci zjišťovaly citlivost patogenu k vybraným fungicidním látkám taktéž pomocí metody otrávených ploten s různými koncentracemi účinných látek.

3.7.3 Antirezistentní strategie

Podstatou antirezistentních strategií je eliminace nebo oddálení vzniku rezistence, z čehož plyne, že by taková opatření měla být prováděna preventivně. Důležité je sledovat rizikové pesticidy a v případě podezření ze vznikající odolnosti patogenu, provádět testy, které ověří jejich citlivost (Ackermann 2013).

Základním preventivním opatřením proti vzniku rezistence je střídání plodin v osevních postupech, správné zpracování půdy a také dostatečná a vyrovnaná výživa, která zlepšuje kondici plodin a vede tak ke snížení náchylnosti rostlin k napadení. Taková opatření mohou omezit používání fungicidů, čímž se sníží i riziko vzniku rezistence (Kazda et al. 2010).

Dalším významným opatřením je dodržování správné aplikace fungicidních látek – doporučená dávka, termín, počet aplikací. Velmi vhodné je střídání účinných látek s různým mechanismem účinku, případně jejich kombinace (Kazda et al. 2010). Bittner (2016) taktéž uvádí, že součástí antirezistentní strategie je monitoring a prognóza výskytu škodlivého organismu, minimalizace četností fungicidních zásahů, používání tzv. tank-mixů či směsí fungicidních látek s různým mechanismem působení, správné dávkování fungicidů a omezení opakované aplikace nízké dávky fungicidů.

3.7.4 Rezistence patogenů *Leptosphaeria* spp.

Jak bylo uvedeno, nejvíce využívanými fungicidy při ochraně řepky vůči fomovému černání stonku jsou látky ze skupiny azolů. Opakovaná aplikace těchto fungicidů se stejným mechanismem účinku ovšem může postupně vést ke snížené citlivosti vůči těmto látkám (Carter et al. 2013). Proto byly vyvinuty testy umožňující sledovat citlivost jednotlivých izolátů v populaci patogenu k fungicidům. Van de Wouw et al. (2017) uvádějí zvýšenou odolnost vůči účinným látkám ze skupiny triazolů – fluchinkonazol, tebukonazol, prothiokonazol a flutriafol. Předchozí studie ukázaly, že *L. maculans* a *L. biglobosa* se liší v citlivosti vůči triazolovým fungicidům. Při testování růstu mycelia v *in vitro* podmínkách byla pozorována vyšší citlivost vůči účinným látkám flusilazol a tebukonazol u *L. maculans* (Eckert et al. 2010). Van de Wouw et al. (2017) ve své práci uvádějí, že při testování 200 vzorků *L. maculans* z celé Austrálie, bylo identifikováno 15 % jako rezistentní k fluchinkonazolu.

Dle Price et al (2015) existují tři hlavní mechanismy rezistence vůči fungicidním látkám ze skupiny triazolů – bodové mutace v genu *Cyp51*, nadměrná exprese genu *Cyp51* a nadměrná exprese genů kódujících efluxní pumpy, přičemž nejrozšířenější jsou bodové mutace v genu *Cyp51*. Fungicidy ze třídy strobilurinů jsou další rozšířenou skupinou účinných látek při ochraně vůči fytopatogenům (Balba 2007). Vzhledem k tomu že působí v jednom místě účinku, hrozí zde také riziko selekce rezistentních jedinců v populaci hub (Gullino et al. 2000). Sierotzki & Scalliet (2013) uvádějí, že hlavním mechanismem rezistence u této skupiny fungicidů, a také u SDHI, je mutace cílového místa účinku. Ke vzniku rezistence vůči strobilurinům dochází dle Bartletta et al. (2002) substitucí glycinu na alanin v poloze 143 a substitucí fenylalaninu na leucin v poloze 129 v rámci cytochromu b.

Aby mohla být fungicidní ošetření i nadále efektivní, je nutné pochopit tyto mechanismy rezistence, sledovat výskyt méně citlivých kmenů patogenů a využívat antirezistentní strategie v ochraně rostlin (Ackermann 2013).

4. Materiál a metody

Testování, které bylo součástí této práce, bylo provedeno v letech 2018–2019 na katedře ochrany rostlin České zemědělské univerzity v Praze, a to v *in vitro* podmínkách. Stanovení růstu mycelia houbového patogenu a následné vyhodnocení citlivosti vůči různým koncentracím několika fungicidů a účinných látek (Sigma-Aldrich) bylo provedeno metodou otrávených ploten. Byly vybrány a testovány následující 3 fungicidy a 5 účinných látek:

- Horizon 250 EW (ú. l. tebukonazol)
- Tilmor (ú. l. prothiokonazol, tebukonazol)
- Bumper Super 490 EC (ú. l. prochloraz, propikonazol)
- Pyraclostrobin
- Prothiokonazol
- Tebukonazol
- Prochloraz
- Propikonazol

Citlivost byla testována na 20 izolátech patogenu *Leptosphaeria maculans*, pocházejících z různých lokalit. Izolace z rostlinného materiálu byla provedena v roce 2017 a nebyla součástí této diplomové práce. Označení izolatů a jejich lokace jsou vypsány v následující tabulce (Tabulka 1):

Tabulka 1 Označení testovaných izolatů a jejich lokality sběru

Izolat	Lokalita
VP 3/1	Velké Přílepy
VP 8	Velké Přílepy
H 8/1	Hradištko
23/17 1/3	Kujavy
12/17 1/1	Nové Město U Chlumce nad Cidlinou
15 Pl 2	Horní Dubňany
15 Pl 3	Lipov
16 Pl 4	Hulín
16 Pl 6	Němčice
17 Pl 1	Pravčice
17 Pl 5	Hulín
7 2/2 1S0-LL	Lysolaje
9 2/2 1S0-HK	Lysolaje
3/17 1/1	Nové Město U Chlumce nad Cidlinou
3/17 1/3	Nové Město U Chlumce nad Cidlinou
8/17 1/3	Nové Město U Chlumce nad Cidlinou
15/17 2/1	Nové Město U Chlumce nad Cidlinou
15/17 2/3	Nové Město U Chlumce nad Cidlinou
21/17 3/1	Kujavy
23/17 2/1	Kujavy

4.1 Příprava kultivačního média

Pro přípravu kultivačního média byl použit následující materiál a přístroje:

- analytická váha, váženky, lžička
- magnetická míchačka, magnetické míchadlo
- Papinův hrnec nebo autokláv
- 500ml Erlenmayerovy baňky, kádinka (pro rozmíchání směsi), odměrný válec, alobal
- V8 juice agar v potřebném množství

Pro přípravu 1 litru V8 juice agaru bylo použito:

- 100 ml V8 džusu (džus s 8 druhy zeleniny)
- 2 g CaCO_3
- 16 g agaru
- destilovaná voda

Do velké kádinky byl nejprve nalit V8 džus a přidáno potřebné množství CaCO_3 . Dále bylo vloženo magnetické míchadlo a následně byla kádinka umístěna na magnetickou míchačku – pro zabránění vystříknutí směsi během míchání byla kádinka vždy přikryta vrstvou alobalu. Směs byla promíchávána při laboratorní teplotě po dobu 15–25 minut, dokud nedošlo k rozpuštění CaCO_3 . Poté byla přidána destilovaná voda v množství dle potřeby kultivačního média a směs byla opět dostatečně promíchána. Během míchání bylo do 500ml kuželových baněk naváženo vždy po 4 g agaru.

Hotový roztok byl poté odměřen ve válci a rozlit po 250 ml do každé baňky s předem připraveným agarem (baňky byly zvoleny vždy s větším objemem, aby se zabránilo „vybublání“ směsi při sterilizaci v autoklávu). Jednotlivé baňky byly následně zakryty vždy dvěma vrstvami alobalu a vloženy do autoklávu, kde byly sterilizovány po dobu 20 minut při 121 °C (případně do Papinových hrnců po dobu cca 20 minut). Po sterilizaci byly baňky postupně vyndávány z autoklávu a médium bylo ochlazováno pod tekoucí vodou na teplotu vhodnou pro rozlévání agaru; v případě testů citlivosti k fungicidním látkám byla teplota pro přidání fungicidních látek cca 50 °C.

4.2 Přeočkování izolátů

Před zahájením samotného testu bylo nejprve nutno přeočkovat všech výše zmíněných 20 izolátů pro využití v následném vlastním testování. K tomu byl potřeba následující materiál a zařízení:

- původní izoláty (k dispozici na katedře ochrany rostlin)
- Petriho misky s V8 juice agarem
- očkovací jehla, ethanol, kahan
- flow box
- parafilm

Do předem připravených Petriho misek s V8 juice agarem (viz. Příprava kultivačního média) bylo pomocí očkovací jehly přeneseno menší množství mycelia z původních izolátů, které byly k dispozici na katedře (resp. již přeočkovaných izolátů od data sběru). Bylo vždy odebráno mycelium na okraji misky (nejmladší část mycelia). Mezi jednotlivými odběry byla jehla ponořena do ethanolu a sterilizována nad kahanem. Naočkované misky byly označeny datem, názvem izolátu a následně ovázány parafilmem. Všechny zmíněné úkony byly provedeny ve flow boxu. Izoláty byly následně kultivovány při teplotě cca 20 °C ve tmě.

Tyto nově naočkované izoláty byly později, po nárůstu mycelia, použity při zakládání fungicidních testů citlivosti.

4.3 Založení testů citlivosti k fungicidním látkám

Při zakládání tohoto testu byl použit následující materiál a zařízení:

- misky s izoláty *Leptosphaeria* spp.
- sterilní Petriho misky (Ø 80 mm)
- kultivační médium
- flow box
- kahan, ethanol
- pipeta, sterilní špičky
- korkovrt, skalpel, parafilm
- fungicidy a účinné látky (viz. Tabulka 2, Tabulka 3)
- termostat

Tabulka 2 Fungicidy a jejich testované koncentrace (K – kontrolní varianta; 1–7 – jednotlivé koncentrace)

fungicid	účinná látka	koncentrace (µg/ml)								
		K	1	2	3	4	5	6	7	8
Horizon	tebukonazol	0	0,0001	0,001	0,01	0,1	1	10	100	1000
Bumper	prochloraz	0	0,0004	0,0044	0,044	0,44	4,4	44	444	4444
	propikonazol	0	0,0001	0,001	0,01	0,1	1	10	100	1000
Tilmor	prothiokonazol	0	0,0001	0,001	0,01	0,1	1	10	100	1000
	tebukonazol	0	0,0002	0,002	0,02	0,2	2	20	200	2000

Tabulka 3 Testované koncentrace účinných látek (K – kontrolní varianta; 1–5 – jednotlivé koncentrace)

účinná látka	koncentrace (µg/ml)					
	K	1	2	3	4	5
pyraclostrobin						
prothiokonazol						
tebukonazol	0	0,001	0,01	0,1	1	10
prochloraz						
propikonazol						

Pro rozpuštění testovaných účinných látek bylo použito DMSO (dimethylsulfoxid). V případě fungicidů nebyl k rozpuštění použit DMSO vzhledem k jejich dobré rozpustnosti ve vodě.

Před samotným rozlíváním agarů s přidaným množstvím fungicidních látek, bylo vysterilizováno potřebné množství Petriho misek pod UV-zářičem, umístěném ve flow boxu,

a to po dobu 20 minut. Následně byly misky pro přehlednost připraveny do jednotlivých sloupců dle koncentrací fungicidních látek.

Do připraveného agarů s vhodnou teplotou bylo poté pipetováno určité množství účinné látky či fungicidu tak, aby bylo docíleno potřebné koncentrace (viz. Tabulka 2, Tabulka 3). Následně byl agar s fungicidem (účinnou látkou) pečlivě promíchán a rozlit do Petriho misek (do každé cca 17 ml). U kontrolních variant byl rozlíván samotný agar, tzn. bez fungicidu či účinné látky. V případě testů s účinnými látkami byl do média kontrolních variant přidán DMSO (0,1%). Po ztuhnutí agarů, většinou následující den, byl agar v Petriho miskách naočkován testovaným izolátem *Leptosphaeria* spp. Agar s myceliem testovaného izolátu byl korkovrtem nařezán na jednotlivé terčíky, které byly pomocí skalpelu přeneseny po jednom do středu Petriho misek s kultivačním médiem a fungicidem či účinnou látkou v dané koncentraci (terčíky byly odebírány vždy z kraje mycelia). Mezi jednotlivými izoláty byl skalpel i korkovrt ponořen do ethanolu a poté sterilizován nad kahanem. Testy byly provedeny ve třech opakováních.

Po inokulaci terčíky byly Petriho misky dvakrát po obvodu ovázané parafilmem k ochraně obsahu před vnější kontaminací, dále byly označeny datem, variantou (koncentrací) a názvem izolátu a umístěny do termostatu ke kultivaci za výše definovaných podmínek (každá skupina misek byla pro přehlednost v termostatu označena testovaným fungicidem či účinnou látkou). Veškeré úkony byly provedeny ve flow boxu.

4.4 Vyhodnocení testů citlivosti

Pro měření růstu mycelia jednotlivých izolátů na jednotlivých variantách testu byl použit následující materiál a přístroje:

- digitální posuvné měřítko (MITUTOYO 0–150/0,01 mm)
- počítač (tabulkový software Microsoft Excel)
- černá podložka

Pro vyhodnocení citlivosti testovaných izolátů byl nejprve změřen radiální růst mycelia patogenu, resp. inhibice růstu mycelia u jednotlivých izolátů a koncentrací. Měření bylo vždy zahájeno v době, kdy u neošetřené kontrolní varianty pokrývalo mycelium již celou plochu Petriho misky, případně již nedocházelo k dalšímu růstu u těchto variant (tj. v intervalu 14 až 40 dnů po inokulaci).

Měření mycelia u každé misky bylo provedeno pomocí digitálního posuvného měřítka, připojeného k počítači, kde byla při každém změření do programu Microsoft Excel zapsána délka mycelia (v milimetrech). Mycelium bylo měřeno vždy ze spodu misky, a to ze dvou na sebe kolmých stran – tedy u každého izolátu a každé koncentrace jednotlivých fungicidních látek bylo 6 naměřených hodnot (3 opakování, 2 průměry). Pokud bylo třeba, byla pro lepší viditelnost mycelia použita černá podložka.

