

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV
OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.



**Metodika kvantitativní detekce
mutace v genu *cyt b* u *Venturia
inaequalis* a postupů stanovení
rezistence patogena k vybraným
DMI fungicidům**



Jana Kloutvorová a kol.



**CERTIFIKOVANÁ
METODIKA
2018**



Metodika kvantitativní detekce
mutace v genu *cyt b* u *Venturia inaequalis*
a postupů stanovení rezistence patogena
k vybraným DMI fungicidům

Jana Kloutvorová a kol.



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

2018

Autoři: Ing. Jana Kloutvorová, Ing. Pavlína Jaklová, RNDr. Radek Čmejla, Ph.D.
VŠÚO HOLOVOUSY s.r.o.

prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc., doc. Ing. Miloslav Zouhar, Ph.D.,
Ing. Jana Mazáková, Ph.D., Ing. Marie Maňasová, Ph.D.
Česká zemědělská univerzita v Praze

Název: **Metodika kvantitativní detekce mutace v genu *cyt b* u *Venturia inaequalis*
a postupů stanovení rezistence patogena k vybraným DMI fungicidům.**

Vydal: VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.
Holovousy 129, 508 01 Hořice v Podkrkonoší

Vyšlo v roce: 2018

Vydáno bez jazykové úpravy.

Recenzovaly:

doc. Ing. Ivana Šafránková, Ph.D.

Mendelova univerzita v Brně, AF, Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství

Ing. Jana Pekárková, Ph.D. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský,
Sekce rostlinolékařské péče

Publikace je realizačním výstupem projektu NAZV QJ1510353 - Zvýšení efektivity postupů ochrany jableň proti strupovitosti.

Publikaci bylo uděleno Osvědčení č. UKZUZ 117978/2018 o uznání uplatněné certifikované metodiky v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“.

© VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.,
2018

www.vsuo.cz

ISBN 978-80-87030-58-5

Obsah

I. ÚVOD	9
II. Cíl metodiky a dedikace	11
III. Vlastní popis metodiky	11
IV. Patogen <i>Venturia inaequalis</i>	13
IV.1. Popis a bionomie patogena <i>Venturia inaequalis</i>	13
IV.2. Symptomy napadení	15
IV.3. Podmínky vzniku infekce	15
V. Ochrana jableň proti strupovitosti	17
V.1. Obecné zásady ochrany ovocných plodin před houbovými chorobami.	17
V.2. Fungicidy využívané v ochraně proti strupovitosti	18
VI. Rezistence patogena <i>Venturia inaequalis</i> k fungicidům	19
VI.1. Přehled typů rezistence k fungicidům	20
VI.2. Skupiny fungicidů ohrožených vznikem rezistence	21
VII. Postupy detekce rezistence k DMI fungicidům	28
VII.1. <i>In vivo</i> testování citlivosti <i>Venturia inaequalis</i> k fungicidům	28
VII.1.1. Monitoring rezistence dle standardizované metodiky FRAC (anilinopyrimidiny a SBI fungicidy, lze použít i pro další třídy fungicidů)	28
VIII. Postupy detekce rezistence ke strobilurinovým fungicidům	29
VIII.1. <i>In vivo</i> testování rezistence <i>Venturia inaequalis</i> ke strobilurinovým, příp. anilinopyrimidinovým fungicidům	30
VIII.1.1. Monitoring rezistence dle standardizované metodiky FRAC (strobiluriny, případně anilinopyrimidiny)	32
VIII.2. <i>In vitro</i> testy citlivosti <i>Venturia inaequalis</i> ke strobilurinovým fungicidům	33
VIII.2.1. Monitoring rezistence dle standardizované metodiky FRAC (QoI fungicidy, zejména pro kresoxim-methyl a pyraclostrobin a další třídy fungicidu, které inhibují klíčivost spor)	34
VIII.2.2. Molekulární metody testování rezistence <i>Venturia inaequalis</i> ke strobilurinovým fungicidům	35
IX. Srovnání novosti postupů	43
X. Popis uplatnění metodiky	44
XI. Ekonomické aspekty	44
XII. Seznam použité literatury	45
XIII. Seznam publikací, které předcházejí metodice	47
XIV. Přílohy	49

ABSTRACT

The present publication is focused on detection of the resistance of pathogen *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter 1875 to selected fungicides. Publication is focused primarily on selected fungicides from the DMI group, as well as on procedures for detecting the presence and quantification of G143A mutation in the mitochondrial gene *cyt b*, which is responsible for complete resistance of pathogen to QoI fungicides. The fungus *Venturia inaequalis* causes the most important disease of apple tree - the apple scab. Lack of control or failure of protection results in high yield losses. The publication also includes brief description and characterization of pathogen and disease, basic principles of protection and characterization of the mechanism of resistance to certain active substances. The method of detecting mutation at position G143 developed at VŠÚO Holovousy presents a time-less demanding, hence a cheaper yet and more sensitive method, compared to the current methods, which are used. Timely capture of the presence of resistant strains in the orchard will allow growers to choose the right and effective way of treatment. The publication is intended for the use of workplaces dealing with similar issues whether from the point of view of further research or routine detection. The publication is the output of NAZV project No. QJ1510353 „Increasing the effectiveness of protection of apple trees against apple scab“. The research infrastructure built under OP VaVPI project CZ.1.05 / 2.1.00 / 03.0116 was used for.

SOUHRN

Předkládaná metodika uvádí postupy stanovení rezistence patogena *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter 1875 k vybraným fungicidním látkám. Pozornost je zaměřena především na vybrané fungicidy ze skupiny DMI a dále na postupy detekce přítomnosti a kvantifikace mutace G143A v mitochondriálním genu *cyt b*, která je odpovědná za projev rezistence patogena k QoI fungicidům. Houba *Venturia inaequalis* způsobuje hospodářsky nejvýznamnější chorobu jabloní – strupovitost jabloně, která v případě neprovedené nebo selhané ochrany přináší pěstiteli vysoké ztráty na produkci ovoce. V metodice je rovněž uvedený stručný popis a charakteristika patogena a choroby, základní principy ochranných opatření a charakterizace mechanismu vzniku rezistence k některým účinným látkám. Uvedený postup detekce mutace v pozici G143 vyvinutý ve VŠÚO Holovousy představuje oproti stávajícím používaným metodám časově méně náročnější, a tedy i levnější ale přitom citlivější metodu. Včasně zachycení přítomnosti rezistentních kmenů ve výsadbě jabloní umožní pěstiteli zvolit správný a efektivní způsob ošetření výsadeb. Metodika je určena k využití pracovišti zabývajícími se uvedenou problematikou ať již z pohledu dalšího výzkumu nebo rutinní detekce. Publikace je realizačním výstupem projektu NAZV č. QJ1510353 „Zvýšení efektivity ochrany jabloní proti strupovitosti“. K řešení byla využita infrastruktura vybudovaná v rámci projektu OP VaVPI CZ.1.05/2.1.00/03.0116 „Ovocnářský výzkumný institut (OVI)“.

I. ÚVOD

Jablka patří k nejběžnějšímu druhu ovoce, které se prakticky stalo nedílnou součástí našeho jídelníčku. Mají díky svému obsahu nutričně významných látek nezastupitelné místo v racionální výživě člověka. Konzumací ovoce je lidskému tělu dodávána celá řada zdravotně prospěšných sloučenin (organické kyseliny, sacharidy, vláknina, pektinové látky, minerální látky a vitamíny, flavonoidy, antioxidanty, aj.) při současně nízké energetické hodnotě této potraviny.

Pěstování jablek v naší republice patří k tradičnímu odvětví českého ovocnářství. V České republice je evidováno přes 7 tis. ha produkčních výsadeb jablek (Situační a výhledová zpráva ovoce, MZe, 2016). Převládající část těchto ploch je v současnosti obhospodařována v režimu integrované produkce ovoce, kterou zastřešuje Svaz pro integrované systémy pěstování ovoce (SISPO). Integrovaná produkce (IP) ovoce představuje specifický systém produkce ovoce usilující o ekonomickou produkci ovoce vysoké kvality při uplatnění dostupných, ekologicky šetrných metod pěstování a minimalizace nežádoucích vedlejších účinků používaných agrochemikálií při současném zajištění intenzity produkce, udržení výsadeb v dobrém zdravotním stavu a plném využití výnosového potenciálu rostlin. Jednou z klíčových zásad pravidel integrované produkce ovoce je uplatňování technologie integrované ochrany. Integrovaná ochrana rostlin (IOR) je dle Směrnice Evropského Parlamentu a Rady 2009/128/ES z roku 2009 definována jako**“pečlivé zvažování veškerých dostupných metod ochrany rostlin a následná integrace vhodných opatření, která potlačují rozvoj populací škodlivých organismů a udržují používání přípravků na ochranu rostlin a jiných forem zásahu na úrovních, které lze z hospodářského a ekologického hlediska odůvodnit a které snižují či minimalizují rizika pro lidské zdraví nebo životní prostředí“**. Zásady IOR slučují všechny známé způsoby regulace škodlivého organismu a vedle přímých metod chemické a mechanické ochrany zahrnuje i metody nepřímé (volba stanoviště a odrůdy, obdělávání půdy, řez, likvidace zdrojů infekce atd.). Nicméně základním mechanismem regulace patogena *Venturia inaequalis* ve výsadbách zůstává využívání chemické ochrany.

Vzhledem k životnímu cyklu původce strupovitosti je efektivní ochrana založena na vysoké četnosti opakovaných aplikací fungicidních látek v průběhu vegetační sezóny. Ochrana proti strupovitosti tak patří k finančně velmi nákladným opatřením. I přes vynaložené prostředky se však v některých pěstitelských výsadbách vyskytne napadení původcem strupovitosti v míře přesahující ekonomický práh škodlivosti. Neuspokojivé výsledky aplikovaných

ochranných opatření mohou být způsobeny celou řadou faktorů. Jednou z nejběžnějších příčin je nepříznivý vývoj počasí, kdy do období plánovaného termínu ošetření přijdou trvalejší srážky, které znemožní jeho provedení a způsobí jeho odložení na pozdější dobu. Přitom se však například v průběhu sedmi dní vyvine v období intenzivního růstu jeden až dva nové listy, které již nejsou pokryty přípravkem a současně jsou nejcitlivější k infekci. Na špatných výsledcích ochrany se mohou podílet i další vlivy – nedodržení dávkování, vysoká pojezdová rychlost, částečné smytí zejména kontaktních fungicidů při intenzivních přivalových deštích či postinfekční aplikace přípravku s nižší kurativní účinností. Rovněž tak nepříznivé mikroklima v některých částech výsadby (dolíky, místa u vodotečí, úpatí strání, blízkost lesa) způsobující horší osychání stromů, případně i postupná selekce stále agresivnějších ras patogena, který je schopen rychlejšího vývoje, se mohou podílet na výskytu strupovitosti v ošetřovaných sadech. Selhání chemické ochrany však může být také zapříčiněno i vznikem rezistence houby k některému z aplikovaných fungicidů.