Naměřené velikosti mycelií ve třech opakováních u jednotlivých izolátů a u konkrétních fungicidních látek byly vždy zprůměrovány. Z těchto průměrných hodnot byla následně u každého izolátu a pro konkrétní fungicidní látku vypočítána inhibice růstu mycelia (MGI), hodnota EC_{50} (efektivní koncentrace fungicidní látky inhibující růst mycelia z 50 %) a stanovena MIC (minimální koncentrace fungicidní látky inhibující růst mycelia ze 100 %).

- MGI (mycelial growth inhibition; %) = $100 - [(dT/dK) \times 100]$
dT = průměr mycelia (mm) testovaného izolátu na variantě s fungicidní látkou
dC = průměr mycelia (mm) testovaného izolátu na kontrolní variantě
- EC_{50} byla stanovena pomocí regresní analýzy probitu procenta inhibice růstu ku logaritmu koncentrace fungicidní látky.

5. Výsledky

Jak bylo výše uvedeno, bylo testováno 5 účinných látek a 3 fungicidy, a to v různých koncentracích (viz Tabulka 2, Tabulka 3) na 20 izolátech *Leptosphaeria maculans*, které byly klasifikovány do druhu pomocí polymerázové řetězové reakce s druhově specifickými primery a biologickým testem na bramboro-dextrózovém agaru (Fajemisin Anuoluwapo Olufadekemi, ústní podání). Ve výsledcích jsou přehledně uvedeny jednotlivé fungicidní látky vždy s tabulkou a grafem, zobrazující EC₅₀ a MIC pro jednotlivé izoláty a také graf, ukazující průměrný nárůst mycelia a průměrnou inhibici růstu testovaných izolátů při jednotlivých koncentracích dané fungicidní látky v porovnání s kontrolní variantou.

5.1 Účinné látky

V této diplomové práci bylo testováno 5 účinných látek – pyraklostrobin, prothiokonazol, tebukonazol, propikonazol a prochloraz. Všechny uvedené účinné látky byly testovány v koncentracích 0,001, 0,01, 0,1, 1 a 10 µg/ml. Inhibice či nárůst mycelia při daných koncentracích byl vždy porovnán s kontrolní variantou (bez účinné látky).

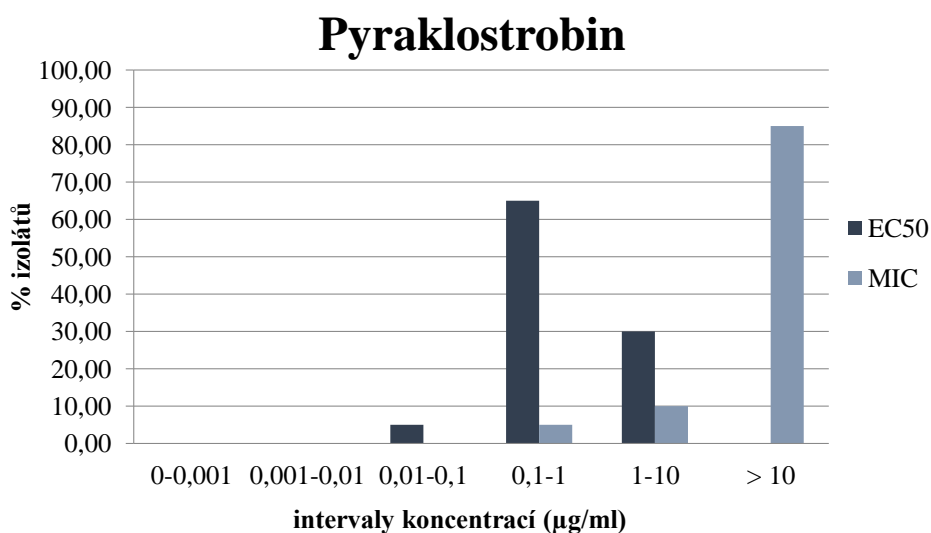
5.1.1 Pyraklostrobin

Jak můžeme vidět z níže uvedené Tabulka 4 a Graf 1, pro většinu testovaných izolátů (85 %) se hodnota MIC pohybuje nad 10 µg/ml, pouze u 2 izolátů (10 %) je hodnota MIC v rozmezí 1–10 µg/ml a u 1 izolátu (5 %) je MIC v intervalu 0,1–1 µg/ml. Lze tedy říci, že pro 100% inhibici všech izolátů by bylo třeba koncentrace účinné látky pyraklostrobin nad 10 µg/ml.

Efektivní koncentrace fungicidních látek inhibující růst mycelia z 50 % byla u 65 % izolátů v intervalu 0,1–1 µg/ml, u 30 % izolátů v intervalu 1–10 µg/ml a pouze u 5 % v rozmezí 0,01–0,1 µg/ml, přičemž nejvyšší EC₅₀ byla stanovena u izolátu 21/17 3/1, a to 9,03 µg/ml a nejnižší EC₅₀ u izolátu 17 PL 5 (0,05 µg/ml).

Tabulka 4 Přehled EC₅₀ (µg/ml) a MIC (intervaly koncentrací v µg/ml) účinné látky pyraklostrobin pro jednotlivé testované izoláty *Leptosphaeria maculans*

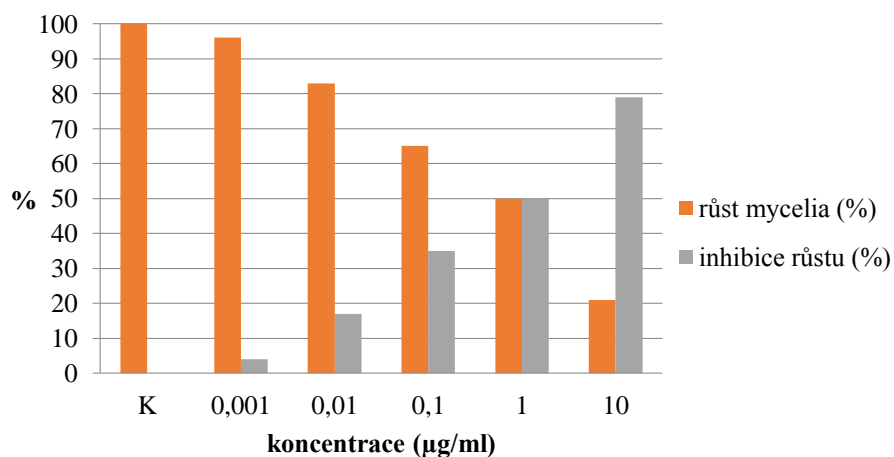
Izoláty	EC ₅₀	MIC
VP 3/1	1,403064524720560	> 10
VP 8	2,226724962858020	> 10
H 8/1	0,605785358471231	> 10
23/17 1/3	0,424546884633873	> 10
12/17 1/1	1,164825226687170	> 10
15 PI 2	0,106340685404313	> 10
15 PI 3	0,561428398554968	> 10
16 PI 4	0,607239888504660	> 10
16 PI 6	0,166057817139797	1–10
17 PI 1	0,895269646893855	> 10
17 PI 5	0,046303380124541	1–10
7 2/2 1S0-LL	0,300681556421765	> 10
9 2/2 1S0-HK	0,241279842824262	0,1–1
3/17 1/1	0,887559718329563	> 10
3/17 1/3	1,200500172146410	> 10
8/17 1/3	1,322230504595200	> 10
15/17 2/1	0,563042265730696	> 10
15/17 2/3	0,891777867681304	> 10
21/17 3/1	9,025001214269550	> 10
23/17 2/1	0,706695356206583	> 10



Graf 1 EC₅₀ a MIC u 20 izolátů (%) v reakci na účinnou látku pyraklostrobin.

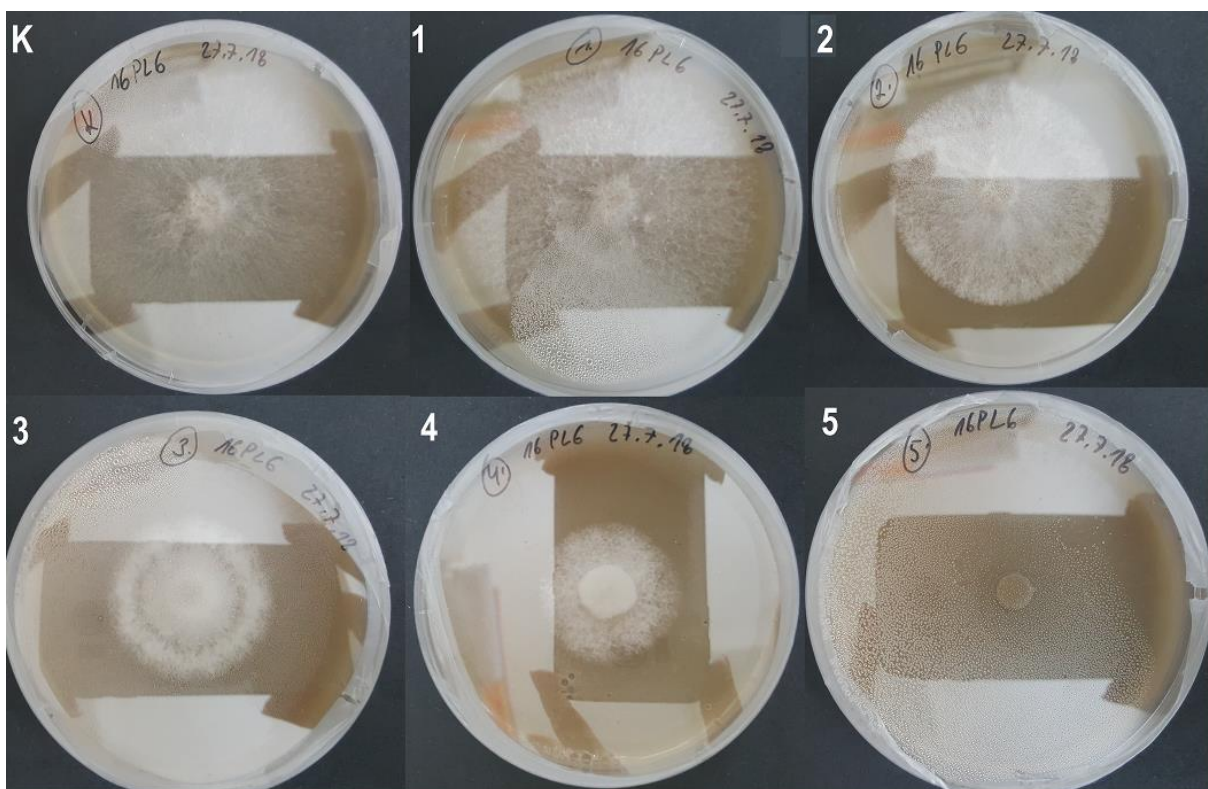
Jak lze předpokládat, průměrný růst mycelia všech testovaných izolátů měl se stoupající koncentrací účinné látky klesající tendenci, tedy inhibice růstu se spolu s koncentrací zvyšovala. Porovnání průměrného procentuálního růstu mycelia a inhibice růstu všech izolátů při různých koncentracích účinné látky pyraklostrobin oproti průměrné hodnotě kontrolních variant (K) lze vidět v Graf 2.

Pyraklostrobin



Graf 2 Srovnání průměrného nárůstu mycelia (%) a průměrné inhibice růstu (%) všech izolátů při jednotlivých koncentracích účinné látky pyraklostrobin (K – kontrolní varianta).

Níže je fotografie, demonstrující nárůst mycelia jednoho z izolátů (16 Pl 6) při snižování účinné látky pyraklostrobin (Obrázek 7).



Obrázek 7 Ukázka inhibice růstu mycelia u izolátu 16 Pl 6 při zvyšování koncentrace účinné látky pyraklostrobin (K – kontrola; 1 – 0,001 µg/ml; 2 – 0,01 µg/ml; 3 – 0,1 µg/ml; 4 – 1 µg/ml; 5 – 10 µg/ml).

5.1.2 Prothiokonazol

Jak lze vidět níže z Nejnižší EC_{50} byla nalezena u izolátu 7 2/2 1S0-LL – 0,27 $\mu\text{g/ml}$ a nejvyšší hodnota EC_{50} u izolátu 12/17 1/1 – 51,04 $\mu\text{g/ml}$.

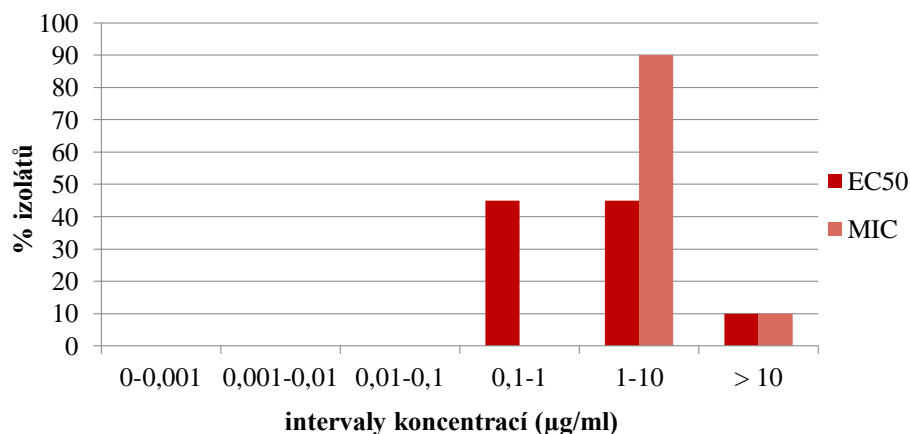
Tabulka 5 a Graf 3, hodnota MIC byla u 90 % izolátů stanovena v rozmezí koncentrací 1–10 $\mu\text{g/ml}$ a zbylých 10 % izolátů mělo hodnotu MIC > 10 $\mu\text{g/ml}$. Pro 100% inhibici těchto izolátů by tedy bylo třeba koncentrace > 10 $\mu\text{g/ml}$.

Hodnota EC_{50} byla u 45 % izolátů v intervalu 0,1–1 $\mu\text{g/ml}$, u dalších 45 % izolátů v rozmezí 1–10 $\mu\text{g/ml}$ a pouze 2 izoláty (10 %) měly hodnotu EC_{50} > 10 $\mu\text{g/ml}$. Pro přesnost, u těchto dvou zmíněných izolátů (12/17 1/1, 8/17 1/3) je zároveň hodnota MIC > EC_{50} . Nejnižší EC_{50} byla nalezena u izolátu 7 2/2 1S0-LL – 0,27 $\mu\text{g/ml}$ a nejvyšší hodnota EC_{50} u izolátu 12/17 1/1 – 51,04 $\mu\text{g/ml}$.

Tabulka 5 Přehled EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) a MIC (intervaly koncentrací v $\mu\text{g/ml}$) účinné látky prothiokonazol pro jednotlivé testované izoláty *Leptospaeria maculans*

Izoláty	EC_{50}	MIC
VP 3/1	4,654105977024540	1–10
VP 8	2,586215511448160	1–10
H 8/1	2,156369365245740	1–10
23/17 1/3	1,713966809594630	1–10
12/17 1/1	51,043808703043900	> 10, > EC_{50}
15 PI 2	1,296940425477700	1–10
15 PI 3	0,993559642236815	1–10
16 PI 4	0,449463230621355	1–10
16 PI 6	0,525989694735461	1–10
17 PI 1	0,411220259193181	1–10
17 PI 5	0,678034470444549	1–10
7 2/2 1S0-LL	0,265391931953146	1–10
9 2/2 1S0-HK	0,656866390027128	1–10
3/17 1/1	2,828274176423330	1–10
3/17 1/3	2,715550403354070	1–10
8/17 1/3	17,827965158116300	> 10, > EC_{50}
15/17 2/1	2,740123720806350	1–10
15/17 2/3	2,208936786894010	1–10
21/17 3/1	0,457379781514828	1–10
23/17 2/1	0,362478947511768	1–10

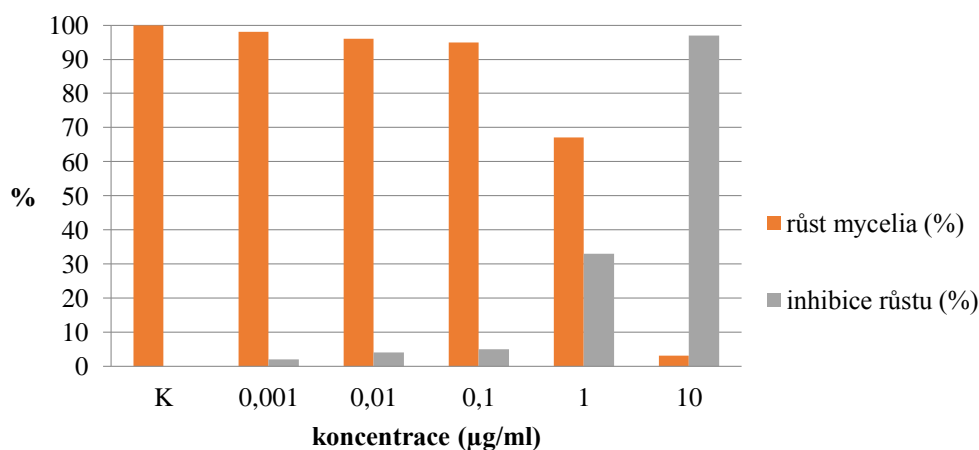
Prothiokonazol



Graf 3 EC₅₀ a MIC u 20 izolátů (%) v reakci na účinnou látku prothiokonazol.

V níže uvedeném Graf 4 lze vidět, že se zvyšující se koncentrací účinné látky prothiokonazol taktéž docházelo ke snižování průměrného nárůstu mycelia izolátů a zvyšování inhibice růstu jako u předchozí účinné látky. Pokles nárůstu mycelia byl ovšem výraznější až od koncentrace 1 µg/ml, u vyšších koncentrací byl nárůst mycelia více jak 90%. K 97% inhibici růstu došlo průměrně u všech izolátů při koncentraci účinné látky 10 µg/ml.

Prothiokonazol



Graf 4 Srovnání průměrného nárůstu mycelia (%) a průměrné inhibice růstu (%) všech izolátů při jednotlivých koncentracích účinné látky prothiokonazol (K – kontrolní varianta).

5.1.3 Tebukonazol

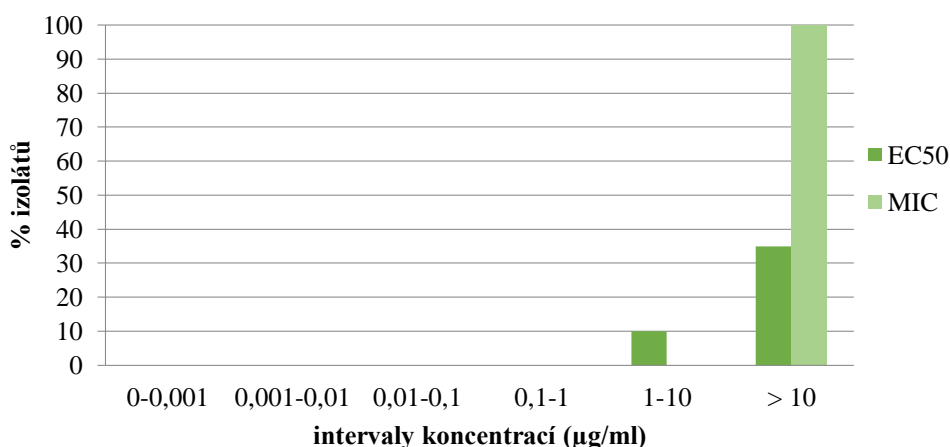
V Tabulka 6 a Graf 5 EC_{50} a MIC u 20 izolátů (%) v reakci na účinnou látku tebukonazol. můžeme vidět vypočítané hodnoty EC_{50} pouze pro 9 z 20 testovaných izolátů *Leptosphaeria maculans*. Pro zbylých 11 izolátů nebylo možné hodnotu EC_{50} vypočítat vzhledem k tomu, že ani u nejvyšší testované koncentrace účinné látky tebukonazol (10 $\mu\text{g/ml}$) nedošlo k inhibici růstu mycelia > 50 % a zároveň zvyšování inhibice růstu u jednotlivých koncentrací nebylo exponenciálního charakteru.

Hodnota MIC pro všechny izoláty byla tedy > 10 $\mu\text{g/ml}$. Při zahrnutí všech 20 izolátů byla u 35 % z nich hodnota EC_{50} stanovena nad 10 $\mu\text{g/ml}$ a u 10 % izolátů v intervalu 1–10 $\mu\text{g/ml}$, přičemž pro přesnost je zde uvedeno, že u izolátů kde bylo EC_{50} > 10 $\mu\text{g/ml}$ byla hodnota MIC zároveň > EC_{50} . U izolátů, kde bylo možné vypočítat EC_{50} , byla nejnižší hodnota nalezena u izolátu 23/17 2/1 (5,3 $\mu\text{g/ml}$) a nejvyšší hodnota EC_{50} u izolátu 17 Pl 1 (157,06 $\mu\text{g/ml}$).

Tabulka 6 Přehled EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) a MIC (intervaly koncentrací v $\mu\text{g/ml}$) účinné látky tebukonazol pro jednotlivé testované izoláty *Leptosphaeria* spp.

Izoláty	EC_{50}	MIC
VP 3/1	–	> 10
VP 8	–	> 10
H 8/1	–	> 10
23/17 1/3	–	> 10
12/17 1/1	–	> 10
15 Pl 2	–	> 10
15 Pl 3	43,74933047994250000	> 10, > EC_{50}
16 Pl 4	60,85941525337430000	> 10, > EC_{50}
16 Pl 6	60,43222080533720000	> 10, > EC_{50}
17 Pl 1	157,06054003845800000	> 10, > EC_{50}
17 Pl 5	10,12807634706340000	> 10, > EC_{50}
7 2/2 1S0-LL	9,55814258975635000	> 10
9 2/2 1S0-HK	17,68831381496120000	> 10, > EC_{50}
3/17 1/1	–	> 10
3/17 1/3	–	> 10
8/17 1/3	–	> 10
15/17 2/1	–	> 10
15/17 2/3	–	> 10
21/17 3/1	68,00538480799700000	> 10, > EC_{50}
23/17 2/1	5,30459624737937000	> 10

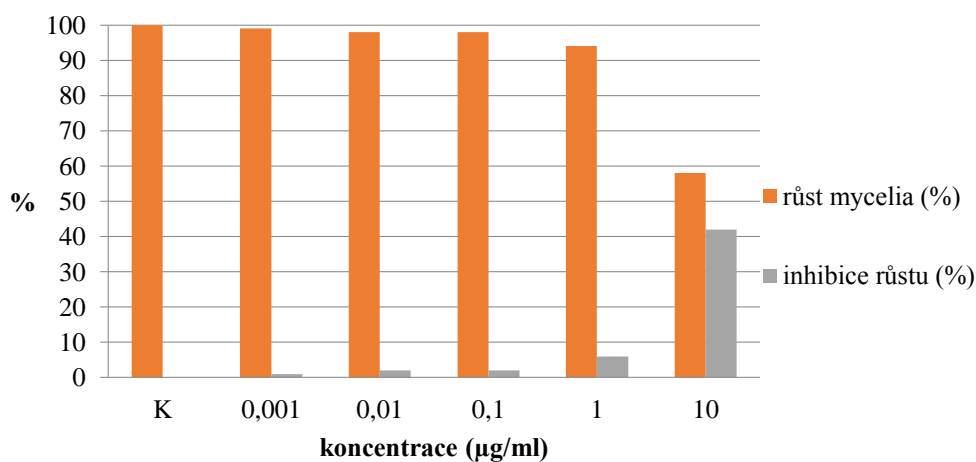
Tebukonazol



Graf 5 EC₅₀ a MIC u 20 izolátů (%) v reakci na účinnou látku tebukonazol.

V níže uvedeném Graf 6 lze vidět, že spolu s nárůstem koncentrace účinné látky tebukonazol došlo k předpokládanému snížení průměrného nárůstu mycelia a zvýšení průměrné inhibice růstu všech izolátů jako u předchozích fungicidních látek. Výraznější pokles nárůstu mycelia byl zaznamenán až u koncentrace 10 µg/ml, přičemž nedošlo ke snížení tohoto nárůstu ani pod 50 %, tedy průměrná inhibice růstu u této účinné látky při nejvyšší koncentraci byla 42 %.

Tebukonazol



Graf 6 Srovnání průměrného nárůstu mycelia (%) a průměrné inhibice růstu (%) všech izolátů při jednotlivých koncentracích účinné látky tebukonazol (K – kontrolní varianta).

5.1.4 Propikonazol

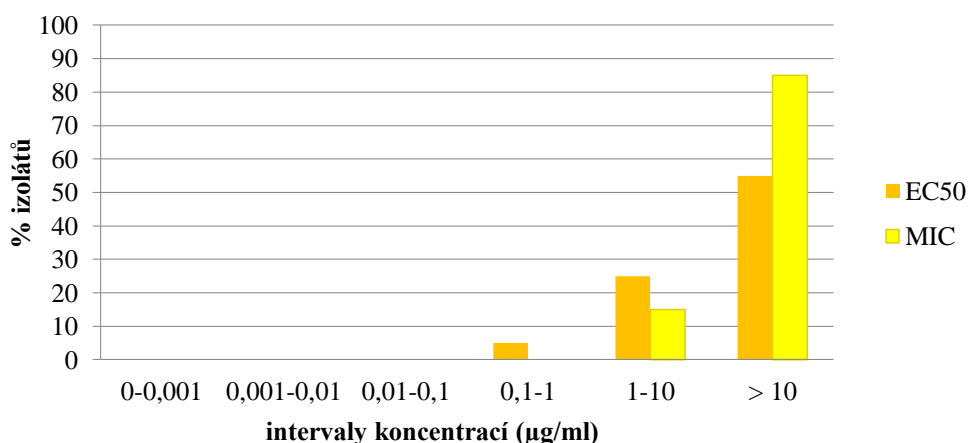
Při testování účinné látky propikonazol nebylo možné vypočítat EC_{50} u 3 z 20 izolátů taktéž z důvodu neexponenciálního charakteru zvyšování inhibice růstu mycelia a nedosažení ani 50% inhibice růstu u nejvyšší testované koncentrace této účinné látky.

Jak je uvedeno v Tabulka 7 a Graf 7, hodnota MIC byla zjištěna u 85 % izolátů nad koncentrací 10 $\mu\text{g/ml}$ a u zbylých 15 % izolátů v intervalu 1–10 $\mu\text{g/ml}$. Pokud počítáme s 20 izoláty, byla u 55 % izolátů hodnota $EC_{50} > 10 \mu\text{g/ml}$, u 25 % izolátů v intervalu 1–10 $\mu\text{g/ml}$ a u 5 % izolátů v rozmezí 0,1–1 $\mu\text{g/ml}$. U izolátů, kde byla hodnota $EC_{50} > 10 \mu\text{g/ml}$ je taktéž uvedeno, že hodnota MIC je $> EC_{50}$. Tam, kde bylo možné vypočítat EC_{50} , byla nejnižší hodnota nalezena u izolátu 7 2/2 1S0-LL, a to 0,52 $\mu\text{g/ml}$ a nejvyšší hodnota EC_{50} u izolátu 12/17 1/1 (33416,72 $\mu\text{g/ml}$).

Tabulka 7 Přehled EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) a MIC (intervaly koncentrací v $\mu\text{g/ml}$) účinné látky propikonazol pro jednotlivé testované izoláty *Leptosphaeria maculans*.

Izoláty	EC_{50}	MIC
VP 3/1	6306,122920849020000	$> 10, > EC_{50}$
VP 8	43,032306560385500	$> 10, > EC_{50}$
H 8/1	18,427009489103600	$> 10, > EC_{50}$
23/17 1/3	118,469572454476000	$> 10, > EC_{50}$
12/17 1/1	33416,724684696700000	$> 10, > EC_{50}$
15 PI 2	437,031349392301000	$> 10, > EC_{50}$
15 PI 3	–	> 10
16 PI 4	1,765916020462440	1–10
16 PI 6	11,462437716994000	$> 10, > EC_{50}$
17 PI 1	19,939085337605000	$> 10, > EC_{50}$
17 PI 5	4,600454951197180	> 10
7 2/2 1S0-LL	0,516786407674008	> 10
9 2/2 1S0-HK	1,844024951381910	1–10
3/17 1/1	390,192182421152000	$> 10, > EC_{50}$
3/17 1/3	371,093870140217000	$> 10, > EC_{50}$
8/17 1/3	303,925104706038000	$> 10, > EC_{50}$
15/17 2/1	–	> 10
15/17 2/3	–	> 10
21/17 3/1	4,563650775329540	1–10
23/17 2/1	1,487600988730540	> 10

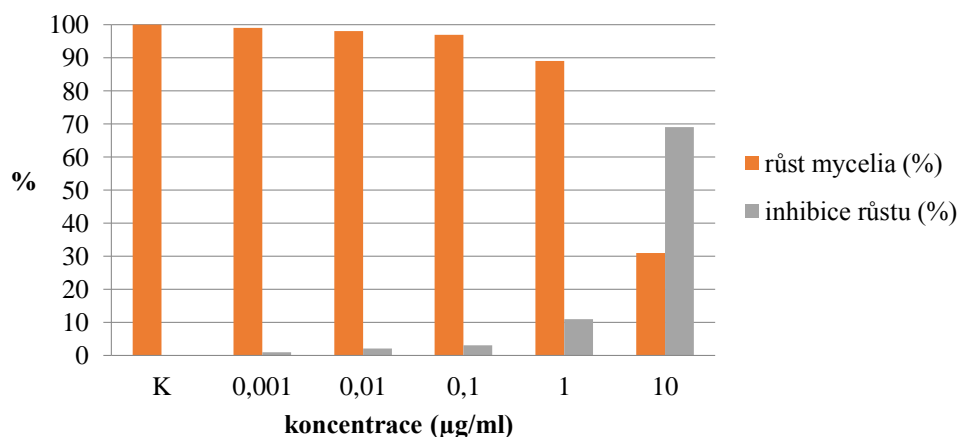
Propikonazol



Graf 7 EC₅₀ a MIC u 20 izolátů (%) v reakci na účinnou látku propikonazol.