Jedním typem často používaných fungicidů jsou fungicidy z chemické skupiny strobilurinů, které inhibují respirační řetězec a jsou známy jako vnější inhibitory chinonu (Quinone-outside Inhibitors; QoI). Používání těchto fungicidů však často vede ke vzniku rezistence k těmto přípravkům, a to zejména vyselektováním jednobodové mutace v genu *cyt b* vedoucí k záměně glycinu za alanin v pozici 143 (G143A). Včasná detekce přítomnosti rezistentních kmenů *V. inaequalis* v dané výsadbě zabrání neúčelnému použití strobilurinových fungicidních přípravků, sníží zbytečnou environmentální zátěž a současně povede k jejich vyřazení ze systému ošetřování a jejich náhradě účinnými látkami z jiné skupiny s odlišným mechanismem působení pro zajištění efektivní ochrany jabloní proti patogenu a zachování kvalitní produkce. Pro detekci přítomnosti rezistentních populací se využívají různé postupy. Pro diagnostiku je možno využít laboratorní *in vitro* testy, nebo *in vivo* testy skleníkové i polní s využitím umělých infekcí hostitelské rostliny testovaným patogenem. V současnosti se pro detekci mutace G143A začaly využívat i postupy založené na metodě PCR. Výbor FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) uvádí dvě schválené metody pro detekci mutace G143A v genu *cyt b* – využití RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) nebo pyrosekvenování pro analýzu PCR produktů.

Z důvodů zvýšení citlivosti detekční metody a snížení časové náročnosti byl ve VŠÚO Holovousy vyvinut a optimalizován specifický postup, který umožňuje pomocí metody kvantitativní real-time PCR získat přesnou informaci o zastoupení mutované varianty G143A mitochondriálního genu *cyt b* ve sledované populaci, a to s vysokou citlivostí nejméně 0,1 %. Předkládaná

metodika uvedený postup vysvětluje. Současně jsou v metodice uvedeny i další validní metodické postupy potvrzení přítomnosti populace patogena rezistentní ke strobilurinům v hodnocené výsadbě. Vedle strobilurinových přípravků je pozornost věnována také vybraným fungicidům ze skupiny inhibitorů demetylase (DMI) a metodickým postupům testování přítomnosti rezistence v populaci patogena k těmto účinným látkám.

Autoři děkují za aktivní pomoc všem spolupracovníkům, kteří se podíleli na řešení jednotlivých výzkumných aktivit. Děkujeme i všem ovocnářům, kteří nám umožnili sledování výskytu strupovitosti ve svých výsadbách a poskytli vzorky potřebné k testům.

II. Cíl metodiky a dedikace

Cílem metodiky je seznámit případné uživatele zabývající se problematikou výzkumu nebo stanovení rezistence původců houbových chorob k fungicidům s postupy ověření jejich citlivosti/resistence k používaným účinným látkám. Specializovaná část je zaměřena na popis detekce přítomnosti mutace mitochondriálního genu *cyt b*, která je odpovědná za projevy rezistence patogena *Venturia inaequalis* ke strobilurinovým fungicidním látkám včetně postupu kvantifikace jejího zastoupení ve sledované populaci dané výsadby jabloní. Metodika se dále detailně věnuje i postupům stanovení přítomnosti rezistence patogena i k dalším vybraným účinným látkám ze skupiny DMI fungicidů. Postupy lze využít mimo jiné i v dalším výzkumu zaměřeném na studium souvislostí a jevů spojených s problematikou vzniku, vývoje, šíření a perzistence rezistence patogena ke strobilurinovým a azolovým fungicidům. Porozumění těmto jevům přispěje ke zpřesnění managementu ochrany jabloní proti původci strupovitosti, která je hospodářsky nejvýznamnější chorobou této plodiny. Metodika je současně v souladu s vyhláškou ze dne 6. června 2012 č. 205/2012 Sb. o obecných zásadách integrované ochrany rostlin, neboť přispívá k zajištění dodržování zásad v oblasti využívání antirezistentních strategií.

Metodika vznikla jako realizační výstup výzkumného projektu podporovaného Národní agenturou zemědělského výzkumu (NAZV) č. QJ1510353 „Zvýšení efektivity ochrany jabloní proti strupovitosti“ Při řešení byla využita infrastruktura vybudovaná v rámci projektu OP VaVPI CZ.1.05/2.1.00/03.0116 „Ovocnářský výzkumný institut (OVI)“.

III. Vlastní popis metodiky

V metodice je uveden popis, biologie a epidemiologie hospodářsky nejvýznamnějšího patogena jabloní – houby *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter 1875, která je původcem strupovitosti jabloně. Jsou zde popsány i symptomy onemocnění a obecné postupy ochrany. Významná část publikace je věnována popisu typů rezistence a skupinám fungicidů, které jsou ohroženy vznikem rezistence. Dále jsou uvedeny hlavní postupy ověření citlivosti/rezistence patogena ke strobilurinovým fungicidům. Stěžejní částí metodiky je popis postupu pro kvalitativní nebo kvantitativní detekci přítomnosti mutace v pozici G143A mitochondriálního genu *cyt b* u *V. inaequalis* s využitím molekulárních metod. Jsou zde popsány i validované postupy detekce přítomnosti rezistence v populaci patogena k fungicidům ze skupiny QoI (Quinone Outside Inhibitors - strobilurinové fungicidy) a ze skupiny DMI fungicidů. Tyto postupy jsou stanoveny jako mezinárodně uznávané postupy panelem expertů FRAC (Fungicide Resistance Action Committee). Současné jsou zde popsány i některé modifikované postupy testů vyvinuté na řešitelských pracovištích, které jsou využitelné např. pro orientační rutinní testy, neboť jsou rychlé a finančně nenáročné.

Důležitou součástí metodiky jsou navržené postupy antirezistentní strategie pro praktickou aplikaci v ochraně výsadeb jaderovin proti patogenu *V. inaequalis*.

IV. Patogen *Venturia inaequalis*

IV.1. Popis a bionomie patogena *Venturia inaequalis*

Patogen *Venturia inaequalis* (anamorfa *Spiloceae pomi* Fries) je fakultativní parazit, který během svého vývojového cyklu prochází fází s parazitickým způsobem výživy na živých pletivech hostitelské rostliny (konidiové, nepohlavní stadium) a obdobím saprofytickým v odumřelých napadených listech během vegetačního klidu jabloní (vřeckaté, pohlavní stadium). Patogen *V. inaequalis* náleží systematicky do oddělení Ascomycota (vřeckovýtrusé, vřeckaté houby, askomycety). Hlavním hostitelským rodem je jabloň (*Malus* sp.), z dalších hostitelů se uvádí např. jeřáb (*Sorbus* sp.), hloh obecný (*Crateagus laevigata*) a skalník celokrajný (*Cotoneaster integerrimus*).

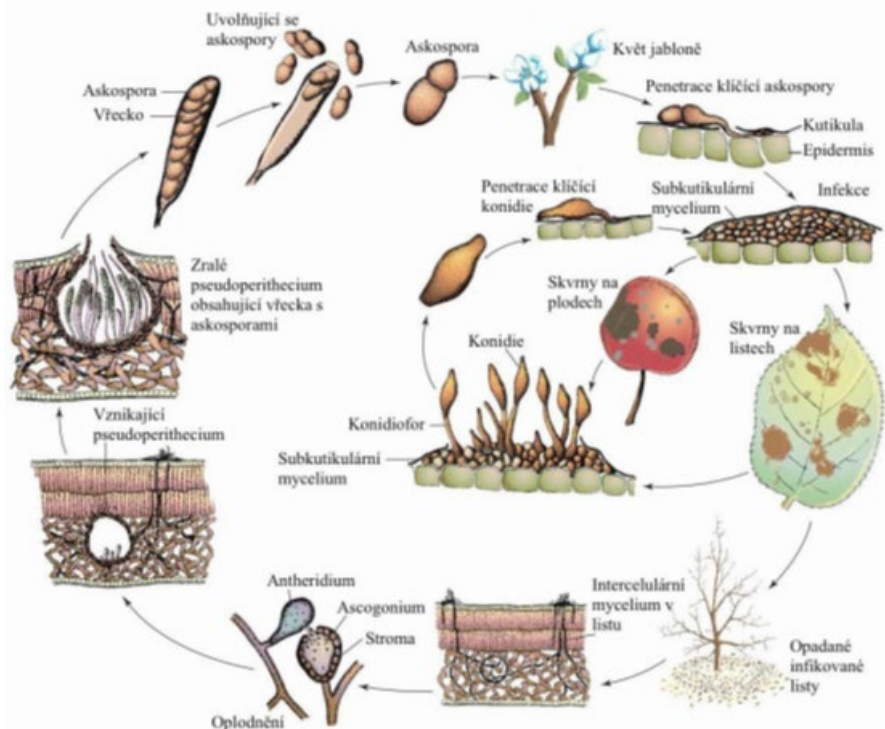
Houba v průběhu vývojového cyklu vytváří dva typy spor. Pohlavní spory - askospory se vyvíjejí ve vřečkách, kdy se po splynutí jader a následném meiotickém a mitotickém dělení vytvoří v každém vřecku osm dvoubuněčných askospor. Horní buňka je vždy o něco kratší a širší, než spodní. Askospory jsou žlutozelené až olivově zelené či světle žlutohnědé a jejich velikost se

pohybuje v rozpětí mezi 11–16 x 5–7 μm . Ve vřecku jsou uloženy kratší buňkou směrem k jeho apikální části. Vřeka se tvoří z askogenních hyf v plodnicích – pseudoperitécích. Plodnice mají kulovitý tvar, jsou negativně geotropní, tmavohnědé až černé, velké 120–160 μm . Různými autory je udáván různý počet vřecek v plodnici, nejčastěji plodnice obsahují 50–100 vřecek (Benada & Špaček, 1962). Vřeka jsou uspořádána ve svazečcích a mají protáhle válcovitý tvar. Druhým typem spor jsou nepohlavní spory – konidie. Vznikají na konidioforech, které jsou hladké, přímé a nevětvené a vyrůstají z šedočerného mycelia. Konidie se tvoří po jedné na koncích konidioforů, jsou kyjovitého nebo hruškovitého, poměrně pravidelného tvaru, na konci jsou zašpičatělé. Jsou zpočátku hyalinní, později žlutozelené až našedlé. Většinou jsou jednobuněčné, některé starší konidie mohou být posléze i dvoubuněčné (Benada & Špaček, 1962).

Houba přezimuje na napadených opadaných listech, kde se během této saprofytické fáze vyvíjejí plodnice s vřecky a askosporami, které pak začnou v předjaří postupně dozrávat. Houba může v nevýznamné míře také přezimovat na výhonech či v šupinách pupenů, ve formě konidií (MacHardy, 1996). Zralost prvních askospor se shoduje s počátkem rašení jabloní, tj. na počátku fenologické fáze zelených špiček listů nebo tzv. myšího ouška (fenologická fáze BBCH 53–54). Askospory jsou na jaře zdrojem primárních infekcí (Kloutvorová, 2011 a Ackermann *et al.*, 2002). Při dešti se uvolňují z plodnic, kdy po ovlhčení dochází k nabobtnání a praskání vřecek a askospory jsou vlivem turgoru aktivně vymršťovány do vzduchu, čímž dochází k jejich roznášení do okolí (Kloutvorová, 2011). Díky větru mohou být roznášeny až 100–200 m od zdroje inokula (MacHardy, 1996). Askospory jsou šířeny zejména vzdušnými proudy, konidie převážně dešťovými srážkami (Ackermann *et al.*, 2002). Askospory se uvolňují v závislosti na počasí daného roku do konce května až června. Masová zralost askospor a největší nebezpečí primárních infekcí nastává od fenofáze růžového poupěte (BBCH 56–57) a zpravidla trvá až do období 2 týdnů po odkvětu jabloní. V tomto relativně krátkém časovém úseku se obvykle uvolní 90–95 % askospor (Juroch, 2010) Riziko vzniku primárních infekcí ale ve skutečnosti trvá až do rozpadu zdroje askospor – tedy do doby rozložení starých loňských listů (v ČR přibližně konec druhé dekády června). Konidie i askospory potřebují k vyklíčení vodu, rychlost klíčení a prorůstání do pletiv je ovlivněna teplotou. K infekci dochází teprve po splnění podmínky doby trvání vlhkosti při určité teplotě, např. při průměrné teplotě 12 °C musí trvat ovlhčení nejméně 11 hodin, aby došlo ke vzniku infekce (Kloutvorová, 2011). Za vhodných podmínek – při vlhkém počasí a teplotě pohybující se v rozpětí od 6 do 26 °C,

askospory klíčí a způsobují primární infekci listového pletiva (později i pletiva vyvíjejících se plodů). Penetrační hrot askospory pronikne skrz kutikulu a rozrůstá se mezi kutikulou a vnější stranou buněčné stěny epidermálních buněk (subkutikulární mycelium). Infekce jsou velmi hojné během vlhkého, chladného jara a na začátku léta a ustávají, když nastane horké letní počasí. Na listech a napadených plodech se po uplynutí inkubační doby (v závislosti na průměrné denní teplotě za cca 9–18 dnů od vzniku infekce) objeví nejprve olivově zelené, později šedočerné skvrny. Z mycelia se začínají formovat konidiofory, na nichž dochází k produkci velkého množství konidií, které se poté uvolňují do okolí a jsou zdrojem sekundárních infekcí. Během deště či po dešti jsou konidie splachovány nebo odváty větrem na okolní listy či plody, kde mohou vyklíčit a způsobit tak sekundární infekci. Za vlhkého počasí konidie zajišťují infekci během celé vegetační sezony (Sandškar, 2003). Období sekundárních infekcí pak trvá prakticky od okamžiku objevení se prvních vizuálních příznaků strupovitosti až do období sklizně, během

Obr. 1. Vývojový cyklus *V. inaequalis* od George N. Agrios 1988 (upraveno Rychlá, 2013)



vegetace se tedy opakuje několik cyklů sekundárních infekcí. Listy mohou být infikovány i během vlhkého počasí na podzim (Kloutvorová, 2011). Po podzimním opadu listů se uvnitř listu zformují pseudoperithecia, kterými houba přečká zimní období (Sandskär, 2003).

IV.2. Symptomy napadení

Houba *Venturia inaequalis* napadá rostliny rodu jabloň (*Malus* sp.), u nichž způsobuje onemocnění nazývané strupovitost jabloně patřící celosvětově k hospodářsky nejzávažnější chorobě jabloní. Onemocnění se může vyskytovat na většině nadzemních orgánů rostlin, ale nejčastější a nejpatrnější jsou příznaky na listech a plodech. Na listech vznikají nejprve světlé, olivově zbarvené skvrny, později šedočerné sazovité skvrny, pletivo pod nimi často i nekrotizuje. V důsledku tvorby znekrotizovaného pletiva se listová plocha nevyvíjí rovnoměrně, napadené listy tak mohou být i různě zkrabacené nebo se v místě skvrn trhají. Skvrny jsou nejprve na svrchní straně listů, později se ale mohou objevit i na rubu. Na plodech se onemocnění projevuje jako různě velké šedočerné skvrny. Silně napadené listy a mladé plůdky předčasně opadávají. Na starších plodech vznikají různě velké šedočerné skvrny, postižená místa nekrotizují, poškozená pokožka zejména u rannějších infekcí v důsledku nestejného růstu napadených a zdravých pletiv praská, což je často vstupní branou pro druhotnou infekci houbami vyvolávajícími hniloby plodů. Sklizené ovoce je nevhledné, často i tvarově deformované. Infekce plodů v pozdním létě se projeví na ovoci drobnými skvrnkami jako tzv. pozdní (vyskytne-li se ještě před sklizní) nebo též skládková strupovitost (rozvine se až v průběhu skladování). Během skladování se následně na plodech, které byly při sklizni a naskladnění vizuálně zdravé se začnou po uplynutí určitého skladovacího období (2–3 měsíce) objevovat, často ve velkém množství, drobné skvrnky strupovitosti rozesté po celém povrchu plodu.

IV.3. Podmínky vzniku infekce

Pro vznik infekce musí být současně splněny tyto podmínky: přítomnost infekčního zdroje v prostředí (jsou zralé askospory, příp. jsou vytvořené konidie na listech), rostlina má vyvinutá pletiva citlivá k infekci a tato pletiva nejsou chráněna fungicidním ošetřením a dojde ke splnění teplotních a vlhkostních podmínek nutných pro vznik infekce (viz. Tab. 1)

Tab. 1: Podmínky nutné pro vznik infekce jabloní houbou *Venturia inaequalis* (dle Millse 1951)

Průměrná teplota během ovlhčení (°C)	Doba ovlhčení povrchu listů (v hod.) nutná pro vznik infekce			Inkubační doba	
	slabé	střední	silné		
0,5 - 5,0	déle než dva dny		více než 60		
5,1 - 5,4	28	38	60		
5,5 - 5,9	25	35	60		
6,0 - 6,4	22	32	50	Průměrná denní teplota od vyklíčení spor	Počet dní od vzniku infekce do prvních příznaků choroby
6,5 - 6,9	21	29	45		
7,0 - 7,4	20	26	40		
7,5 - 7,9	19	25	37		
8,0 - 8,4	17	23	34		
8,5 - 8,9	15	21	30		
9,0 - 9,4	15	20	29		
9,5 - 9,9	14	19	28		
10,0 - 10,4	13	18	27		
10,5 - 10,9	13	18	26		
11,0 - 11,4	12	17	25	2,2	19
11,5 - 11,9	12	17	24	3,9	18
12,0 - 12,4	11	16	24	5,5	17
12,5 - 12,9	11	15	23	7,2	16
13,0 - 13,4	10	15	22	8,6	15
13,5 - 13,9	10	14	21	10,8	14
14,0 - 14,4	9	14	21	12,7	13
14,5 - 15,4	9	13	20	15,6	12
15,5 - 15,9	9	13	19	16,1	11
16,0 - 16,9	9	12	19	17,8	10
17,0 - 24,0	9	12	18	19,5	9
24,5	10	12	19	21,4	8
25,0	11	14	21	23,7	7

V. Ochrana jabloní proti strupovitosti

V. 1. Obecné zásady ochrany ovocných plodin před houbovými chorobami

Houbové choroby jsou vyvolány rostlinnými patogeny. Významným způsobem ovlivňují výnos, rentabilitu sklizně a kvalitu ovoce. Integrovaná ochrana ovoce proti původcům houbových chorob zahrnuje komplexní soubor preventivních ochranných opatření a nepřímých metod ochrany spolu s přímými způsoby ošetření, tj. aplikacemi pesticidů. K významným preventivním opatřením patří vhodné agrotechnické pěstitelské postupy jako je např. výběr vhodného stanoviště, použití kvalitního a zdravého výsadbového materiálu, výběr odrůd vhodných pro pěstitelské podmínky ČR nebo pro daný region a nadmořskou výšku. K nepřímým opatřením patří přednostní využití rezistentních nebo tolerantních odrůd. Z přímých nechemických metod má význam i likvidace zdrojů infekce např. mulčováním nebo sběrem opadaných přezimovaných listů, apod.

Využití fungicidů v ochraně proti houbovým chorobám

Fungicidy jsou chemické látky, kterými se hubí houby (*Fungi*) poškozující kulturní rostliny. Životní cykly hub velmi liší u různých systematických skupin i jednotlivých druhů. Od tohoto cyklu a podmínek nutných k tomu, aby došlo k infekci se odvíjí způsob ochrany plodin (termín aplikace, četnost ošetření, použitý fungicid, využití nepřímých metod a postupů ochrany atd.) Způsob účinku fungicidních látek na fytopatogenní houby lze dělit na:

- a) **preventivní** – brání vyklíčení spor a prorůstání klíčného vlákna do rostlinného pletiva, rostlina jimi musí být pokryta preventivně před vznikem infekce.
- b) **kurativní** – ničí již vyklíčené spory v listech nebo plodech, zastavují růst mycelia houby, mají systemický účinek, tj. pronikají do listů nebo plodů. Lze jimi ošetřovat po splnění podmínek pro infekci houby, pesticid je však nutno aplikovat v závislosti na kurativní účinnosti konkrétních účinných látek jen do určité, poměrně krátké doby od vzniku infekce (např. do 36 či 72 hodin). Při opoždění aplikace je ošetření již neúčinné a vývoj infekce nezastaví.
- c) **eradikační** – ničí nebo významně narušují mycelium houby, zastavují tvorbu konidií a omezují nebo i zastavují sekundární šíření choroby.

Fungicidy se liší svým mechanismem průniku do pletiv. **Kontaktní** přípravky zůstávají pouze na povrchu rostlinných pletiv, musí být aplikovány preventivně, nemají kurativní ani eradikační účinek. Kontaktní fungicidy se

vyznačují vícebodovým působením a nejsou ohroženy vznikem rezistence houby k těmto účinným látkám. **Systémové** přípravky pronikají do rostliny, mají kurativní (ale i preventivní) a některé i eradikační účinek, po zaschnutí a vstřebání do pletiv nejsou smývány deštěm. Většina ze systémových látek je však ohrožena rizikem vzniku rezistence a při jejich aplikaci je vhodné dodržovat zásady antirezistentní strategie. **Mezosystémové** fungicidy se rozšíří z místa dopadu po povrchu rostliny, ale uvnitř rostliny rozváděny nejsou. Používají se preventivně.

Zásady správného používání fungicidů

Úspěch biologické účinnosti ošetření proti chorobám závisí na použité účinné látce, správném termínu aplikace, ale stejným dílem i na kvalitě ošetření. Při aplikaci musí být zajištěn dokonalý pokryv všech částí ošetřovaných stromů postřikovou kapalinou. Na kvalitu ošetření mají značný vliv i povětrnostní podmínky. Pesticidy by neměly být aplikovány za silnějšího větru nad 3 m/s. Po dešti by měly listy před aplikací oschnout, aby nedocházelo k ředění postřikové kapaliny dešťovou vodou a následnému stékání aplikovaného pesticidu.

Aplikace pesticidů musí být provedena tak, aby nebyly zasaženy zdroje povrchových vod, ochranná pásma vodních zdrojů, plochy vyznačené jako ekologická náhrada za hospodářské plochy, včely, necílové kultury a veřejné ani privátní plochy. Pěstitel musí zabezpečit, aby tato podmínka byla splněna řádným vyškolením obsluhy postřikovačů, řádným seřizením postřikovačů popř. jejich vybavením protiúletovými kryty, určením správné denní doby ošetření a přihlédnutím k aktuálnímu stavu i prognóze počasí, zejména srážkám a větru, tak aby nedošlo k úletům nebo splavení pesticidů, podmiňujícímu opakování ošetření.

Fungicidy a se aplikují v povolených hektarových dávkách ve stanovených optimálních objemech postřikové kapaliny a v souladu s Etiketou přípravku, aktuálně platným Seznamem registrovaných přípravků a dalších prostředků na ochranu rostlin. Vždy je nutné respektovat i zákon o rostlinolékařské péči a na něj navazující vyhlášky. Střídáním přípravků s odlišnými účinnými látkami se brání nežádoucí tvorbě rezistence škodlivých organismů k používaným fungicidům.