V následujícím Graf 8 lze vidět, že při vyšší koncentraci účinné látky propikonazol docházelo taktéž, jako u předchozích fungicidních látek, ke snižování průměrného nárůstu mycelia všech izolátů a ke zvyšování inhibice růstu. K výraznější inhibici růstu došlo až při koncentraci 10 µg/ml, kdy bylo průměrně inhibováno 69 % růstu.

Propikonazol



Graf 8 Srovnání průměrného nárůstu mycelia (%) a průměrné inhibice růstu (%) všech izolátů při jednotlivých koncentracích účinné látky propikonazol (K – kontrolní varianta).

5.1.5 Prochloraz

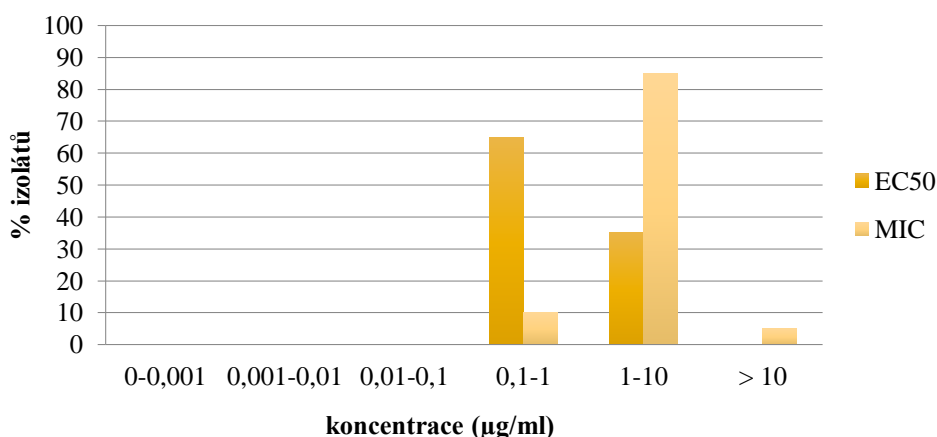
V níže uvedené Tabulka 8 a Graf 9 můžeme vidět, že u 85 % izolátů byla zjištěna hodnota MIC v intervalu 1–10 µg/ml a u 10 % izolátů v rozmezí 0,1–1 µg/ml. Nejvyšší hodnota MIC byla nalezena u izolátu 23/17 1/3, kde by pro 100% inhibici růstu mycelia bylo potřeba koncentrace této účinné látky více jak 10 µg/ml.

Hodnota EC₅₀ byla u 65 % testovaných izolátů v intervalu 0,1–1 µg/ml a u 35 % v rozmezí 1–10 µg/ml. Nejnižší hodnota EC₅₀ byla stanovena u izolátu 23/17 2/1 0 (15 µg/ml) a nejvyšší u izolátu 12/17 1/1 (1,89 µg/ml).

Tabulka 8 Přehled EC₅₀ (µg/ml) a MIC (intervaly koncentrací v µg/ml) účinné látky prochloraz pro jednotlivé testované izoláty *Leptosphaeria maculans*.

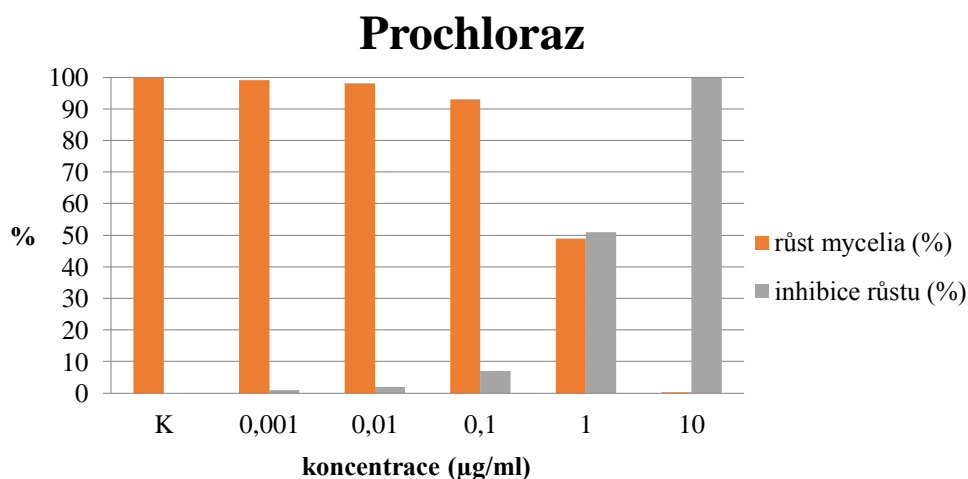
Izoláty	EC ₅₀	MIC
VP 3/1	1,422820053190620	1–10
VP 8	1,241049646742190	1–10
H 8/1	0,530099115841425	1–10
23/17 1/3	0,987921897962019	> 10
12/17 1/1	1,886170257801900	1–10
15 PI 2	0,663542176370378	1–10
15 PI 3	0,809428211597936	1–10
16 PI 4	1,123551776565290	1–10
16 PI 6	0,671265387183617	1–10
17 PI 1	0,214858888970483	0,1–1
17 PI 5	0,325399389268515	1–10
7 2/2 1S0-LL	0,200854482912413	1–10
9 2/2 1S0-HK	0,249397151420797	0,1–1
3/17 1/1	1,264858150369780	1–10
3/17 1/3	1,599397204459380	1–10
8/17 1/3	1,269431717502750	1–10
15/17 2/1	0,852840632805589	1–10
15/17 2/3	0,902938609422656	1–10
21/17 3/1	0,279979588912956	1–10
23/17 2/1	0,145233870332715	1–10

Prochloraz



Graf 9 EC₅₀ a MIC u 20 izolátů (%) v reakci na účinnou látku prochloraz.

V následujícím Graf 10 můžeme vidět klesající průměrný nárůst mycelia všech izolátů spolu se zvyšováním koncentrace účinné látky, a tedy současně zvyšující se průměrnou inhibicí růstu, přičemž u této fungicidní látky byla u nejvyšší testované koncentrace (10 µg/ml) průměrná inhibice růstu 100%.



Graf 10 Srovnání průměrného nárůstu mycelia (%) a průměrné inhibice růstu (%) všech izolátů při jednotlivých koncentracích účinné látky prochloraz (K – kontrolní varianta).

5.2 Fungicidy

V této práci byly testovány 3 fungicidy – Tilmor (ú. l. prothiokonazol a tebukonazol), Horizon (ú. l. tebukonazol) a Bumper (ú. l. propikonazol a prochloraz). Při výběru koncentrací testovaných látek se vycházelo z koncentrací obsažené účinné látky fungicidu. Všechny uvedené účinné látky testovaných fungicidů, až na prochloraz (Bumper) a tebukonazol (Tilmor), byly použity v 8 koncentracích – 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1000 µg/ml. Účinná látka prochloraz, obsažena ve fungicidu Bumper, byla použita v koncentracích 0,00044, 0,0044, 0,044, 0,44, 4,4, 44, 444, 4444 µg/ml a tebukonazol obsažený v přípravku Tilmor v koncentracích 0,0002, 0,002, 0,02, 0,2, 2, 20, 200, 2000 µg/ml. Inhibice či nárůst mycelia při daných koncentracích byl vždy porovnán s kontrolní variantou.

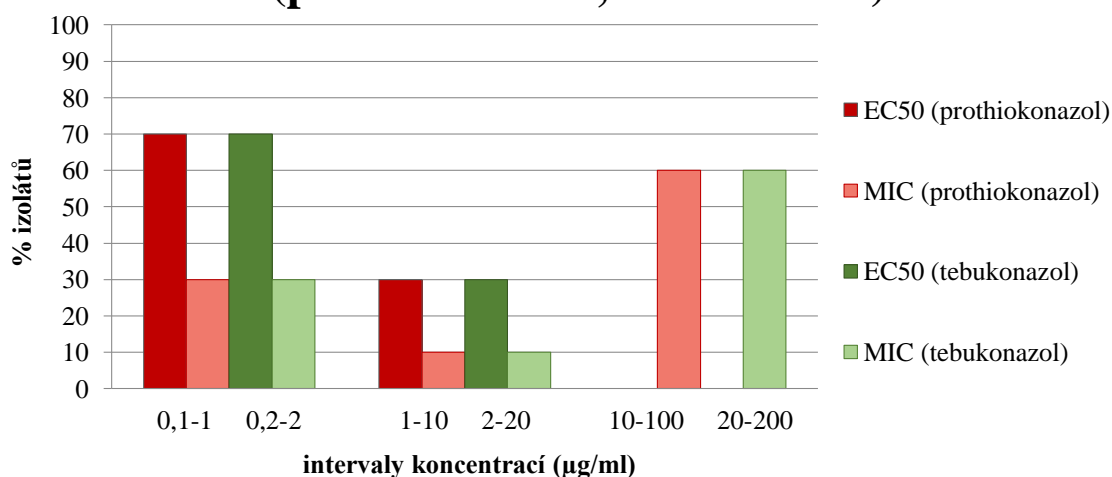
5.2.1 Tilmor

V uvedené Tabulka 9 a Graf 11 lze vidět, že hodnota MIC pro prothiokonazol byla u většiny testovaných izolátů (60 %) stanovena v intervalu 10–100 µg/ml, u 30 % izolátů v rozmezí 0,1–1 µg/ml a pouze u 10 % izolátů v rozmezí 1–10 µg/ml. Pro tebukonazol jsou hodnoty MIC dvojnásobné. Hodnota EC₅₀ byla u 70 % izolátů vypočítána v intervalu 0,1–1 (0,2–2) µg/ml a u zbytku (30 %) v intervalu 1–10 (2–20) µg/ml. Nejnižší hodnota EC₅₀ byla nalezena u izolátů 17 Pl 1 a 23/17 2/1, u kterých byl při koncentracích 0–0,1, resp. 0–0,2 µg/ml pozorován 100% nárůst mycelia a u zbylých testovaných koncentrací byl nárůst mycelia naopak zcela inhibován. Nejvyšší hodnota EC₅₀ byla stanovena u izolátu 12/17 1/1 – 3,7 µg/ml pro prothiokonazol a 7,4 µg/ml pro tebukonazol.

Tabulka 9 Přehled EC₅₀ (µg/ml) a MIC (intervaly koncentrací v µg/ml) u fungicidu Tilmor s účinnou látkou prothiokonazol a tebukonazol pro jednotlivé testované izoláty *Leptosphaeria maculans*.

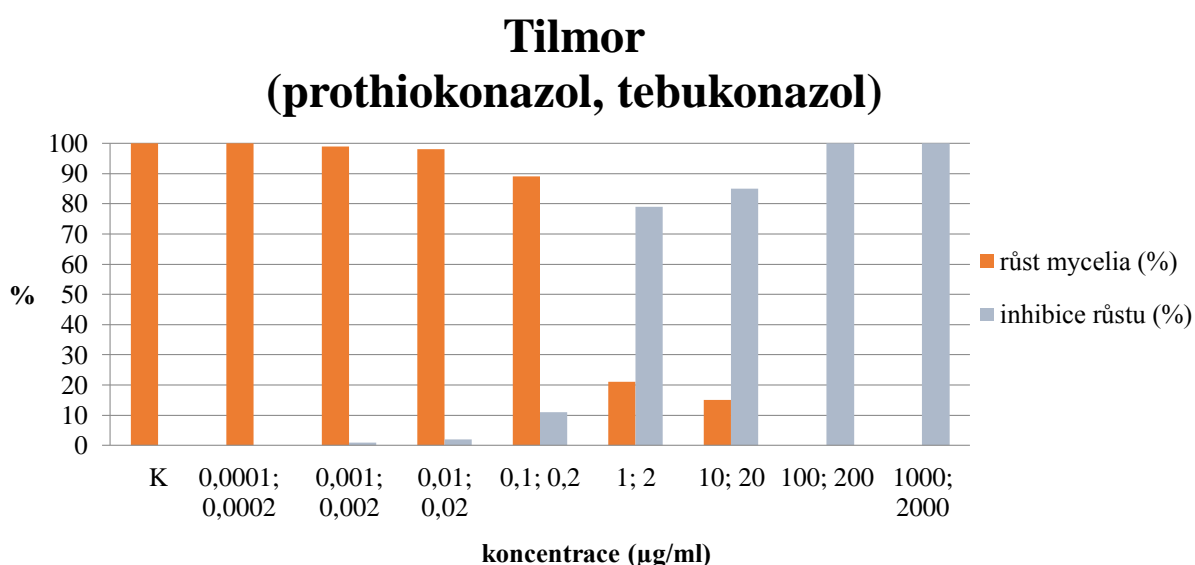
Izoláty	prothiokonazol		tebukonazol	
	EC ₅₀	MIC	EC ₅₀	MIC
VP 3/1	0,557871718142430	10–100	1,115743436284860	20–200
VP 8	0,962578441760957	10–100	1,925156883521920	20–200
H 8/1	1,587382143653250	10–100	3,174764290373030	20–200
23/17 1/3	0,399694659022344	1–10	0,803931897423197	2–20
12/17 1/1	3,698668913175930	10–100	7,397337826914930	20–200
15 PI 2	1,388848157034730	10–100	2,777696314069450	20–200
15 PI 3	0,349004421099129	0,1–1	0,698008842198260	0,2–2
16 PI 4	0,458758997472752	0,1–1	0,917517994945506	0,2–2
16 PI 6	0,375843958560958	1–10	0,751687917121917	2–20
17 PI 1	0,314877397986374	0,1–1	0,629754795972749	0,2–2
17 PI 5	0,425280500261712	10–100	0,850561000523425	20–200
7 2/2 1S0-LL	0,644662740818911	0,1–1	1,289325474719840	0,2–2
9 2/2 1S0-HK	0,672637311535368	0,1–1	1,343581558511730	0,2–2
3/17 1/1	1,244345791523570	10–100	2,488691583047140	20–200
3/17 1/3	0,585147956057082	10–100	1,176164204666540	20–200
8/17 1/3	1,264532171574090	10–100	2,529064343148180	20–200
15/17 2/1	0,632117206652058	10–100	1,264234412942810	20–200
15/17 2/3	1,143358686037490	10–100	2,286717372074970	20–200
21/17 3/1	0,314877397986374	0,1–1	0,629754795972749	0,2–2
23/17 2/1	0,356734585418310	10–100	0,713469170836619	20–200

Tilmor (prothiokonazol, tebukonazol)



Graf 11 EC₅₀ a MIC u 20 izolátů (%) v reakci na fungicid Tilmor s účinnou látkou prothiokonazol a tebukonazol v daných koncentracích.