V.2. Fungicidy využívané v ochraně proti strupovitosti

Základem preventivního ošetření je aplikace kontaktních fungicidů, lze využít i systémových fungicidů, které mají vedle kurativní i preventivní

účinnost. Kontaktní fungicidy se vyznačují dobrým účinkem již za nižších teplot, mají vícebodový („multi-site“) mechanismus účinku a jejich aplikace je vhodná při uplatňování antirezistentní strategie. Nevýhodami při použití pouze kontaktních fungicidů je jejich možné smytí při silných srážkách. V tom případě je nutné aplikaci fungicidu opakovat. Jelikož se tento typ fungicidů nerozvádí cévními svazky rostlin, může dojít rovněž „naředění“ na rostlinných pletivech v případě intenzivního nárůstu listové plochy a nově narostlých listů, které jsou nejnáchylnější k infekci a tak nejsou chráněny před infekcí. K preventivnímu ošetření je však možno využít i systémových přípravků, výhodami preventivní aplikace systémových přípravků jsou vyšší jistota účinku oproti kurativnímu ošetření, menší náročnost na vyhodnocování podmínek pro infekci a snížení rizika vzniku rezistence. Ke kurativnímu (cílenému) ošetření jsou vhodné systémové fungicidy, které se při krativním ošetření aplikují až po splnění podmínek pro infekce (viz Millsova tabulka) při důsledném respektování doby kurativní účinnosti. Kurativní účinnost znamená, že tyto fungicidy inhibují růst mycelia uvnitř listu. Tato účinnost trvá pro různé fungicidy různou dobu, např. Score 250 EC – 72 hodin (výrobce udává až 96 hod.). Výhodami aplikace systémových fungicidů je, že pronikají do rostlinných pletí a jsou rozváděny cévními svazky, proto nehrozí jejich smyv při silných srážkách. Nevýhodami systémových fungicidů je jejich náročnost na vyhodnocování podmínek pro infekci, pro jejich aplikaci musí být vytvořena dostatečně velká listová plocha a vyšší průměrná denní teplota (nejméně 12 °C). Tyto fungicidy jsou také ohroženy rizikem vzniku a vývoje rezistence houby (triazoly, strobiluriny). Vnikající rezistence se projeví nižší účinností těchto přípravků a tím i klesá jejich spolehlivost v ochraně před *V. inaequalis* (Kloutvorová, 2011).

VI. Rezistence patogena *Venturia inaequalis* k fungicidům

Definice rezistence patogena k fungicidům

Rezistence k fungicidu je stabilní, dědičné přizpůsobení patogena, které vede ke snížení citlivosti k účinné látce. Vznik rezistence je důsledkem genetické mutace (jednoho nebo několika genů současně), díky které je patogen schopen překonat účinek fungicidu (McGrath, 2001). Opakované použití fungicidu vede k selekci v populaci patogena, kdy dojde k zahubení citlivých jedinců, ale nezahubí přizpůsobené (mutantní) jedince v populaci, kteří se pak následně šíří. Fungicid ztratí účinnost a v praxi tento jev označujeme jako rezistenci patogena k dané látce (Anonym 1, 2017).

VI.1. Přehled typů rezistence k fungicidům

Kvalitativní rezistence

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

Kvantitativní rezistence

Pokud je vznik rezistence důsledkem mutace několika genů, patogen vykazuje různý rozsah citlivosti k fungicidu v závislosti na počtu změněných genů (mutací). Rezistence je v tomto případě vnímána jako snížení účinnosti fungicidu. Zvýšení účinnosti fungicidů může být pozorována buď při použití vyšších dávek či jejich častější aplikaci. Tento typ rezistence se vyskytuje se například u skupiny DMI fungicidů (inhibitory demetylace) (McGrath, 2001).

Křížová rezistence

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

Mnohonásobná rezistence

Některé kmeny patogenů si vyvinuly zvláštní mechanismy rezistence mezi dvěma nebo více fungicidy z různých chemických skupin. Ty vyplývají z nezávislých mutací, které jsou selektovány expozicí ke každému z použitých fungicidů. Příčinou vzniku mnohonásobné rezistence je nadměrné používání rizikových fungicidů z různých chemických skupin a zároveň nejsou využívány principy správné antirezistentní strategie. Tento typ rezistence se vytváří zejména u patogenů s velmi rychlým vývojem a s rychlými opakovanými infekčními cykly, což si vyžaduje velmi intenzivní a časté chemické zásahy. Příkladem je výskyt kmenů houby *Botrytis cinerea*, které se staly rezistentní k účinným látkám benzimidazol a dikarboximid (Brent & Hollomon, 2007). Rovněž patogen *V. inaequalis* představuje takovýto potenciálně rizikový organismus.

VI.2. Skupiny fungicidů ohrožených vznikem rezistence

QoIs (Quinone Outside Inhibitors) fungicidy

Tyto fungicidy byly v Evropě zaregistrovány a uvedeny na trh poprvé v roce 1996. Krátce po uvedení na trh, byla v roce 1997 zjištěna rezistence k těmto přípravkům u *V. inaequalis* poprvé v experimentálním sadu ve Francii, ve Švýcarsku a v severním Německu (Gisi *et al.*, 2002). Rezistenci zapříčiňují mutace v cílovém místě účinku v genu cytochromu bc1 a další mechanismy jako např. alternativní dýchání. Křížová rezistence je prokázána mezi všemi fungicidy QoI skupiny (Anonym 2, 2017). Při výskytu rezistence ke QoI fungicidům, v mnoha případech všechny možnosti regulace patogena selhávají, a to z důvodu výskytu rezistence kvalitativního typu (Vincelli, 2002).

QoI fungicidy (Quinone Outside Inhibitors) inhibují mitochondriální dýchání a ovlivňují tak tvorbu energie potřebnou pro buňku patogena. Cílové místo účinku fungicidu je dýchací řetězec, kde blokují elektronový transport v místě oxidace chinolu (tzv. Qo centrum) v cytochromu bc1 na úrovni komplexu III, kde se váží na ubiquinol oxidoreduktázu, což má za následek sníženou produkci ATP (Anonym 2, 2017). Chemické skupiny patřící do třídy QoI inhibitorů využívané v ochraně proti strupovitosti v České republice jsou převážně oximino-acetáty, mezi které patří přípravek s účinnou látkou kresoxim-metyl: Discus a další přípravek patřící do stejné chemické skupiny, ale s účinnou látkou trifloxystrobin: Zato 50 WG. Do jiné chemické skupiny methoxy-karbamátů náleží kombinované přípravky s účinnou látkou pyraclostrobin: Tercel (+ dithianon), Bellis (+ boscalid) a Flint Plus (+ captan). Tyto přípravky působí preventivně a kurativně, účinkují kontaktně,

lokálně systémově a některé i systémově. Vykazují velmi širokou účinnost, jsou používány proti mnoha houbovým patogenům rostlin. (Anonym 3, 2017). Skupina QoI fungicidů zahrnuje tzv. strobilurinové fungicidy. Jsou odvozeny od původních přírodních látek (antibiotikum strobilurin A B), které produkuje dřevokazná stopkovýtrusá houba *Strobilurus tenacellus* (Pers.) Singer (1962) na obranu proti konkurenci ze strany mikroorganismů přítomných v tlejícím dřevě (Ypema & Gold, 1999).

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

Dosud byly zjištěny mutace spojené s rezistencí ke QoI fungicidům - tři substituce aminokyselin v genu cytochromu b. Jsou to: změna z glycinu na alanin v pozici 143 (G143A), změna z fenylalaninu na leucin v pozici 129 (F129L) a změna z glycinu na arginin v pozici 137 (G137R). Izoláty patogena nesoucí mutaci G143A vytváří kompletní rezistenci. Izoláty patogena s mutací F129L nebo G137R vytváří mírnou (částečnou) rezistenci. Pokud se aplikují QoIs fungicidy dle doporučených dávek, které uvádí výrobce, lze zajistit účinnou dostatečnou kontrolu nad chorobou, která je způsobena patogenem s mutací s F129L nebo G137R. Naopak úplnou ztrátu kontroly nad patogenem, lze vždy pozorovat v populacích patogena, u kterých je dominantní mutace G143A, vyskytuje se většinou v případech, kde jsou QoIs fungicidy aplikovány samostatně (Anonym 2, 2017).

Kromě mutací vazebného místa, může být snížená citlivost ke QoI fungicidům vyvolána i dalšími procesy, jako např. iniciací alternativního dýchání. Což je reakce na působení QoI fungicidů jako inhibitorů dýchání. U *V. inaequalis* je rezistence ke strobilurinům způsobena i tímto mechanismem (Olaya & Köller, 1999).

Dalším mechanismem zapříčiňující rezistenci je metabolizace strobilurinů enzymy esterázami a cytochrom P450 monooxygenázou, kdy dochází k úpravě fungicidu na netoxickou formu, která již není škodlivá pro buňky houby (Anonym 2, 2017)

DMIs (DeMethylation Inhibitors) fungicidy

V ochraně ovocných stromů byly DMI fungicidy zavedeny v 80. letech 20. století. Rezistence *V. inaequalis* byla poprvé zaznamenána v experimentální

výsadbě v Novém Skotsku v Kanadě, ve které byly aplikovány DMI fungicidy po dobu 10 a více let. Následně byla zaznamenána rezistence v komerční výsadbě v Michiganu, poté byly doloženy další výskyty rezistence i ve výsadbách v Evropě (Köller & Wilcox, 1999).

Rezistence patogena k DMI fungicidům má kvantitativní charakter. Vznik rezistence je řízen akumulací několika nezávislých mutací, a rozvíjí se jako postupné snižování citlivosti k fungicidům. Detekce kmenů patogena se sníženou citlivostí k DMI fungicidům nemusí nutně znamenat ztrátu kontroly choroby. Ztráta kontroly závisí na úrovni rezistence a frekvenci rezistentních kmenů, které se vyskytují v populaci patogena. Při vyloučení selekčního tlaku dochází poměrně rychle k obnově citlivosti populace. Je prokázána křížová rezistence mezi různými účinnými látkami DMI fungicidů (Beresford, 2003).

DMI fungicidy jsou podskupinou SBI fungicidů (SBIs – Sterol Biosynthesis Inhibitors, skupiny I-IV), které inhibují biosyntézu sterolů v buněčných membránách patogenů. DMI fungicidy patří do skupiny SBIs I, cílové místo účinku této skupiny fungicidů je narušení demetylace v pozici 14 lanosterolu nebo 24 metyldihydrolanosterolu, prekursorů tvorby sterolů u hub. Inhibují specifický enzym, C14-demetylázu a narušují tak proces tvorby ergosterolu u hub. Steroly, jako například ergosterol, jsou důležitými složkami plazmatické membrány, kde napomáhají k jejímu správnému vývoji a funkci.

Chemickou skupinou patřící do DMI inhibitorů, která je nejvíce využívána v ochraně proti strupovitosti v České republice, jsou především triazoly. Na trhu jsou k dostání přípravky s účinnými látkami: difenoconazole (např. Score 250 EC, Atos, Difcor 250 EC aj.), tetraconazole (např. Domark 10 EC), penconazole (např. Topas 100 EC aj.) a kombinované přípravky jako např. Luna Experience (tebuconazole + fluopyram). Tyto přípravky účinkují preventivně a kurativně a některé účinné látky i eradikativně. Působí kontaktně a hloubkově nebo systémově. Mají velmi široké spektrum účinnosti. Nejsou účinné na oomycety (Anonym 3, 2017).

Molekulární mechanismus rezistence k DMI fungicidům spočívá především v mutaci p450 – 14DM cílového místa účinku fungicidu, v enzymu C14-demetylázy (gen *erg11/cyp51*), která má za následek nadměrnou expresi cílového genu. Tato nadměrná exprese genu CYP51 vede ke zvýšené produkci cílového enzymu (Nikou *et al.*, 2009).

Anilinopyrimidiny

Anilinopyrimidiny (AP) byly uvedeny na trh na začátku 90. let, jsou velmi účinné fungicidy proti širokému spektru houbových patogenů. Z této chemické skupiny jsou v České republice využívány proti *V. inaequalis*

účinné látky pyrimethanil a cyprodinil. Cílovým místem účinku těchto fungicidů je syntéza aminokyselin a proteinů. Mechanismus účinku spočívá v inhibici biosyntézy methioninu a inhibici sekrece hydrolytických enzymů patogena. AP vykazují v rámci své chemické skupiny křížovou rezistenci, ale nevykazují křížovou rezistenci s jinými skupinami fungicidů jako jsou triazoly, strobiluriny. Výzkumy, které sledovaly vývoj citlivosti během několika let, ukázaly, že existuje střední riziko rezistence u *V. inaequalis* k AP (Anonym 4, 2017). Potencionální příčinou rezistence k AP fungicidům je mutace v regulaci biosyntézy methioninu (*cgs* gen). Při experimentálních podmínkách, kdy byla populace *V. inaequalis* vystavena nadměrné aplikaci anilinopyrimidinů (až 18 aplikací za sezónu po dobu 5 let) a při vysokém infekčním tlaku, byla zaznamenána snížená citlivost patogena.

SDHIs (Succinate DeHydrogenase Inhibitors) fungicidy

Fungicidy z této skupiny inhibují mitochondriální dýchání a ovlivňují tak tvorbu energie potřebnou pro buňku patogena. Cílový enzym inhibitorů SDH je sukcinát dehydrogenáza (SDH, tzv. komplex II v mitochondriálním respiračním řetězci), která je funkční součástí trikarboxylového cyklu a je spojena s mitochondriálním elektronovým transportním řetězcem. Enzym SDH se skládá ze čtyř podjednotek (A, B, C a D). Vazebné místo SDHIs (vazebné místo ubichinon) je tvořeno podjednotkami B, C a D. Bodové mutace, které mají za následek sníženou citlivost, se mohou rozvíjet u všech třech podjednotek. Důsledkem záměny aminokyselin (mutací) v různých SDH podjednotkách dojde k ovlivnění citlivosti k fungicidům. U *V. inaequalis* to je mutace podjednotky C-H151R. Mutace, které propůjčují sníženou citlivost k SDHIs, byly identifikovány u řady patogenů při polním monitoringu v Evropě včetně houby *V. inaequalis*. Většina z identifikovaných mutací má za následek nízkou až střední rezistenci ke komerčně dostupným SDHI fungicidům, ale frekvence výskytu rezistentních mutací v populaci zatím zůstává nízká (Anonym 5, 2017). Různé mutace cílového místa odpovídají za různé/proměnlivé stupně citlivosti patogena k jednotlivým SDHI látkám. To naznačuje, že efekt těchto mutací cílového místa na účinnost specifických SDHIs se může lišit, pokud jsou tyto populace rozšířeny v terénu. Různé stupně snížené citlivosti k různým mutacím cílového místa lze vysvětlit strukturálními rozdíly mezi třídami SDHIs a jejich interakcí s cílovým místem účinku specifického patogenu (Scalliet *et al.*, 2012). Jinými slovy, snížení citlivosti vyplývající ze specifických mutací cílového místa se může lišit v závislosti na druhu patogena, použitém SDHI fungicidu i geografické poloze izolátů (Sierotzki & Scalliet, 2013). Chemické skupiny patří do třídy SDHI

inhibitorů využívané v ochraně proti strupovitosti v České republice jsou pyridinylethyl benzamidy – tato skupina je představovaná např. komerčním přípravkem s účinnou látkou fluopyram – Luna Experience (který obsahuje navíc druhou účinnou látku ze skupiny azolů - tebuconazole). Do jiné chemické skupiny patří pyridin-carboxamidy s účinnou látkou boscalid, která se vyskytuje např. v kombinovaném přípravku: Bellis (druhou účinnou látkou je pyraclostrobin) a Signum (boscalid + pyraclostrobin).

Dodine

Dodine byl v zemědělství zaveden ve 2. polovině 50. let 20. století, jako fungicid pro regulaci *V. inaequalis*. První případy rezistence k tomuto přípravku byly zaznamenány v 60. letech 20. století ve státě New York, poté co byl intenzivně používán více, než 10 let v postřikových sletech proti strupovitosti. Během 70. let se rezistence rozšířila do dalších oblastí (Köller & Wilcox, 1999). Účinná látka dodine náleží do chemické skupiny guanidinů. Mechanismus působení není zcela objasněn. Její účinek spočívá v narušení buněčných membrán, pravděpodobným místem působení jsou fosfolipidy. Riziko vzniku a vývoje rezistentních kmenů patogena *V. inaequalis* je nízké až střední (Anonym 7, 2015). Typickým zástupcem komerčního přípravku s touto účinnou látkou je přípravek Syllit 400 SC. Platnost registrace přípravku s danou účinnou látkou však v ČR v roce 2016 skončila a do termínu zpracování publikace nebyla obnovena.

Tab. 2: Orientační tabulka klíčových fungicidů ohrožených rezistencí

FRAC kód (číslo skupiny)	Účinná látka	Příklad komerčního přípravku	Poznámka
7 SDHI fungicidy	Fluopyram Fluxapyroxad Penthiopyrad Boscalid	Luna Experience Sercadis Fontelis Bellis	Riziko rezistence vysoké (ev. střední až vysoké)
11 QoI fungicidy	Azoxystrobin Pyraclostrobin Kresoxim-methyl Trifloxystrobin	Bellis, Tercel Discus Zato 50 WG, Flint, Flint Plus, Scorpio	Vysoké riziko rezistence Křížová rezistence mezi všemi strobilurinovými látkami

FRAC kód (číslo skupiny)	Účinná látka	Příklad komerčního přípravku	Poznámka
9 AP fungicidy	Cyprodinil	Chorus 50 WG, Vedette	Střední riziko rezistence (ev. nízké až střední)
	Pyrimethanil	Mythos 30 SC, Pyrus 400 SC, Scala, Faban, Batalion 450 SC, Gladius 450 SC, Pomax	
12 PP-fungicidy (PhenylPyrrolové fungicidy)	Fludioxonil	Geoxe 250 WG, Pomax	Riziko rezistence nízké až střední
3 DMI fungicidy	Difenoconazole Myclobutanil Penconazole Tebuconazole Tetraconazole	Score 250 EC, Difcor 250 EC, Vigofun 250 EC, Difenzone, Rekin 250 EC, Mavita 250 EC, Novadifen, Atos Talent Topas 100 EC, Topenco 100 EC Luna Experience Domark 10 EC	Riziko rezistence střední
33 Ethyl-fosfáty	Fosetyl-Al	Aliette 80 WG	Nízké riziko rezistence
U 06 Fenyl-acetamidy	Cyflufenamid	Cyflamid	Střední riziko rezistence (nalezeno u Sphaeroteca)
U 12 Guanidiny	Dodine	Syllit 400 SC	Nízké až střední riziko rezistence

FRAC kód (číslo skupiny)	Účinná látka	Příklad komerčního přípravku	Poznámka
M 01 Mědnaté fungicidy	Měď a soli	Kuprikol..... Airone SC, Badge WG, Coprantol Duo, Funguran Progress, Funguran OH 50 WP, Champion 50 WG, Kocide 2000, Flowbrix...	Nejsou ohroženy rezistencí
M 02 Sirnaté fungicidy	Síra	Kumulus... „Sulfolac 80 WG, Sulfurus, Thiovit Jet...	Nejsou ohroženy rezistencí
M 03 Dithiokarbamáty	Mancozeb Metiram Propineb Thiram	Dithane DG Neotec, Manfil 75 WG, Manzate 75 WG, Mastana SC, Novozir MN 80 New, Penncozeb 75 DG Polyram WG Antre 70 WG Thiram Granuflo	Nejsou ohroženy rezistencí
M 04 Ftalimidy	Captan	Captan 80 WG, Merpan 80 WG, Scab 480 SC, Flint Plus, Ventur 80 WG	Nejsou ohroženy rezistencí

FRAC kód (číslo skupiny)	Účinná látka	Příklad komerčního přípravku	Poznámka
M 09 Chinony	Dithianon	Delan Pro, Delan 700 WDG, Faban, Tercel	Nejsou ohroženy rezistencí
44 Mikrobiální disruptory buněčné membrány	<i>Bacillus subtilis</i>	Serenade	Rezistence není známá

VII. Postupy detekce rezistence k DMI fungicidům

VII.1. *In vivo* testování citlivosti *Venturia inaequalis* k fungicidům

VII.1.1. Monitoring rezistence dle standardizované metodiky FRAC (anilinopyrimidiny a SBI fungicidy, lze použít i pro další třídy fungicidů)

Autor: Dr. Gerd Stammler, Dr. Kristin Klappach, BASF-AG, 67117 Limburgerhof, Germany

Jedná se o validovanou rutinní metodu pro skleníky s laboratoří, zejména pro účinné látky difenoconazole a cyprodinil.

Odběr vzorků

Za suchých povětrnostních podmínek se z jedné lokality odebere 30–50 napadených listů s lézemi a sporulujícím patogenem. Před odběrem je nezbytné, aby od poslední aplikace fungicidu ve výsadbě uplynulo nejméně 5 dní. Vzorky by měly být co nejrychleji dopraveny do laboratoře. Všechny odebrané vzorky by měly být opatřeny vzorkovacím listem, na kterém je uvedeno datum odběru, odrůda, fungicidní postřikový sled, dávka fungicidu, účinnost produktu a adresa lokality odběru/pěstitele.

Zpracování vzorků a propagace

Veškeré práce musí být provedeny na čisté pracovní ploše, mezi zpracováním dvou vzorků jsou všechny použité nástroje vyčištěny 70% ethanolem. Odebrané vzorky populací *V. inaequalis* jsou nejprve namnoženy na neošetřených jablonových semenáčcích, aby bylo získáno

dostatečné množství výchozího materiálu pro testy citlivosti. Typicky sporující léze jsou vyříznuty z listů a jsou shromažďovány v čisté Petriho misce. Přiměřené množství těchto výseků listů je namočeno v deionizované vodě a lehce promícháno špachtlí. Získaná suspenze se filtruje přes hydrofilní pánev a koncentrace konidií v inokulu se počítá za použití Neubauerovy komůrky. Koncentrace suspenze spor by měla být v rozmezí $1-3,5 \times 10^5$ spor/ml. Pomocí ručního postřikovače je aplikována suspenze spor na celé jabloňové semenáčky. Listy by měly být pokryty viditelnou tenkou vrstvou suspenze. Rostliny se pak pokryjí mřížkou a nylonovou látkou a inkubují se v klimatické komoře po dobu 48 hodin (bez světla, 18 °C, 90% RRV). Poté jsou rostliny přeneseny do skleníku a inkubují se dalších 13 dní, nebo dokud není vidět dostatek sporulujících lézí (20 °C den, 18 °C noc, 14 hodin světla, 60% RRV). Listy jsou oderány a skladovány v Petriho miskách při pokojové teplotě.

Testy citlivosti

Odebrané vzorky populací *V. inaequalis* se testují na jabloňových semenáčcích (3–5 pravých listů), ošetřených buď úč. látkou cyprodinil (Chorus 50 WG) nebo úč. l. difenoconazole (Score 250 EC). Koncentrace pro cyprodinil jsou následující: 0 ppm, 0,3 ppm, 3 ppm, 10 ppm, 30 ppm, 100 ppm, 300 ppm a pro difenoconazole: 0 ppm, 0,1 ppm, 1 ppm, 3 ppm, 10 ppm, 30 ppm, 100 ppm. Testy s CDL a DFZ lze provést současně. Pro každou variantu je ošetřeno šest semenáčků a 7 semenáčků kontrola (0 ppm), které jsou ošetřeny pouze vodou. Den (24 hod.) po ošetření fungicidem se rostliny inokulují suspenzí konidií *V. inaequalis* o koncentraci $2-3 \times 10^5$ spor/ml, ošetřen je zejména povrch dvou nejmladších, ještě lesklých listů semenáčků. Rostliny se poté inkubují za stejných podmínek jako u propagace (viz. výše). Po 48 hod. v klimatické komoře jsou rostliny odvezeny do skleníku a inkubovány po dalších 13–14 dnů. Test je poté vizuálně vyhodnocen.