U níže uvedeného Graf 12 můžeme vidět, že trend nárůstu mycelia a inhibice růstu při zvyšování koncentrace fungicidu byl obdobný jako u testovaných účinných látek v předchozí kapitole (Účinné látky). U fungicidu Tilmor došlo k výraznějšímu poklesu nárůstu mycelia taktéž při koncentraci prothiokonazolu 1 µg/ml jako u testované samostatné účinné látky, ovšem zde byl růst inhibován při dané koncentraci v průměru ze 79 % a u samostatné účinné látky (kapitola 5.1.2) pouze z 33 %. Od koncentrace 100 µg/ml byla inhibice již 100%. Oproti tomu tebukonazol, pokud byl použit samostatně (kapitola 5.1.3), inhiboval při koncentraci 2 µg/ml růst mycelia pouze z 6 %.



Graf 12 Srovnání průměrného nárůstu mycelia (%) a průměrné inhibice růstu (%) všech izolátů při jednotlivých koncentracích účinné látky prothiokonazol a tebukonazol u fungicidu Tilmor (K – kontrolní varianta).

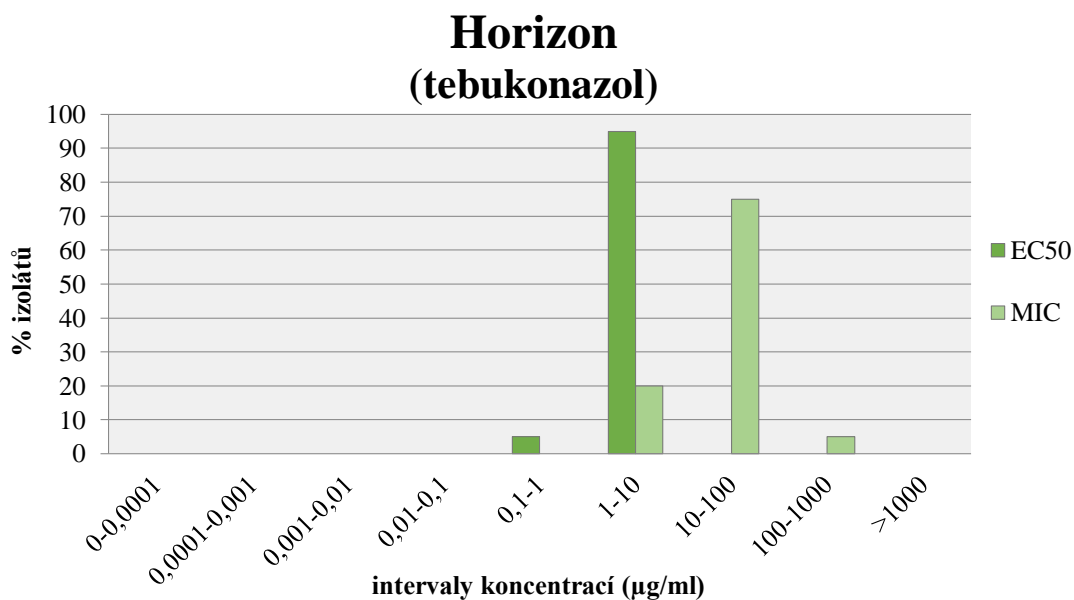
5.2.2 Horizon

V následující Tabulka 10 a Graf 13 lze vidět, že u většiny izolátů (75 %) byla hodnota MIC v rozmezí koncentrací 10–100 µg/ml, u 20 % v intervalu 1–10 µg/ml a pouze u jednoho izolátu až v rozmezí 100–1000 µg/ml.

Hodnota EC₅₀ byla u 95 % izolátů v intervalu 1–10 µg/ml a pouze u jednoho izolátu (7 2/2 1S0-LL) byla tato hodnota v rozmezí 0,1–1 µg/ml. Tento izolát měl tedy nejnižší hodnotu EC₅₀ – 0,76 µg/ml. Nejvyšší hodnota EC₅₀ byla zjištěna u izolátu 8/17 1/3 (5,56 µg/ml).

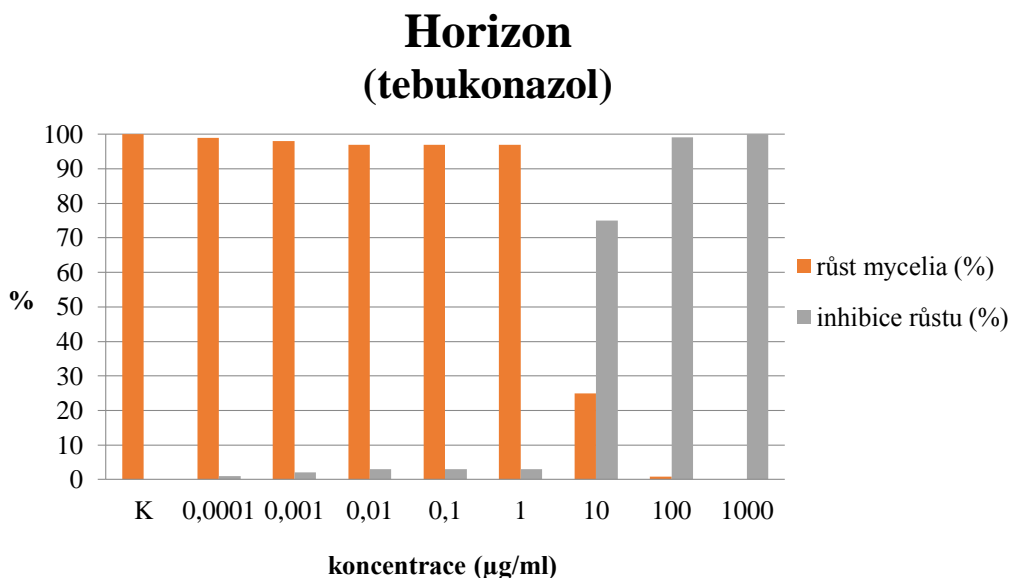
Tabulka 10 Přehled EC₅₀ (µg/ml) a MIC (intervaly koncentrací v µg/ml) u fungicidu Horizon s účinnou látkou tebukonazol pro jednotlivé testované izoláty *Leptosphaeria maculans*.

Izoláty	EC ₅₀	MIC
VP 3/1	3,220829608631380	10–100
VP 8	4,271511760121230	100–1000
H 8/1	1,568101559434140	10–100
23/17 1/3	3,484775712246290	10–100
12/17 1/1	4,784862996761730	10–100
15 Pl 2	2,300302819630990	10–100
15 Pl 3	2,354326654085750	10–100
16 Pl 4	2,209586815545030	10–100
16 Pl 6	1,274736808339040	1–10
17 Pl 1	3,394146131016540	10–100
17 Pl 5	1,795837736142520	10–100
7 2/2 1S0-LL	0,755989927998214	10–100
9 2/2 1S0-HK	1,579059941115910	1–10
3/17 1/1	2,741410006073620	10–100
3/17 1/3	2,657072525865250	10–100
8/17 1/3	5,564021012102580	10–100
15/17 2/1	4,265792344054650	10–100
15/17 2/3	3,959298521258430	10–100
21/17 3/1	1,344495156805060	1–10
23/17 2/1	1,066833485890000	1–10



Graf 13 EC₅₀ a MIC u 20 izolátů (%) v reakci na fungicid Horizon s účinnou látkou tebukonazol v daných koncentracích.

V uvedeném Graf 14 můžeme vidět obdobný trend snižování nárůstu mycelia a zvyšování inhibice růstu při zvyšování koncentrace účinné látky, kdy došlo opět, jako u testované samostatné účinné látky tebukonazol, k výraznější inhibici růstu mycelia od koncentrace 10 $\mu\text{g/ml}$, přičemž u samostatné účinné látky byla inhibice 42% a v případě fungicidu Horizon byla inhibice 75%. K 100% inhibici růstu mycelia došlo zde až při koncentraci účinné látky 1000 $\mu\text{g/ml}$.



Graf 14 Srovnání průměrného nárůstu mycelia (%) a průměrné inhibice růstu (%) všech izolátů při jednotlivých koncentracích účinné látky tebukonazol u fungicidu Horizon (K – kontrolní varianta).

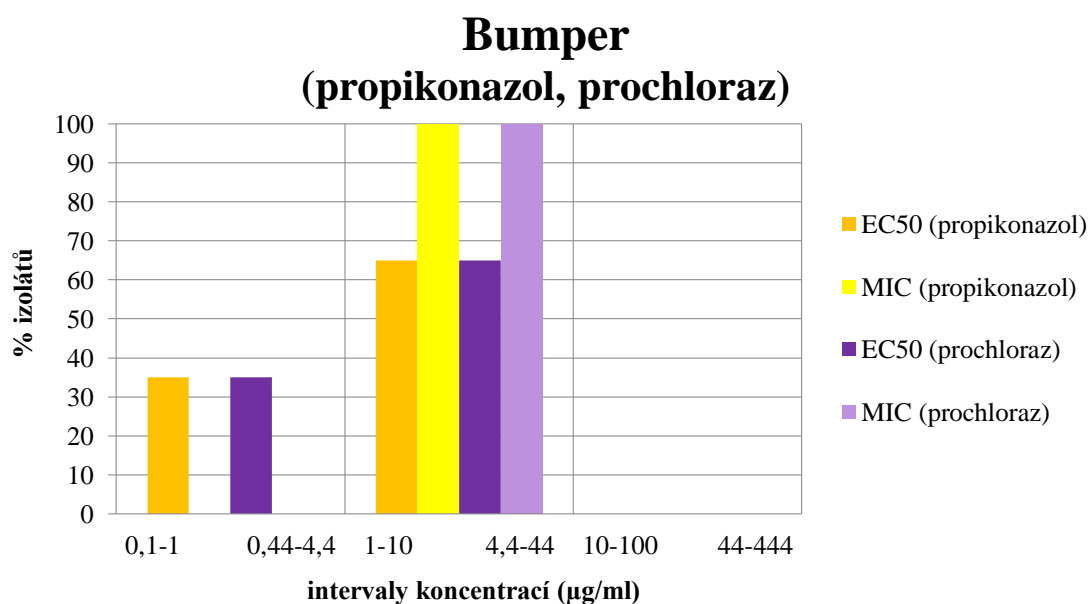
5.2.3 Bumper

Z Tabulka 11 a Graf 15 můžeme vidět, že u 100 % izolátů byla hodnota MIC u účinné látky propikonazol v intervalu 1–10 $\mu\text{g/ml}$ a u účinné látky prochloraz v rozmezí 4,4–44 $\mu\text{g/ml}$.

Hodnota EC_{50} se u fungicidu Bumper v případě účinné látky propikonazol pohybovala u 65 % izolátů v intervalu koncentrací 1–10 $\mu\text{g/ml}$ a u 35 % izolátů v rozmezí 0,1–1 $\mu\text{g/ml}$. Nejnižší hodnota EC_{50} u této účinné látky byla nalezena u izolátu 7 2/2 1S0-LL (0,18 $\mu\text{g/ml}$) a naopak nejvyšší hodnota EC_{50} u izolátu 23/17 1/3 (2,83 $\mu\text{g/ml}$). V případě účinné látky prochloraz, byla hodnota EC_{50} u 65 % izolátů v intervalu 4,4–44 $\mu\text{g/ml}$, u 35 % izolátů v rozmezí 0,44–4,4 $\mu\text{g/ml}$. U izolátu 7 2/2 1S0-LL byla nalezena nejnižší hodnota EC_{50} (0,79 $\mu\text{g/ml}$). Nejvyšší EC_{50} pro prochloraz byla zaznamenána taktéž u izolátu 23/17 1/3 (12,48 $\mu\text{g/ml}$).

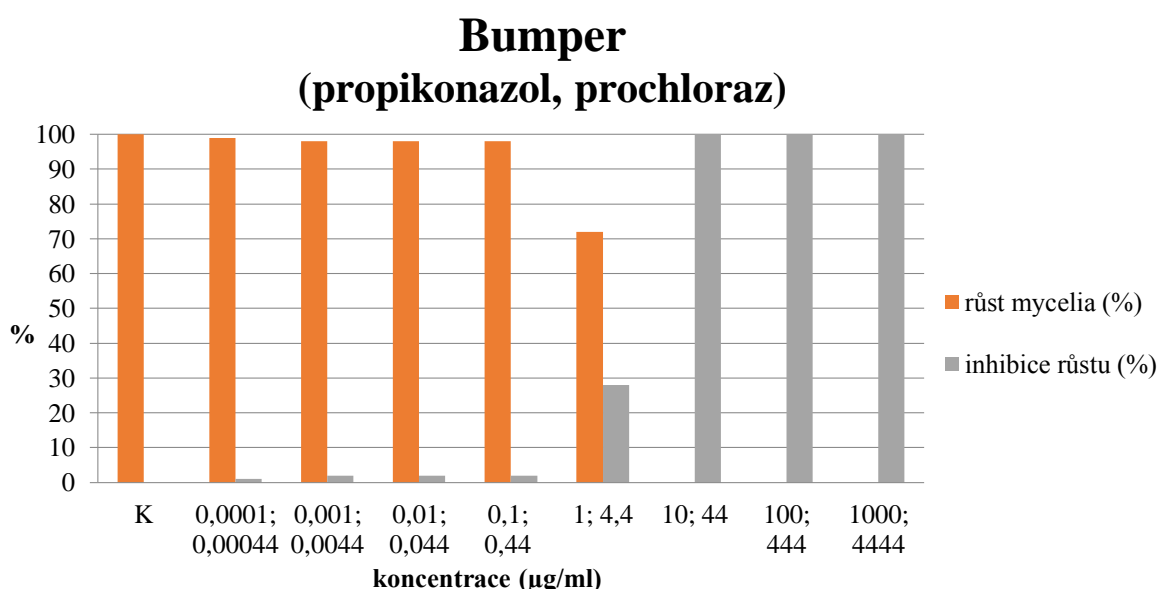
Tabulka 11 Přehled EC₅₀ (µg/ml) a MIC (intervaly koncentrací v µg/ml) u fungicidu Bumper s účinnými látkami propikonazol a prochloraz pro jednotlivé testované izoláty *Leptosphaeria maculans*.