Hodnocení a zpracování dat

Vizuální hodnocení testu se provádí odhadem procenta plochy listů infikovaného *V. inaequalis*. Tyto hodnoty jsou vloženy do tabulky programu Excel a jsou pro každou koncentraci seřazeny dle velikosti. Chcete-li snížit efekt biologické odchylky, EC50 se vypočítává pouze s třemi nejvyššími hodnotami u každé koncentrace fungicidu. Hodnoty EC50 se vypočítají za použití Agstatu 1,59 (Syngenta internal). K získání rozložení citlivosti testované populace jsou hodnoty EC50 srovnávány s hodnotami EC50 citlivých a méně citlivých referenčních populací *V. inaequalis*.

VIII. Postupy detekce rezistence ke strobilurinovým fungicidům

Z hlediska managementu ošetřování jabloňových sadů je žádoucí včas zachytit přítomnost rezistentních kmenů *Venturia inaequalis*, a to z mnoha důvodů: 1) zabránit neúčelnému použití strobilurinových fungicidních přípravků tam, kde se již vytvořila rezistence patogena k nim; 2) a tím předejít ekonomickým ztrátám z použití nesprávného přípravku; 3) předejít zbytečné environmentální zátěži; 4) zahájit používání fungicidů z jiné skupiny s odlišným mechanismem působení pro zajištění efektivní ochrany jabloň proti původci strupovitosti a pro zachování kvalitní produkce. Pro účinnou ochranu ovocného sadu je dále výhodné znát poměr mutovaného, rezistentního kmenu *V. inaequalis* k citlivému.

VIII. 1. *In vivo* testování rezistence *Venturia inaequalis* ke strobilurinovým, příp. anilinopyrimidinovým fungicidům

VIII.1.1. Monitoring rezistence dle standardizované metodiky FRAC (strobiluriny, případně anilinopyrimidiny)

Autor: Dr. Gerd Stammler, Dr. Kristin Klappach, BASF-AG, 67117 Limburgerhof, Germany

Jedná se o validovanou rutinní metodu pro skleníky s laboratoří, testy probíhají na živém hostiteli jabloňových semenáčcích

Odběr vzorků

Za suchých povětrnostních podmínek se odebere z jedné výsady (lokality) ± 20 listů, na kterých jsou vyvinuty léze a sporulující patogen. Před odběrem je nezbytné, aby od poslední aplikace fungicidu ve výsadbě uplynulo nejméně 5 dní. Odebrané listy jsou umístěny mezi 2 vrstvy papíru, zabaleny do novin a co nejrychleji přemístěny do laboratoře, nejlépe v chladicím boxu. Pokud je vzorek poslán do laboratoře poštou, oschnuté listy by měly být umístěny mezi listy novin. Ve VŠÚO Holovousy se osvědčil postup, který lze využít zejména, pokud se vzorky neposílají poštou, ale dopravují se bezprostředně po odběru z testované lokality do laboratoře. V takovém případě se odebírají celé výhony s napadenými listy, konce výhonů se obalí vlhkou buničitou vatou nebo se výhony zasunou do nádoby (kbelíku) s vodou (hladina vody však nesmí být příliš vysoká max. 1–2 cm). Výhony musí stát v nádobě volně a vzdušně, aby nedošlo k jejich zapaření nebo zvlhnutí. Využití výhonů místo listů má výhodu v tom, že listy na výhonech nevadnou, zůstanou déle čerstvé a je možno prodloužit zpracování vzorků na více dní, což je vhodné

zejména pokud provádíme větší objemy testů. Všechny odebrané vzorky by měly být označeny s uvedením data odběru, odrůdy, a místem odběru (lokalita), příp. jménem pěstitele. Je užitečné mít k odebraným vzorkům i aplikovaný fungicidní postřikový sled.

Příprava vzorků a inokula

Veškeré práce musí být provedeny na čisté pracovní ploše, mezi zpracováním dvou vzorků jsou všechny použité nástroje desinfikovány 70% ethanolem. Odebrané vzorky populací *V. inaequalis* jsou nejprve namnoženy na neošetřených jablonoých semenáčcích, aby bylo získáno dostatečné množství výchozího materiálu pro testy citlivosti. Léze z infikovaných listů jsou vyříznuty a konidie jsou získány oplachováním cca 40–60 lézí deionizovanou vodou. Suspenze konidií je přefiltrována přes čtyři vrstvy plátna, aby se odstranily nečistoty. Spočítá se koncentrace konidií pomocí Bürkerovy komůrky a stanoví se přibližně na 5×10^5 spor/ml (či rozmezí $1-3,5 \times 10^5$ spor / ml). Konidie musí mít dostatečnou klíčivost a životaschopnost. (Na pracovišti VŠÚO Holovousy je klíčivost ověřována následujícím způsobem: do jamek podložního sklíčka se napipetuje 80 μ l inokula. Sklíčko s konidiami je poté inkubováno ve vlhké komůrce po dobu 48 (24) hodin při teplotě 22 ± 2 °C. Pod mikroskopem je spočítán počet vyklíčených spor ze 100 a tím získáme procento relativní klíčivosti inokula v %). Inokulum lze uchovávat zmražené při teplotě -18 °C až do doby inokulace.

Rostlinný materiál

Semena jabloně odrůdy Golden Delicious se stratifikují v písku po dobu 2–3 měsíců při 3–6 °C. Vysetá semena se pak pěstují po dobu 3 týdnů. Semenáčky se přenesou do skleníku, kde se inkubují při teplotě 20–24 °C, 70–75% RVV a 18 hod. fotoperiodě po 3 týdny. Semenáčky jsou preventivně ošetřovány proti padlí sirnou parou po dobu 3–5 hod. přes noc.

Ve VŠÚO Holovousy se osvědčil pro přípravu rostlinného materiálu tento postup: Semena jabloně odrůdy Golden Delicious jsou stratifikována následujícím způsobem. Semena jsou na 24 hodin namočena v pitné vodě v kádince, poté je voda slita. Následovně jsou semena zalita roztokem merthiolátu (0,5 g/l) a ponechána v něm po dobu 10 minut, poté je merthiolát slit a semena se promyjí v destilované vodě. Před vlastní stratifikací jsou semena namočena v roztoku fungicidu Teldor 500 SC (úč. látka fenhexamid) o koncentraci 5 ml/l. Semena jsou rozložena na sterilizovaný filtrační papír, uložena do igelitového sáčku, jenž je poté zataven. Takto uskladněná semena jsou zabalena dolobalu, aby se zamezilo přístupu světla. Semena jsou

stratifikována v chladničce při teplotě 3 °C po dobu 4 měsíců. V průběhu stratifikace je stav semen kontrolován, je-li třeba, je injekční stříkačkou doplněna voda. Výsev je proveden do kontejnerů o rozměru 10x10 cm, do výsevního substrátu do hloubky cca 1–1,5 cm. Takto vysazené semenáčky jsou ošetřeny vhodným dostupným přípravkem proti padání klíčících rostlin. Během vegetace je kontrolován zdravotní stav semenáčků, případně jsou preventivně ošetřeny proti padlí přípravkem Cyflamid 50 EW (cyflufenamid, koncentrace 0,5 ml/l).

Propagace

Pomocí ručního postřikovače je povrch nejmladších listů semenáčků inokulován postřikem suspenzí konidií patogena *V. inaequalis*. Listy by měly být pokryty viditelnou tenkou vrstvou suspenze. Rostliny jsou inkubovány ve tmě v klimatizované komoře při 99 (90)% RVV a 18 °C po dobu 48 (24) hodin, udržení vysoké vzdušné vlhkosti je nutné ke vzniku infekce. Poté jsou semenáčky pěstovány ve skleníku v cca 70 (60)% RVV a 22 (20 °C den, 18 °C noc) a při světelném režimu 12 (14) h světla/12 h tma. Po uplynutí 13–20 dní po inokulaci se na infikovaných listech objeví sporulující léze.

Testy citlivosti *V. inaequalis* k fungicidním účinným látkám

Odebrané vzorky populací *V. inaequalis* se testují na jablonořných semenáčcích (3–5 pravých listů) odrůdy Golden Delicious. Postřiková kapalina testovaného fungicidu se připravuje bezprostředně před aplikací. Jsou použity ředící řady koncentrace fungicidu (např. 0, 100, 300 ppm pro přípravek Mythos 30 SC, 30% pyrimethanil, popř. Discus, 50% kresoxim-methyl). Fungicidy se aplikují ručním postřikovačem na obě strany listu, 24 hod. před vlastní inokulací suspenzí konidií. Inokulum pro umělé infekce (suspenze konidií) se připravuje shodně, jako je popsáno v kap. „Příprava vzorků a inokula“. Pro každou variantu koncentrací fungicidu je použito 3–5 (6–7) rostlin. Inkubační podmínky jsou stejné jako u propagace (viz. výše).

Hodnocení

Vyhodnocení pokusu bylo provedeno po 13–15 dnech od inokulace, kdy jsou pozorovány sporulující léze. U pyrimethanilu, výskyt sporulujících lézí u koncentrace 300 ppm udává přítomnost méně citlivých spor v populaci vzorku.

VIII.2. *In vitro* testy citlivosti *Venturia inaequalis* k ke strobilurinovým fungicidům

VIII.2.1. Monitoring rezistence dle standardizované metodiky FRAC (QoI fungicidy, zejména pro kresoxim-methyl a pyraclostrobin a další třídy fungicidu, které inhibují klíčivost spor)

Autor: Dr. Gerd Stammler, Dr. Kristin Klappach, BASF-AG, 67117 Limburgerhof, Germany

Jedná se o validovanou rutinní laboratorní *in vitro* metodu testování citlivosti populací *V. inaequalis* ke strobilurinovým fungicidům na základě klíčivosti spor. Metodu lze využít i pro další třídy fungicidu, které inhibují klíčivost spor, **NE pro SBI** (fungicidy ze skupiny sinhibitorů biosyntézy ergosterolu) a **AP fungicidy**.

Příprava inokula

Sporulující léze (cca 40–60) z infikovaných listů se vyříznou a konidie se opláchnou deionizovanou vodou a přefiltrují se přes gázu, aby se odstranily nečistoty. Stanoví se koncentrace konidií se a upraví se přibližně na 5×10^5 spor/ml.

Příprava agarových ploten

QoI fungicidy se rozpustí ve sterilní deionizované vodě těsně před přípravou agarových ploten, koncentrace jsou 0 ppm a 2 ppm. Fungicid je přidán do 2% vodního agaru o teplotě ± 50 °C a dobře se promíchá. Do každé Petriho misky se naleje 20 ml agaru, a nechají se 24 hod. vychladnout. Takto připravené agarové plotny mohou být uchovány až 4 týdny při teplotě 6–8 °C.

Inokulace

Kapky o objemu 10 μ l suspenze konidií jsou napipetovány na agarovou plotnu a označeny fixem. Agarové plotny jsou poté inkubovány při teplotě 18–20 °C, ve tmě po dobu 24 hodin.

Vyhodnocení

24 hodin po inokulaci se spočítá procento klíčících spor ze 100 v každé kapce. Procento životaschopných spor je stanoveno na 0 ppm (počet klíčících spor/celkový počet spor $\times 100$). Procento QoI - rezistentních spor ve vzorku je stanoveno pomocí dělení: procento klíčených spor při 2 ppm /procento klíčivých spor při 0 ppm $\times 100$.

VIII.2.2. Monitoring rezistence ke strobilurinovým fungicidům dle upravené metodiky VŠÚO Holovousy na základě laboratorních testů klíčivosti spor v kapkách postřikové kapaliny

V testech je použita metoda klíčivosti konidií v kapkách postřikové kapaliny testovaného fungicidu Discus (kresoxim-methyl, obsah účinné látky 50 %) a to při maximální účinné koncentraci 0,02 %. Postřiková kapalina je pipetována do jamek podložních sklíček (80 µl do každé jamky, celkem 6 jamek pro každou variantu) a do těchto kapek jsou přeneseny konidie houby *V. inaequalis* pocházející z jednotlivých vzorků. V jedné variantě je vždy použita čistá pitná voda bez fungicidu jako kontrola. Sklíčka s konidiami jsou poté inkubována ve vlhké komůrce po dobu 48 hodin při teplotě 22 ± 2 °C. Pod mikroskopem je poté počítán počet vyklíčených spor (průměrně 500 spor ve variantě). Je vypočítáno procento klíčivosti z celkového množství hodnocených spor v jednotlivých variantách. Na základě procenta klíčivosti konidií zjištěného v kapce fungicidu a porovnání s procentem klíčivosti stejného vzorku ve vodě lze vzorky populací *V. inaequalis* zařadit do jednotlivých kategorií. Podrobnější popis metodiky je možné nalézt v jiné, v již vydané metodice Vávra a kol., 2015: Detekce ras a populací rezistentních k fungicidům patogena *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. na území České republiky.

VIII.3. Molekulární metody testování rezistence *Venturia inaequalis* ke strobilurinovým fungicidům

V současnosti se pro detekci mutace G143A používají postupy založené na metodě PCR. Fontaine (Fontaine, S., 2009) popisuje kvalitativní metodu detekce s použitím alelicky specifických primerů s udávanou citlivostí 1 %. Sedlák (2013) popisuje detekci mutované varianty analýzou PCR produktů pomocí metody SSCP (ssDNA Conformation Polymorphism) s využitím polyakrylamidové gelové elektroforézy. Výbor FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) uvádí dvě schválené metody pro detekci mutace G143A v genu *cyt b* – využití RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), respektive pyrosekvenování pro analýzu PCR produktů. Nevýhodou všech postupů je časová náročnost, nemožnost přesné kvantifikace zastoupení mutované rezistentní formy G143A a nízká citlivost.

Uvedené nedostatky odstraňuje sada pro detekci mutace G143A způsobující rezistenci ke QoI fungicidům, podle užitého vzoru (číslo podání PUV 2017-34297; původce VŠÚO Holovousy s.r.o.) a vynálezu (číslo podání PV 2017-696; původce VŠÚO Holovousy s.r.o.), jehož podstata spočívá

v tom, že obsahuje primery pro současnou kvalitativní nebo kvantitativní PCR detekci lokusu mitochondriálního genu *cyt b* u původce strupovitosti jabloně *V. inaequalis*, kdy tento lokus obsahuje buď přirozeně se vyskytující aminokyselinu glycin v poloze 143 (WT), nebo mutaci G143A zajišťující rezistenci vůči strobilurinovým fungicidům.

Metodou kvantitativní real-time PCR lze získat přesné zastoupení mutované varianty G143A mitochondriálního genu *cyt b* ve sledované populaci, a to s vysokou citlivostí nejméně 0,1 % vzhledem k WT variantě.

Detekce WT sekvence nebo mutované sekvence G143A mitochondriálního genu *cyt b* u *V. inaequalis* může být provedena z jakékoli části organismu (konidie, askospory, mycelium)

Prvním krokem detekce WT sekvence nebo mutované sekvence G143A mitochondriálního genu *cyt b* u *V. inaequalis* je izolace celkové DNA z houbového organismu metodami známými v oboru. Izolovaná DNA je následně analyzována na přítomnost WT a/nebo mutované sekvence G143A mitochondriálního genu *cyt b* u *V. inaequalis* metodou PCR sadami primerů podle vynálezu.

VIII.3.1. Kvantitativní detekce WT a mutované varianty G143A mitochondriálního genu *cyt b* u *Venturia inaequalis* metodou real-time PCR

Pro detekci přítomnosti WT a rezistentní mutované varianty G143A mitochondriálního genu *cyt b* je ze směsi konidií *V. inaequalis* izolována celková DNA pomocí soupravy Exgene Plant SV mini (GeneAll), detailní postup izolace je popsán v návodu od výrobce kitu. Připravené DNA se použijí jako templát pro real-time PCR reakci s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl směs standardů; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP každý; 1U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500 nM primery každý; 1x EvaGreen (interkalační barvivo, Biotium). Každý vzorek je v oddělených zkumavkách otestován na přítomnost sekvence WT a mutované sekvence G143A mitochondriálního genu *cyt b* pomocí real-time PCR.

Pro real-time PCR detekci WT sekvence mitochondriálního genu *cyt b* *V. inaequalis* se použijí tyto primery:

Forward primer 1: ATGGTCAAATGAGCCTAGGTGGT (SEQ ID NO. 1)

Reverse primer 1: AAGCCTCCCCACAGAAATTCG (SEQ ID NO. 3).

Pro real-time PCR detekci mutované sekvence G143A mitochondriálního genu *cyt b* *V. inaequalis* jsou použity tyto primery:

Forward primer 2: ATGGTCAAATGAGCCTAGTGGCT (SEQ ID NO. 2)

Reverse primer 1: AAGCCTCCCCACAGAAATTCG (SEQ ID NO. 3).

Real-time PCR reakce probíhá v zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/2 s, 72 °C/10 s (50x), s odečtem fluorescence v HRM kanálu.

Pro kvantitativní vyhodnocení jsou do real-time PCR běhu přidány čtyři standardy pro WT sekvenci a čtyři standardy pro mutovanou sekvenci G143A mitochondriálního genu *cyt b* o známé koncentraci v desítkovém ředění pro sestrojení kalibrační křivky.

Po ukončení běhu se pomocí Rotor-Gene Q softwaru sestrojí kalibrační křivky pro absolutní kvantifikaci varianty WT a mutované varianty G143A mitochondriálního genu *cyt b* v testované populaci *V. inaequalis*. Z absolutních koncentrací jednotlivých variant se po provedení normalizace vypočte zastoupení mutované varianty G143A mitochondriálního genu *cyt b* jako procento v testované populaci *V. inaequalis*.

VIII.3.2. Detekce resistance *V. inaequalis* ke QoI fungicidům pomocí standardizované molekulární metody FRAC - pyrosekvenování

Autoři: Friederike Manger-Jacob, Thekla Taufferner, Dr. Andreas Mehl Bayer AG, 40789 Monheim, Germany

Tato metoda je validovaná pro detekci mutace G143A v cytochromu b. QoI fungicidy inhibují jeden jediný cílový enzym uvnitř mitochondriálního respiračního řetězce. Ze všech mechanismů resistance k fungicidům QoI, které byly doposud popsány, je cílová mutace G143A v současné době zdaleka nejdůležitější na praktické úrovni. Příčinou této resistance je polymorfismus jednoho nukleotidu (SNP) v genu cytochromu b, který vede k aminokyselinové substituci glycinu za alanin v pozici 143. Úroveň resistance (procento mutace G143A) ve vzorcích *V. inaequalis* lze rychle stanovit pomocí metody pyrosekvenace.

Odběr vzorků a extrakce DNA:

Přibližně 20 náhodně odebraných listů (nebo plodů) představuje jeden vzorek. Na jeden vzorek jsou z každého listu (nebo jablka) vyříznuty

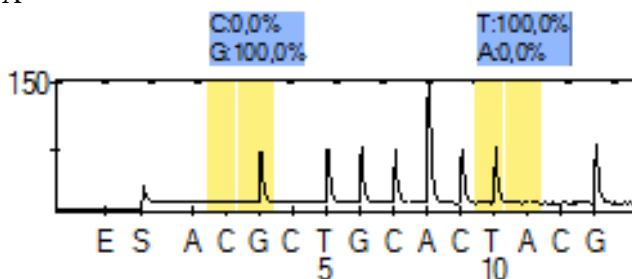
korkovrtem typické léze (Ø cca 6 mm) a shromážděny ve zkumavce o objemu 50 ml. Pro extrakci DNA se rostlinný materiál homogenizuje v kapalném dusíku za míchání s předchlazenými kuličkami (Vortex). Po mechanické homogenizaci jsou kuličky odstraněny. Homogenizované buňky se inkubují v 1–2 ml lyzačního pufru (Mullerův pufr) po dobu 10 minut při teplotě 95 °C ve vodní lázni. Suspenze se potom odstředí a supernatant, zředěný na 1 : 200, slouží jako templát pro PCR za účelem namnožení požadované genové sekvence.

PCR a pyrosekvenování

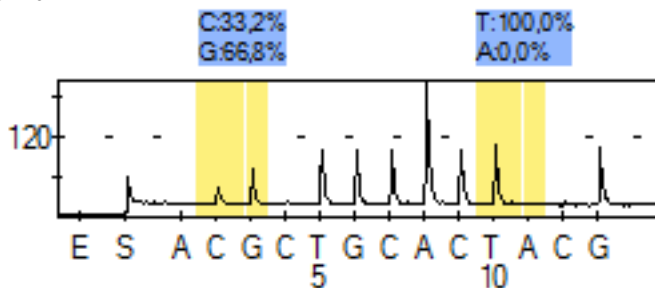
Pro amplifikaci genového fragmentu cytochromu b se použije 2,5 µl purifikované DNA v hot-start PCR reakci obsahující: 12,5 µl HotStarTaq Mastermix (Qiagen), 0,5 µl primeru VENTIN-XX-G143A-F1: GTAAAAGAGCAACGAGTAGACGG (10 µM), 0,5 µl primer VENTIN-XX-G143A-R1B: Bio_CGACTATATCTTGTCCTATTCACG (10 µM) a 6 µl H₂O dest. Podmínky PCR jsou následující: 15 minut při 95 °C, pak 94 °C 30 sekund, 57 °C 30 sekund a 72 °C 1 minutu (39 cyklů) a konečné prodloužení při 72 °C po dobu 10 minut. Pro detekci mutace G143A je PCR produkt analyzován pyrosekvenováním použitím následujícího specifického sekvenačního primeru (VENTIN-G143A-S1: CAAATGAGCCTATGGG) podle návodu výrobce (Qiagen). Specifický software vypočítává frekvenci alel v pozici mutace, což indikuje procento mutovaných fragmentů G143 v rámci spojených vzorků DNA.

Příklady:

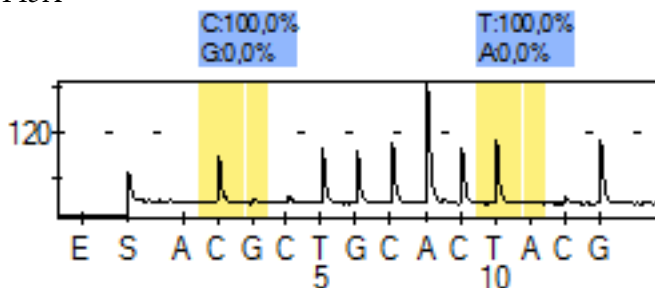
0 % G143A



33.2 % G143A



100 % G143A



VIII.3.3. Detekce resistance *Venturia inaequalis* ke QoI fungicidům pomocí standardizované molekulární metody FRAC - RFLP

Autoři: Simone Miessner, Andreas Koch, Dr. Gerd Stammler, BASF SE, 67117 Limburgerhof, Germany

Tato metoda je validovaná pro detekci mutace G143A v cytochromu b.