Izoláty	propikonazol		prochloraz	
	EC ₅₀	MIC	EC ₅₀	MIC
VP 3/1	2,161516304738840	1-10	9,541850827963360	4,4-44
VP 8	2,558560920886230	1-10	11,295039487412500	4,4-44
H 8/1	2,674898468699000	1-10	11,811087845583800	4,4-44
23/17 1/3	2,827465819395240	1-10	12,482417679859000	4,4-44
12/17 1/1	2,137488623705410	1-10	9,435754661435380	4,4-44
15 Pl 2	2,543235337325850	1-10	11,228140519170000	4,4-44
15 Pl 3	2,058289659709050	1-10	9,086239249692360	4,4-44
16 Pl 4	0,617658913808856	1-10	2,725257371797780	4,4-44
16 Pl 6	0,696421075765367	1-10	3,072965185040920	4,4-44
17 Pl 1	0,623106028736044	1-10	2,749304088519680	4,4-44
17 Pl 5	1,161030609140050	1-10	5,124972178178190	4,4-44
7 2/2 1S0-LL	0,179787300158313	1-10	0,792669778202195	4,4-44
9 2/2 1S0-HK	0,528738795159155	1-10	2,332771945375230	4,4-44
3/17 1/1	2,342440697518620	1-10	10,340738727632800	4,4-44
3/17 1/3	2,246731398196260	1-10	9,918125399611000	4,4-44
8/17 1/3	1,577675157745860	1-10	6,963879579825290	4,4-44
15/17 2/1	1,577675157745860	1-10	6,963879579825290	4,4-44
15/17 2/3	2,544056621024770	1-10	11,230994229550000	4,4-44
21/17 3/1	0,511035003950215	1-10	2,254572625628660	4,4-44
23/17 2/1	0,981800798554971	1-10	4,333389830817360	4,4-44



Graf 15 EC₅₀ a MIC u 20 izolátů (%) v reakci na fungicid Bumper s účinnými látkami propikonazol a prochloraz v daných koncentracích.

V níže uvedeném Graf 16 lze vidět, že u fungicidu Bumper byl opět se stoupající koncentrací patrný obdobný trend růstu mycelia a inhibice růstu jako u předchozích fungicidních látek. Při testování samostatné účinné látky propikonazol (kapitola 5.1.4), byla zaznamenána výraznější inhibice růstu mycelia při koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ (69% inhibice) a u účinné látky prochloraz při koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ (51% inhibice). Dále byla u testování samostatné účinné látky prochloraz (kapitola 5.1.5) při koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ inhibice již 100%. V případě fungicidu Bumper s těmito účinnými látkami, byla výraznější inhibice při koncentracích propikonazolu 1 $\mu\text{g/ml}$ a prochlorazu 4,4 $\mu\text{g/ml}$ (28% inhibice), přičemž dále od koncentrace propikonazolu 10 $\mu\text{g/ml}$ a prochlorazu 44 $\mu\text{g/ml}$, docházelo již k 100% inhibici růstu.



Graf 16 Srovnání průměrného nárůstu mycelia (%) a průměrné inhibice růstu (%) všech izolátů při jednotlivých koncentracích účinných látek propikonazol a prochloraz u fungicidu Bumper (K – kontrolní varianta).

6. Diskuze

Osevních ploch zastoupených řepkou olejkou v posledních letech přibývá, a to díky jejímu všestrannému využití, velmi dobré rentabilitě a také změnám ve struktuře osevních ploch na našem území (Zehnálek 2018). Vzhledem k tomuto faktu přibývá chorob a škůdců, které se na těchto pozemcích každoročně vyskytují a snižují tak kvalitu i výnos plodiny. Jelikož se tedy příliš nedodrhuje střídání plodin, dochází ke snižování biodiverzity a půda ztrácí své přirozené fyto-sanitární vlastnosti, je třeba více dbát na ochranu plodin, a to všemi dostupnými prostředky (Šaroun 2006). Kazda et al. (2010) uvádějí, že mezi základní ochranné metody proti fytopatogenům se řadí zpracování půdy, výsev zdravého a uznaného osiva, správně provedené setí ve správné hustotě a také výběr odolných odrůd. Nejúčinnější metodou je zatím stále chemická ochrana, která ovšem může při nesprávném používání vést až ke vzniku rezistentních kmenů škodlivých organismů a následnému zvyšování dávek pesticidů při ochraně rostlin vůči nim či dokonce nedostupnosti funkční chemické ochrany.

Tato diplomová práce se zabývá citlivostí několika izolátů původce, způsobujícího černání stonku brukvovitých – patogenu *Leptosphaeria maculans*, k několika účinným látkám a fungicidům při rozdílných koncentracích. Znalosti o míře citlivosti patogenu, a tedy i míře inhibičních schopností jednotlivých fungicidních látek jsou jedním z předpokladů efektivního používání chemických látek při ochraně rostlin.

V této diplomové práci byl testován vliv 5 účinných látek – pyraklostrobin, prothiokonazol, tebukonazol, propikonazol, prochloraz a 3 fungicidů – Tilmor (ú. l. prothiokonazol, tebukonazol), Horizon (ú. l. tebukonazol) a Bumper (ú. l. propikonazol, prochloraz) v různých koncentracích na 20 izolátů patogenu *L. maculans*, původci jedné z nejčastějších chorob řepky. Citlivost tohoto patogenu testovalo ve své práci několik autorů, například Plachká et al. (2016) k fungicidům Horizon (ú. l. tebukonazol), Efilor (ú. l. metkonazol, boskalid), Pictor (ú. l. dimoxystrobin, boskalid), Propulse (ú. l. prothiokonazol, fluopyram) a Prosaro (ú. l. tebukonazol, prothiokonazol), dále Poslušná & Plachká (2015) k fungicidům Symetra (ú. l. isopyrazam, azoxystrobin) a také Horizon, Efilor, Pictor nebo del Río Mendoza et al. (2018) k účinným látkám azoxystrobin a pyraklostrobin.

Při testování výše uvedených účinných látek a fungicidů, byl v této práci u všech látek pozorován snižující se nárůst mycelia a naopak zvyšující se inhibice růstu mycelia při zvyšování koncentrace fungicidní látky v živném médiu oproti kontrolní variantě, která neobsahovala žádné fungicidní látky. Tento fakt potvrzují ve své práci také Plachká et al. (2017), del Río Mendoza et al. (2018) nebo Ručková (2015).

Co se týče testovaných samostatných účinných látek, byla pozorována nejmenší průměrná inhibiční schopnost u účinné látky tebukonazol, kde byl i při koncentraci 1 µg/ml zaznamenán průměrný nárůst mycelia 94 % oproti kontrole a při nejvyšší testované koncentraci (10 µg/ml) se nárůst mycelia nesnížil pod 50 %. Hodnota MIC pak byla stanovena u 100 % izolátů > 10 µg/ml. Naopak nejvyšší inhibiční schopnost již při koncentraci 0,1 µg/ml vykazovala účinná látka pyraklostrobin, u které byl pozorován v průměru při této koncentraci 65% nárůst mycelia. Ovšem u nejvyšší testované koncentrace (10 µg/ml) byl nárůst u této účinné látky průměrně 21 % a u prochlorazu pouze 0,3 %, který byl tedy při této koncentraci účinnější.

Při testování fungicidů byl pozorován nejnižší inhibiční efekt u přípravku Horizon s účinnou látkou tebukonazol, u kterého byl i při koncentraci účinné látky 100 µg/ml pozorován nárůst mycelia, i když pouze u jediného izolátu (VP 8), kde byl nárůst 17,75% v porovnání s kontrolou. U ostatních fungicidů byla při této koncentraci inhibice růstu mycelia již 100%. U fungicidu Bumper byla zaznamenána 100% inhibice již u koncentrace účinných látek propikonazol 10 µg/ml a prochloraz 44 µg/ml, kde je ovšem nutno brát v potaz účinek obou těchto látek. Hodnota MIC pak byla pro účinnou látku tebukonazol u fungicidu Horizon stanovena u 75 % izolátů v intervalu 10–100 µg/ml, u účinné látky prothiokonazol fungicidu Tilmor u 60 % izolátů v intervalu také 10–100 µg/ml. Uvažujeme-li o tebukonazolu jako o součásti přípravku Tilmor, pak interval hodnot MIC byl oproti prothiokonazolu u této skupiny izolátů dvojnásobný, tedy 20–200 µg/ml. Při použití fungicidu Bumper byla ve 100 % případů vymezena MIC v intervalech – pro propikonazol 1–10 µg/ a prochloraz 4,4–44 µg/ml. Ručková (2015) ve své diplomové práci testovala 5 fungicidních přípravků – Horizon, Efilor, Pictor, Propulse, Prosaro – a pozorovala taktéž nejnižší citlivost izolátů *Leptosphaeria* spp. k přípravku Horizon, u kterého stanovila hodnotu MIC 0,0125 % (0,125 µl/ml). Tuto hodnotu MIC stanovily pro přípravek Horizon při testování citlivosti tohoto patogenu také Plachká et al. (2016).

Je zřejmé, že nejvíce účinným fungicidem byl přípravek Bumper, který představuje kombinaci dvou účinných látek, přičemž propikonazol má systémový účinek a prochloraz lokálně systémový účinek. Jak uvádí Matusínský et al. (2011), při fungicidním ošetřování patří mezi základní antirezistentní strategie střídání skupin účinných látek nebo používání kombinovaných fungicidů, obsahující více účinných látek s různým mechanismem účinku. Existuje jen několik málo prací zabývajících se testováním citlivosti patogenů *Leptosphaeria* spp. vůči fungicidním látkám a ve většině případů jde o látky ze skupiny azolů, jelikož je k nim často pozorována snížená citlivost v polních podmínkách.

Eckert et al. (2010) v rámci *in vitro* testování dokonce zjistili také rozdíly v citlivosti mezi druhy *L. maculans* a *L. biglobosa*, kdy nižší citlivost k fungicidům flusilazol a tebukonazol byla zjištěna u izolátů *L. biglobosa*. Sewell et al. (2017) zase zjistili v porovnání s

L. biglobosa nižší citlivost druhu *L. maculans* k účinné látce *prothioconazole-desthio*, naopak vyšší citlivost *L. maculans* k látce flusilazol a žádné rozdíly v citlivosti mezi druhy vůči látce tebuconazol. Ručková (2015) ve své práci zase uvádí, že mezi izoláty *L. maculans* a *L. biglobosa* nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v citlivosti vůči výše zmíněným použitým přípravkům. Sewell et al. (2017) dále pozorovali odlišnou citlivost těchto patogenů k azolovým fungicidům mezi testováním *in vitro* a *in planta*.

Van de Wouw et al. (2017) ve své práci zjišťovali hodnoty EC_{50} při použití účinné látky ze skupiny azolů – tebukonazol, a to u odolných a citlivých izolátů *Leptosphaeria maculans*. Ze všech testovaných izolátů byla nejčastěji hodnota EC_{50} (u 30 %) zjištěna v rozmezí koncentrací 0,5–0,6 $\mu\text{g/ml}$, přičemž z toho byly 2/3 izolátů rezistentní a 1/3 izolátů kontrolní (citlivé). V této diplomové práci byla u izolátů *L. maculans* při použití účinné látky tebukonazol zjištěna nejčastěji hodnota $EC_{50} > 10 \mu\text{g/ml}$ (u 35 % izolátů), přičemž nejnižší sledovaná hodnota EC_{50} byla 5,3 $\mu\text{g/ml}$ a nejvyšší hodnota EC_{50} byla 157,06 $\mu\text{g/ml}$. Sewell et al. (2017) uvádějí nejnižší hodnotu EC_{50} při testování účinné látky tebukonazol na izolátech *L. maculans* v *in vitro* testování $< 0,8 \mu\text{g/ml}$ a nejvyšší v intervalu 0,8–1,6 $\mu\text{g/ml}$. Rozdíl mezi těmito hodnotami EC_{50} a hodnotami jiných autorů se u jednotlivých izolátů velmi liší, což může být způsobeno určitou odolností některých izolátů tohoto patogenu. Hegebarth (2010) ve své práci testovala citlivost izolátů *Leptosphaeria* spp. k několika fungicidům ze skupiny azolů (difenokonazol, flusilazol, prochloraz, prothiokonazol, tebukonazol, metkonazol), kdy nejvyšší hodnoty EC_{50} byly zjištěny u účinných látek prothiokonazol a tebukonazol, v této diplomové práci byly nejvyšší hodnoty EC_{50} zaznamenány u účinných látek propikonazol a tebukonazol.

U účinné látky prothiokonazol v *in planta* podmínkách Sewell et al. (2017) zase pozorovali téměř 45% nárůst mycelia oproti kontrole při koncentraci 2 $\mu\text{g/ml}$ a téměř 35% nárůst mycelia oproti kontrole při koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$. V této diplomové práci byl zjištěn při *in vitro* testování této účinné látky 67% nárůst mycelia oproti kontrole při koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ a 30% nárůst při koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$.

Jak uvádějí Fraser et al. (2016), u fungicidů ze skupiny strobilurinů, které se používají při ochraně řepky vůči fomovému černání stonku, hrozí také vyšší riziko vzniku rezistence patogenu vůči nim. Pro účinnou látku pyraklostrobin zde uvádějí hodnotu $EC_{50} = 0,09 \mu\text{g/ml}$.

Río Mendoza et al. (2018) při testování citlivosti patogenu *L. maculans* vůči účinné látce pyraklostrobin uvádějí střední hodnotu $EC_{50} = 0,0018 \mu\text{g/ml}$. V této diplomové práci byla hodnota EC_{50} pro pyraklostrobin u 65 % izolátů v intervalu 0,1–1 $\mu\text{g/ml}$, u 30 % v intervalu 1–10 $\mu\text{g/ml}$ a pouze u jednoho izolátu v rozmezí hodnot 0,01–0,1 $\mu\text{g/ml}$, přičemž u nejnižší testované koncentrace 0,001 $\mu\text{g/ml}$ byl nárůst mycelia 96%.

Jak uvádí Prokop (2017), konečné formulace přípravků kromě účinné látky nebo kombinace účinných látek, obsahují také formulační přísady, safenery, adjuvanty a v neposlední řadě synergenty, které podporují aktivitu obsažené účinné látky. V této diplomové práci byly testovány účinné látky tebukonazol, prothiokonazol, propikonazol a prochloraz jak samostatně, tak obsažené ve fungicidním přípravku. Z výsledků je patrné, že všechny tyto účinné látky měly odlišné inhibiční schopnosti v totožných koncentracích právě v případě samostatném použití nebo pokud byly součástí fungicidu. U účinné látky prothiokonazol byl výraznější pokles průměrného nárůstu mycelia zaznamenán u koncentrace 1 $\mu\text{g/ml}$, kdy u samostatné účinné látky byl tento nárůst oproti kontrolní variantě 67% a u fungicidu Tilmor s touto účinnou látkou v dané koncentraci 79%. V tomto případě měla účinná látka vyšší inhibiční schopnost při samostatném použití. U samostatné účinné látky tebukonazol bylo výraznější snížení průměrného nárůstu mycelia zaznamenáno až u koncentrace 10 $\mu\text{g/ml}$ (58 %) a při použití fungicidu Horizon s touto účinnou látkou, byl při této koncentraci průměrný nárůst mycelia 25% – zde byl tedy účinnější fungicid. U fungicidu Bumper byl průměrný nárůst mycelia 0 % již u koncentrace propikonazolu 10 $\mu\text{g/ml}$ a prochlorazu 44 $\mu\text{g/ml}$, ovšem u samostatně testovaných účinných látek byl průměrný nárůst mycelia při těchto koncentracích u propikonazolu 31 % a u prochlorazu 0,3 %. Jak již bylo řečeno, je nutno brát v potaz kombinaci dvou účinných látek obsažených ve fungicidu Bumper.

Z výše zmíněných údajů vyplývá, že je často pozorována snížená citlivost izolátů patogenu *Leptosphaeria* spp. k přípravku Horizon, respektive k účinné látce tebukonazol, která je nejvíce (2017 spotřebováno 70 282 kg) využívána při ochraně řepky vůči chorobě způsobované tímto patogenem (Musil 2018). V ceníku chemických přípravků z roku 2019 na stránkách E-agro, je uvedena cena za 1 litr přípravku Horizon 910,-, Tilmor 1.004,- a Bumper 1.054,- (uvedené ceny jsou bez DPH). Jedním z důvodů častého používání fungicidu Horizon a následné tvorbě odolnosti patogenů vůči němu, může být i cena výrobku, která je pěstiteli často preferována. Opakovaná volba stejného přípravku se stejným mechanismem účinku může ovšem vést ke zmíněné snížené citlivosti patogenu a následné zhoršené či dokonce nedostupné ochraně vůči němu. Proto je nutné dodržovat antirezistentní strategie, ať už

výběrem vhodné odrůdy a pozemku, správným zpracováním půdy a založením porostu, používáním doporučené dávky přípravků, střídáním různých účinných látek s jiným místem působení či použitím kombinovaného přípravku nebo samotným monitoringem odolných škodlivých organismů a rizikových přípravků (Ackermann 2013; Kazda et al. 2010).

7. Závěr

- V práci bylo testováno 5 účinných látek (pyraklostrobin, prothiokonazol, tebukonazol, propikonazol, prochloraz) a 3 fungicidy (Tilmor, Horizon, Bumper) při různých koncentracích a to na 20 izolátech patogenu *Leptosphaeria maculans*.
- Byla prokázána hypotéza různé citlivosti izolátů vůči jednotlivým fungicidním látkám.
- Nejnižší citlivost izolátů tohoto patogenu byla zjištěna k účinné látce tebukonazol, u kterého byla při koncentraci 10 µg/ml zjištěna průměrná inhibice růstu mycelia 42 %. U fungicidů byla sledována nejnižší citlivost izolátů k přípravku Horizon, který obsahuje také účinnou látku tebukonazol a zde byla průměrná inhibice růstu při stejné koncentraci 75 %. Při koncentraci 100 µg/ml byla inhibice růstu u všech fungicidů 100% až na přípravek Horizon, kde byl u jediného izolátu pozorován nárůst mycelia.
- Nejvyšší citlivost patogenu byla pozorována při testování účinné látky prochloraz, kde došlo u koncentrace 1 µg/ml k průměrné inhibici růstu z 51 % a při koncentraci 10 µg/ml dokonce k průměrné inhibici růstu z 99,7 %. Z fungicidů měl nejvyšší inhibiční schopnost přípravek Bumper, a to i vzhledem ke kombinaci dvou účinných látek (propikonazol, prochloraz).
- Rezistence k testovaným fungicidním látkám nebyla prokázána, ale vzhledem ke snížené citlivosti izolátů *Leptosphaeria* spp. k fungicidu Horizon a účinné látce tebukonazol, je nutné tento přípravek vnímat jako rizikový a je zde možnost potencionálního vzniku rezistentních populací tohoto patogenu.
- Často je pěstitelé preferována cena přípravku a jeho vysoká účinnost bez ohledu na to, jaké negativní následky může mít opakované používání stejných či dokonce rizikových fungicidů. Z důvodu potencionálního vzniku rezistentních kmenů škodlivých organismů a následného omezení možností ochrany vůči nim, je nutné dodržovat antirezistentní strategie, jako je dodržování doporučené dávky přípravků, střídání jednotlivých skupin látek s různým mechanismem účinku, ale také monitoring těchto více či méně odolných organismů a rizikových fungicidů.

8. Literární zdroje

1. Ash G. 2000. Blackleg of oilseed rape. The Plant Health Instructor DOI: 10.1094/PHI-I-20001111-01
2. Aubertot JN, Sohbi Y, Brun H, Penaud A, Nutter FW. 2006. Phomadidacte: A computer-aided training program for the severity assessment of phoma stem canker of oilseed rape. International Organization for Biological Control Bulletin **29**(7):247-254.
3. Balba H. 2007. Review of strobilurin fungicide chemicals. Journal of Environmental Science and Health **42**:441-451.
4. Balesdent MH, Attard A, Khün ML, Rouxel T. 2002. New Avirulence Genes in the Phytopathogenic Fungus *Leptosphaeria maculans*. Phytopathology 92(10):1122-1133.
5. Bartlett D, Clough J, Godwin J, Hall A, Hamer M, Parr-Dobrzanski B. 2002. The strobilurin fungicides. Pest Management Science 58:649–62.
6. Bečka D, Vašák J, Zupalová H, Mikšík V. 2007. Řepka ozimá- Pěstitelský rádce. Kurent, s.r.o. Praha.
7. Bokor P. 2018. Choroby koreňov repky ozimnej. Repka **7**:4-7.
8. Bowell GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C, Minibayeva F. 2002. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. Journal of Experimental Botany 53:1368-1376.
9. Burge HA. 1986. Some comments on the aerobiology of fungus spores. Grana **25**:143-146.
10. Brazauskienė I, Piliponytė A, Petraitiene E, Brazauskas G. 2011. Diversity of *Leptosphaeria maculans* / *L. biglobosa* species complex and epidemiology of phoma stem canker on oilseed rape in Lithuania., Journal of Plant Pathology 93(3):577-585.
11. Carter HE, Fraaije BA, West JS, Kelly SL, Mehl A, Shaw MW, Cools HJ. 2013. Alterations in the predicted regulatory and coding regions of the sterol 14 α -demethylase gene (*CYP51*) confer decreased azole sensitivity in the oilseed rape pathogen *Pyrenopeziza brassicae*. Molecular Plant Pathology **15**:513–22.
12. De Vos M, Van Oosten VR, Van Poecke RM, Van Pelt JA, Pozo MJ, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux JP, Van Loon LC, Dicke M, Pieterse CM. 2005. Signal Signature and Transcriptome Changes of Arabidopsis During Pathogen and Insect Attack. Molecular plant-microbe interactions 18:923-937.

13. Del Río Mendoza LE, Ruud S, Shahoveisi F. 2018. Sensitivity of *Leptosphaeria maculans* to azoxystrobin and pyraclostrobin. NDSU Plant Pathology. DOI: 10.13140/RG.2.2.30785.61286
14. Eckert MR, Rossall S, Selley A, Fitt BDL. 2010. Effects of fungicides on *in vitro* spore germination and mycelial growth of the phytopathogens *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* (phoma stem canker of oilseed rape). Pest Management Science **66**:396–405.
15. Elliott CE, Gardiner DM, Thomas G, Cozijnsen A, De Wouw AV, Howlett BJ. 2007. Production of the toxin sirodesmin PL by *Leptosphaeria maculans* during infection of *Brassica napus*. Molecular Plant Pathology **8**:791-802.
16. Ferezou JP, Riche C, Quesneau-Thierry A, Pascard-Billy C, Barbier M, Bousquet JF, Boudart G. 1977. Structures de deux toxines isolees des cultures du champignon *Phoma lingam* Tode: La sirodesmine PL et la desacetylsirodesmin PL. J. Chim. **1**:327-334.
17. Fernando WGD, Zhang X, Amarasinghe CHC. 2016. Detection of *Leptosphaeria maculans* and *Leptosphaeria biglobosa* Causing Blackleg Disease in Canola from Canadian Canola Seed Lots and Dockage. Plants **5**(1):12.
18. Fitt BDL, Brun H, Barbetti MJ, Rimmer SR. 2006. World-wide importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*) in Sustainable strategies for managing *Brassica napus* (oilseed rape) resistance to *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker). European Journal of Plant Pathology **114**:3–15.
19. Fitt BDL, Huang YJ, van den Bosch F, West JS. 2006. Coexistence of related pathogen species on arable crops in space and time. Annual Review of Phytopathology **44**:163-182.
20. Fraser M, Hwang SF, Ahmed HF, Akhavan A, Stammler G, Barton W, Strelkov SE. 2016. Sensitivity of *Leptosphaeria maculans* to pyraclostrobin in Alberta, Canada. Canadian Journal of Plant Science **97**(1):83-91.
21. Georgopoulos SG, Skylakakis G. 1986. Genetic variability in the fungi and the problem of fungicide resistance. Crop Protection **5**(5):299-305.
22. Gladders P, Symonds BV, Hardwick NV, Sansford CE. 1998. Opportunities to control canker (*Leptosphaeria maculans*) in winter oilseed rape by improved spray timing. International Organization for Biological Control Bulletin **21**:111–120.

23. Glazebrook J. 2005. Contrasting Mechanisms of Defense against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43:205-227.
24. Grinn-Gofroń A. 2009. The spores of *Alternaria* in aeroplankton and its relationships with the meteorological factors. *Acta Agrobotanica* 62:3-8.
25. Guo X, Fernando WGD, Entz M. 2008. Dynamics of infection by *Leptosphaeria maculans* on canola (*Brassica napus*) as influenced by crop rotation and tillage. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 41(1):57-66
26. Gullino ML, Leroux P, Smith CM. 2000. Uses and challenges of novel compounds for plant disease control. *Crop Protection* 19:1-11
27. Hall R. 1992. Epidemiology of blackleg of oilseed rape. *Canadian Journal of Plant Pathology* 14:46–55.
28. Hruška M, et al. 2018. Situační a výhledová zpráva – Půda. Ministerstvo zemědělství, Praha.
29. Hýsek J, Vach M, Javůrek M. 2008. Biologická ochrana obilnin proti houbovým fytopatogenům - Metodika pro praxi. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha.
30. Chen CY, Howlett BJ. 1996. Rapid necrosis of guard cells is associated with the arrest of fungal growth in leaves of Indian mustard (*Brassica juncea*) inoculated with avirulent isolates of *Leptosphaeria maculans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 48:73-81.
31. Jędryczka M. 2007. Epidemiology and damage caused by stem canker of oilseed rape in Poland. *Phytopathologia Polonica* 45:73-75.
32. Kaczmarek J, Jędryczka M, Fitt BDL, Lucas JA, Latunde - Dada AO. 2009. Analyses of air samples for ascospores of *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* with light microscopic and molecular techniques. *Journal of Applied Genetics* 50(4):411-419.
33. Kaczmarek J, Jędryczka M. 2011. Characterization of two coexisting pathogen populations of *Leptosphaeria spp.*, the cause of stem tanker of Brassicas. *Acta Agrobotanica* 64(2):3–14.
34. Kachlicki P, Stobiecki M, Jędryczka M. 1996. Kwas benzoesowy – fitotoksyczny metabolit szczepu Tox0 grzyba *Phoma lingam*. *Rośliny Oleiste* 17:193-198.
35. Kazda J, Škeřík J, Nerad D, Baranyk P, Herda G, Volf M. 2008. Metodika integrované ochrany řepky. Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin, SPZO s.r.o. Praha.
36. Kazda J, Mikulka J, Prokinová E. 2010. Encyklopedie ochrany rostlin – polní plodiny. Profi Press, Praha.

37. Kocourek F, Havel J, Hovorka T, Jursík M, Kazda J, Kolařík P, Plachká E, Skuhrovec J, Seidenglanz M, Šafář J. 2018. Metodika integrované ochrany řepky vůči škodlivým organismům vyjma podzimních škůdců. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha.
38. Koch E, Badawy HMA, Hoppe H. 1989. Differences between aggressive and non-aggressive single spore lines of *Leptosphaeria maculans* in cultural characteristics and phytotoxin production. *Journal of Phytopathology* **124**:52-62.
39. Kuusk AK, Happstadius I, Zhou L, Steventon LA, Giese H, Dixelius C. 2002. Presence of *Leptosphaeria maculans* Group A and Group B Isolates in Sweden. *Journal of Phytopathology* **150**(6):349-356.
40. Leadbeater A. 2015. Recent developments and challenges in chemical disease control. *Plant Protection Science* **51**:163–9.
41. Li H, Barbetti MJ, Sivasithamparam K. 2003. Responses of *Brassica napus* cultivars to *Leptosphaeria maculans* field isolates from western Australia. *Brassica* **5**(34):25-34
42. Liška M. 2017. Situační a výhledová zpráva: Olejníky. Ministerstvo zemědělství, Praha.
43. Lucas JA, Hawkins NJ, Fraaije BA. 2015. Chapter Two - The Evolution of Fungicide Resistance. *Advances in Applied Microbiology* **90**:29-92.
44. Ma Z, Michailides TJ. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* **24**:853–863.
45. Málek B, Herda G, Říha K, Škeřík J, Šaroun J, Kazda J, Baranyk P, Volf M. 2011. Stanovisko k pesticidům – Řepka. SPZO s.r.o., Praha.
46. Marcroft SJ, Sprague SJ, Salisbury PA, Howlett BJ. 2004. Potential for using host-resistance to reduce production of pseudothecia and ascospores of *Leptosphaeria maculans*, the blackleg pathogen of *Brassica napus*. *Plant Pathology* **53**:468–474.
47. Matušinsky P., Tvarůžek L., Vyšehlidová M., Horáčková S. Potvrzení výskytu rezistence ke strobilurinům u *Mycosphaerella graminicola* (anamorph.: *Septoria tritici*) v oblasti Kroměříže. 2011. *Obilnářské listy* **19**(3-4):51-53.
48. Matušinsky P, Váňová M, Polišínská I, Spitzerová D, Janeček M, Smutný V. 2013. Nepřímá opatření k omezení výskytu klasových fuzarióz u obilovin. *Obilnářské listy* **21**(3-4):62-64.

49. Mazáková J, Urban J, Zouhar M, Ryšánek P. 2017. Analysis of *Leptosphaeria* species complex causing phoma leaf spot and stemcanker of winter oilseed rape (*Brassica napus*) in the Czech Republic. *Crop & Pasture Science* **68**(3):254–264.
50. Musil B. 2018. Spotřeba přípravků na OR v roce 2017. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno.
51. Naseri B, Davidson JA, Scott ES. 2009. Maturation of pseudothecia and discharge of ascospores of *Leptosphaeria maculans* on oilseed rape stubble. *European Journal of Plant Pathology* **125**(4):523-531.
52. Piliponyte-Dzikiene A, Kaczmarek J, Petraitiene E, Kasprzyk I, Brazauskiene I, Brazauskas G, Jedryczka M. 2014. Microscopic and molecular detection of *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* ascospore content in air samples. *Zemdirbyste-Agriculture* 101(3):303-312.
53. Petrie GA. 1986. Consequences of survival of *Leptosphaeria maculans* (blackleg) in canola stubble residue through an entire crop rotation sequence. *Canadian Journal of Plant Pathology* **8**:353.
54. Plachká E, Poslušná J, Mazáková J. 2016. Testování citlivosti/rezistence houbových patogenů řepky olejky – *Sclerotinia sclerotiorum*, *Leptosphaeria maculans* a *L. biglobosa* k fungicidům. OSEVA PRO s.r.o., Opava.
55. Plachká E, Šafář J, Prokinová E, Odstrčilová L. 2018. Signalizační modely *Leptosphaeria* spp. a *Sclerotinia sclerotiorum*. OSEVA vývoj a výzkum s.r.o., Opava.
56. Poslušná J, Plachká E. 2009. Odolnost vybraných genotypů ozimé řepky olejky vůči fomové hnilobě brukvovitých (*Leptosphaeria maculans*) a bílé hnilobě řepky (*Sclerotinia sclerotiorum*) hodnocených na zkušebních lokalitách v Šumperku a Opavě. *Úroda* **12**:191-194.
57. Poslušná J, Plachká E. 2011. Výskyt Fomové Hniloby (*Leptosphaeria maculans*, *L. biglobosa*) na severní Moravě (Šumpersko, Opavsko) v Posledních Letech. *Úroda* **12**:251-254.
58. Poslušná J, Plachká E. 2015a. Testování citlivosti patogenů *Leptosphaeria* spp. a *Sclerotinia sclerotiorum* vůči vybraným fungicidům. Page 73 in Sborník abstraktů, XX. česká a slovenská konference o ochraně rostlin. Katedra ochrany rostlin FAPPZ ČZU v Praze, Praha.
59. Poslušná J, Plachká E. 2015b. Signalizace fungicidního ošetření řepky olejky proti houbovým chorobám. Page 71 in Sborník abstraktů, XX. česká a slovenská konference o ochraně rostlin. Katedra ochrany rostlin FAPPZ ČZU v Praze, Praha.

60. Price CL, Parker JE, Warrilow AG, Kelly DE, Kelly SL. 2015. Azole fungicides - understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens.
61. Pest Management Science **71**(8):1054-8.
62. Prokinová E. 2003. Choroby řepky - význam v ČR a ochrana proti nim. Pages 76-80 in Brixí J, editor. Sborník Řepka, Mák, Hořčice. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.
63. Prokinová E. 2006. Choroby řepky. Pages 24-29 in kolektiv autorů, editors. Ziskové pěstování řepky ozimé. DAS Praha
64. Rouxel T, Willner E, Coudard L, Balesdent MH. 2003. Screening and identification of resistance to *Leptosphaeria maculans* (stem canker) in *Brassica napus* accessions. Euphytica **133**(2):219-231.
65. Ručková J. 2015. Stanovení citlivosti patogenů *Leptosphaeria maculans* a *L. biglobosa* k vybraným fungicidům [diploma thesis]. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.
66. Russell PE. 2005. A century of fungicide evolution. Journal of Agricultural Science **143**:11-25.
67. Ryšánek P, Burketová L. 2017 Rezistence řepky k houbám z rodu *Leptosphaeria* – cesta ke stabilizaci jejích výnosů? Rostlinolékař **6**:16-18.
68. Ryšánek P, Urban J, Mazáková J, Zouhar M, Plachká E, Poslušná J, Pokorný R, Spitzer T. 2010. Monitoring výskytu *Leptosphaeria maculans* a *L. biglobosa* na území České republiky. Úroda **12**:343-346.
69. Sewell TR, Hawkins NJ, Stotz HU, Huang YJ, Kelly SL, Kelly DE, Fraaije B, Fitt BDL. 2017. Azole sensitivity in *Leptosphaeria* pathogens of oilseed rape: the role of lanosterol 14 α -demethylase. Scientific Reports **7**(1):15849.
70. Sexton AC, Howlett B J. 2001. Green fluorescent protein as a reporter in the *Brassica-Leptosphaeria maculans* interaction. Physiological and Molecular Plant Pathology **58**:13-21.
71. Shoemaker RA, Brun H. 2001. The teleomorph of the weakly aggressive segregate of *Leptosphaeria maculans*. Canadian Journal of Botany **79**(4):412-419.
72. Schwander F, Eibach R, Fechter I, Hausmann L, Zyprian E, Töpfer R. 2011. Rpv10: a new locus from the Asian Vitigene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. Theoretical and Applied Genetics **124**:163-176.

73. Sierotzki H, Scalliet G. 2013. A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation Succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Phytopathology* **103**:880–7.
74. Sippell DW, Hall R. 1995. Glucose Phosphate Isomerase polymorphisms distinguish weakly virulent from highly virulent-strains of *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **17**:1-6.
75. Spellberg B, Guidos R, Gilbert D, Bradley J, Boucher HW, Scheld WM. 2008. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* **46**(2):155-164.
76. Sprague SJ, Watt M, Kirkegaard JA, Howlett BJ. 2007. Pathways of infection of *Brassica napus* roots by *Leptosphaeria maculans*. *New Phytologist* **176**(1):211-22.
77. Šaroun J. 2006. Regulárory růstu- součást intenzivní výroby řepky. Pages 30-38 in kolektiv autorů, editors. *Ziskové pěstování řepky ozimé*. DAS Praha
78. Šašek V, Korbelová B, Burketová L. 2007. Antioxidační mechanismy a signální dráhy řepky aktivované při napadení *Leptosphaeria maculans*. Pages 33-39 in *Interakce mezi rostlinami a patogenními mikroorganismy*, 5. odborný seminář. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Praha.
79. Šašek V, Nováková M, Dobrev PI, Valentová O, Burketová L. 2012. β -aminobutyric acid protects *Brassica napus* plants from infection by *Leptosphaeria maculans*. Resistance induction or a direct antifungal effect? *European Journal of Plant Pathology* **133**(1):279-289.
80. Toscano-Underwood C, Huang CYJ, Fitt BDL, Hall AM. 2003. Effects of temperature on maturation of pseudothecia of *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* on oilseed rape stem debris. *Plant Pathology* **52**:726-736.
81. Travadon R, Bousset L, Saint Jean S, Brun H, Sache I. 2007. Splash dispersal of *Leptosphaeria maculans* pycnidiospores and the spread of blackleg on oilseed rape. *Plant Pathology* **56**(4):595-603.
82. Van de Wouw AP, Elliott VL, Chang S, López-Ruiz FJ, Marcroft SJ, Idnurm A. 2017. Identification of isolates of the plant pathogen *Leptosphaeria maculans* with resistance to the triazole fungicide fluquinconazole using a novel *In Planta* assay. *PLoS One* **12** (e0188106) DOI: 10.1371/journal.pone.0188106.

83. Věchet L. 2012. Biologická kontrola chorob rostlin. Podstata, odlišné přístupy, mechanizmy. Pages 8-12 in Věchet L, editor. Biologická kontrola chorob rostlin - 9. odborný seminář. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha.
84. West JS, Biddulph JE, Fitt BDL, Gladders P. 1999. Epidemiology of *Leptosphaeria maculans* in relation to forecasting stem canker severity on winter oilseed rape in the UK. *Annals of Applied Biology* **135**:535–546.
85. West JS, Evans N, Liu S, Hu B, Peng L. 2000. *Leptosphaeria maculans* causing stem canker of oilseed rape in China. *New Disease Reports* 1:3.
86. West JS, Kharbanda PD, Barbetti MJ, Fitt BLD. 2001. Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. *Plant Pathology* **50**:10-27.
87. West JS, Balesdent MH, Rouxel T, Narcy JP, Huang YJ, Roux J. 2002. Colonization of winter oilseed rape tissues by A/Tox(+) and B/Tox(0) *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in France and England. *Plant Pathology* **51**:311–321.
88. Williams PH. 1992. Biology of *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **14**:30-35.
89. Wretblad S. 2002. Deface responses in *Brassica nigra* and *B. napus* to the fungal pathogen *Leptosphaeria maculans* [doctoral thesis]. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Sweden.
90. Zehnálek P. 2018. Olejniny 2018 - Seznam doporučených odrůd řepky olejky ozimé 2018. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno.
91. Ziogas BN, Malandrakis AA. 2015. Sterol biosynthesis inhibitors: C14 Demethylation (DMIs). Pages 199-216 in Ishii H, Hollomon DW, editors. *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*. Springer, Japan.
92. Zhang X, White RP, Demir E, Jedryczka M, Lange RM, Islam M, Li ZQ, Huang YJ, Hall AM, Zhou G, Wang Z, Cai X, Skelsey P, Fitt BDL. 2013. *Leptosphaeria* spp., phoma stem canker and potential spread of *L. maculans* on oilseed rape crops in China. *Plant Pathology* **63**(3):598-612.
93. Zhang X, Fernando D. 2017. Insights into fighting against blackleg disease of *Brassica napus* in Canada. *Crop and Pasture Science* **69**(1):40-47.
94. Zhu B, Rimmer SR. 2003. Inheritance of resistance to *Leptosphaeria maculans* in two accessions of *Brassica napus*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **25**: 98-103.

9. Internetové zdroje

95. Ackermann P. 2013. Problematika rezistence oomycet a houbových patogenů révy k fungicidům a antirezistentní strategie. Ekovín, o.s. Brno. Available from http://www.ekovin.cz/uploads/Soubory/rezistence_2013_11_03.pdf (accessed November 2018).
96. Burkard Manufacturing Co Ltd. 2019. Product catalogue - DNA auto spore trap. Burkard Manufacturing Co Ltd. Available from <http://burkard.co.uk/product/dna-auto-spore-trap/> (accessed January 2019).
97. Český statistický úřad. 2018. Osevní plochy pšenice, ječmene a řepky. ČSÚ. Available from https://vdb.czso.cz/vdbvo2/faces/index.jsf?page=vystup-objekt&z=T&f=TABULKA&ds=ds938&pvo=ZEM03A&skupId=2301&katalog=30840&c=v853%7E2__RP2018MP05DP31&str=v855 (accessed November 2018).
98. E-agro. 2019. Ceník chemických přípravků. E-agro. Available from https://www.e-agro.cz/user/documents/upload/CENIK_CHEMIE_2019_E-agro_web.pdf (accessed April 2019).
99. Hegebarth D. 2010. Sensitivity of *Phoma lingam* to sterol biosynthesis inhibitors. Conference: Tagung der DPG - Arbeitskreise Mykologie und Wirt-Parasit-Beziehungen. Hegebarth D. Available from https://www.researchgate.net/publication/280884194_Sensitivity_of_Phoma_lingam_to_sterol_biosynthesis_inhibitors (accessed March 2019).
100. Koczor A. 2017. Flickr. *Phoma lingam*. Koczor A. Available from <https://www.flickr.com/photos/adamkoczor/albums/72157676789647553> (accessed January 2019).
101. National Center for Biotechnology Information. 2019. NCBI – Taxonomy Browser. Available from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=5021&lvl=3&lin=s&keep=1&srchmode=1&unlock&log_op=lineage_toggle (accessed January 2019).
102. Plachká E, Havel J, Poslušná J, Seidenglanz M. 2017. Významné choroby a škůdci řepky – Integrovaná ochrana. OSEVA vývoj a výzkum s.r.o., OSEVA PRO s.r.o., Opava, Agritec Plant Research s.r.o. Available from <http://www.oseva-vav.cz/SIOR/Plachka.pdf> (accessed December 2018).

103. Šaroun J. 2008. Ochrana fungicidy a regulace růstu. Zemědělec. Available from <http://zemedelec.cz/ochrana-fungicidy-a-regulace-rustu/> (accessed January 2019).
104. ÚKZÚZ. 2019. Registr přípravků na ochranu rostlin. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. Available from <http://eagri.cz/public/app/eagriapp/POR/> (accessed January 2019).