Odběr vzorků a extrakce DNA

Pro každý vzorek se odebere 20 infikovaných listů s typickými sporulujícími lézemi, které se vyříznou a použijí se k extrakci DNA. DNA se extrahuje pomocí Nucleo Spin Plant Kit (Macherey-Nagel) podle pokynů výrobce.

PCR

V prvním kroku se amplifikuje fragment genu cytochrom b obsahující cílovou sekvenci v PCR reakci s konečným objemem 100 μ l s použitím 10 μ l PCR-puftru, 3 μ l $MgCl_2$ (50 mM), 2 μ l dNTP (10 mM), 0,5 μ l Taq-polymerázy (Life Technologies), 5 μ l každého primeru (ANK 10 5' ,CTGTTGTTAGGCTCTTCAATG 3' a ANK 283 5' CTGTAGTTGAAAGGCTATTAG 3' konečná koncentrace 500 nM), 5 μ l DNA a 69,5 μ l Aqua bidest za následujících podmínek: Počáteční

krok zahřívání po dobu 3 minut při 94 °C následuje 35 cyklů 45 sekund při 95 °C, 30 sekund při 58 °C a 90 sekund při 72 °C a konečným krokem 10 minut při 72 °C. PCR produkty se přečistí pomocí NucleoSpin® Gel a PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel) podle pokynů výrobce. Purifikovaný PCR produkt se eluuje do 20 µl elučního pufru.

Následující restrikční reakce se provede v konečném objemu 30 µl s použitím 10 µl purifikovaného PCR produktu, 0,5 µl TseI (New England Biolabs, 5000 U/ml), 3 µl odpovídajícího pufru a 16,5 µl Aqua bidest a následuje inkubace při 65 °C alespoň po dobu 2 hodin pro úplné rozštěpení. Poté se provede elektroforéza na 2% agarózovém gelu obarveným ethidiumbromidem.

Analýza

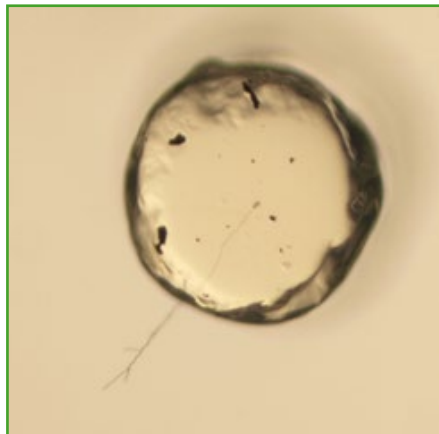
Po provedení elektroforézy se gel analyzuje s ohledem na počet a velikost fragmentů. Může dojít k některému z následujících výsledků:

- 1 fragment (velikost: 413 bp): citlivý (divoký typ)
- 2 fragmenty (velikost: 112 bp a 301 bp): rezistentní (G143A)
- 3 fragmenty (velikost 112 bp, 301 bp a 413 bp), směs citlivého (divokého typu) a rezistentního (G143A)

VIII.4. In vitro testy citlivosti *Venturia inaequalis* k triazolovým fungicidům

Monosporické izoláty

Při odběru vzorků je vhodné odebrat celý výhon, rostlinný materiál bude déle použitelný a při ranné infekci může dojít ještě k jejímu dodatečnému rozvoji a tedy i větší výtěžnosti konidií. Konidie jsou smývány z povrchu listů pomocí deionizované vody a skleněné špachtličky, s jejíž pomocí jsou pak přemístěny na agarovou plotnu z vodního agaru s obsahem chloramfenikolu a kyseliny mléčné. Rovnoměrného rozmístění konidií na plotnu dosáhneme umístěním vzorku na Petriturn (Schuett – Biotec), kde umístěním špachtličky namočené v suspenzi konidií a pomocí krouživého pohybu rozetřeme suspenzi po povrchu. Takto připravené vzorky inkubujeme 18–24 h při 22 °C, poté vzorky prohlédneme a pomocí speciálně upravené jehly a injekční stříkačky vypíchneme přesně jednu klíčící konidii a přeneseme ji na novou agarovou plotnu z PDA s přísadkou chloramfenikolu a kyseliny mléčné. Po třech týdnech až jednom měsíci je mycelium dostatečně narostlé a připravené pro další testy, ať již molekulární nebo kultivační. V rámci řešení výše uvedeného projektu byly testovány účinné látky penconazole, tetraconazole, fluquinconazole a myclobutanil (Sigma Aldrich).



Obr. 2: Klíční konidie na agarovém terčíku **Obr. 3:** Počátek růstu mycelia

VIII.4.1. Molekulární metody stanovení potřeby in vitro testování rezistence *Venturia inaequalis* k triazolovým fungicidům

Ke stanovení míry rezistence vůči triazolovým fungicidům se používá metody stanovení relativní exprese genu CYP51A1 pomocí metody kombinující reverzní transkripci a real-Time PCR (RT qPCR). Jako kontroly je nutné použít citlivý a rezistentní izolát.

Izolace mRNA

mRNA je izolována pomocí komerčně dodávaného kitu Hybrid-R™ (GeneAll®). K izolaci je použito 100 mg mycelia monosporických izolátů pěstovaných na PDA (Potato dextrose agar). Čistota a množství vyizolované mRNA se měří pomocí přístroje Qubit 3 fluorometr (Thermo Fisher Scientific) a všechny vzorky se naředí na koncentraci 5ng*ml⁻¹.

Transkripce do cDNA

K transkripci mRNA do cDNA je využit komerčně dodávaný kitu Hyperscript™ RT Mastermix (GeneAll®).

RT qPCR

Pro větší přesnost je zvolena metoda relativní exprese. Jako reportérový gen je zvolen Actin.

Sekvence primerů pro actin:

AJ755 (5-CCGATCGTATGCAAAAAGGAAA-3)

AJ756 (5-GGGCAATGATTTTGACCTTCA-3)

Sekvence primerů pro CYP51A1

CYP51 F1 CCATGTCAACGCAGAGGAAA

CYP51 R1 CGAACTTGTGGATATCAGCAGG

Jako reakční směs je použit kit SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (BioRad), reakce probíhají v objemu 20 μ l.

Reakční směs:

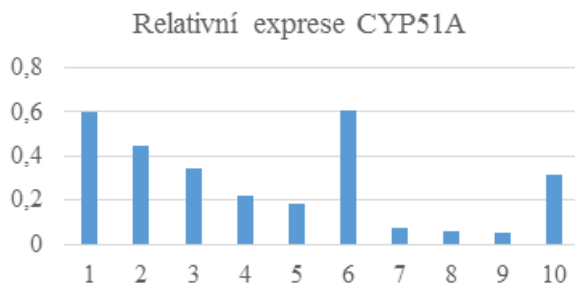
Supermix	10 μ l
PrimerMix	0,25 μ l (výsledná koncentrace 300 nM každého)
cDNA	2 μ l
Nuclease free H ₂ O	do 20 μ l

Tab. 3: Reakční podmínky

Krok	Teplota °C	Čas	Počet cyklů
UDG	50	2 minuty	1
Počáteční denaturace	95	10 minut	1
Denaturace	95	15 sekund	40
Nasedání	60	30 sekund	
Prodlužování	72	30 sekund	
Melting křivka	65-95 po 0,5 °C	Po 5 sekundách	1

Za rezistentní proti jednomu nebo více výše zmiňovaným triazolovým účinným látkám lze považovat izoláty s větší hodnotou relativní exprese než je 0,2 (Graf 1). Ostatní izoláty je vhodné otestovat na rezistenci ještě kultivací na živném médiu s přídatkem účinné látky. Vůči účinné látce myclobutanil tento test není průkazný. Proto je nutné u všech izolátů provést testování pomocí kultivace na živném médiu s přídatkem účinné látky myclobutanil.

Graf 1: Relativní exprese CYP51A1 vztažená k reportérovému genu Actin.



VIII.4.2. Stanovení rezistence *Venturia inaequalis* ke triazolovým fungicidům pomocí testu kultivace

Koncentrace vybraných účinných látek použitých pro testování účinnosti musí být zvoleny tak, aby výsledky testu byly použitelné pro výpočet EC50 a dále pak rezistenčních faktorů jednotlivých izolátů pro konkrétní účinné látky, tedy dle rovnice $\log k = (\log (C_{\max}/C_{\min}))/n^{-1}$ se vypočítá log K a následně faktor K, který slouží pro výpočet logaritmičsky rozložených koncentrací pro testování účinnosti vybraných účinných látek. Pro testování účinnosti fungicidních účinných látek pomocí kultivace se osvědčily koncentrace 0; 0,01; 0,056; 0,32; 1,78; 10 µg/ml.

Účinné látky se připraví jako zásobní roztoky rozpuštěním účinné látky v DMSO (dimethylsulfoxid). Ve zvolených koncentracích se připraví agarové plotny s přidáním fungicidem, a to přidáním rozpuštěné účinné látky do zchladlého média. Na takto připravené živné médium se pasážují jednotlivé monosporové izoláty a to vždy ve 12 opakováních. Připravené plotny s izoláty *V. inaequalis* jsou inkubovány při 22 °C po dobu 30 dní, poté je experiment vyhodnocen, a to pomocí měření průměrů narostlého mycelia jednotlivých izolátů ve dvou rozměrech na sebe kolmých a výsledek se zprůměruje.

Získaná data pro každý izolát a každou účinnou látku se podrobí probitové analýze a vypočítá se hodnota EC50. Z této se dále vypočítává rezistenční faktor, který je použit pro extrapolaci vlastností rezistence jednotlivých izolátů vůči konkrétním účinným látkám. Rezistenční faktor se vypočítá tak, že se hodnota EC50 daného izolátu vydělí hodnotou EC50 citlivého izolátu. Proto je pro výpočet rezistenčního faktoru bezpodmínečně nutné mít jako kontrolu citlivý izolát vůči testované účinné látce. Za rezistentní je považován takový izolát, jehož rezistenční faktor je vyšší než 5.

V tabulce č. 4 jsou uvedeny jako příklady výsledky testů konkrétních izolátů, které byly prováděny v rámci řešení výše uvedeného výzkumného projektu. Pro testování v uvedeném příkladu byly použity účinné látky fungicidů registrovaných pro použití proti houbovému patogenu *V. inaequalis*: penconazole, tetraconazole, fluquinconazole a myclobutanil. Účinné látky byly připraveny jako zásobní roztoky rozpuštěním účinné látky v DMSO. Účinné látky byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich. Jako kultivační médium sloužil bramborovo-dextrózový agar (PDA). Účinné látky byly naředěny do zchladlého média v šesti koncentracích: 0 % – kontrola, 0,01 %, 0,06 %, 0,32 %, 1,78 % a 10 %. Takto připravené médium bylo rozlito do sterilních Petriho misek o průměru 9 cm. Na agarové plotny byly jehlou přeočkovány izoláty *V. inaequalis*, a to vždy 4 opakování na jednu Petriho misku. Od jednoho

izolátu, jedné účinné látky a jedné koncentrace byly připraveny 3 Petriho misky, tedy celkem 12 opakování. Misky byly uzavřeny parafínovou páskou (Parafilm) a inkubovány 1 měsíc při 21 °C. Poté byl změřen růst kolonií ve dvou rozměrech na sebe kolmých, průměr obou čísel byl zanesen do tabulky a následně vyhodnocen pomocí programu Statistica (StatSoft).

Tab. 4: Rezistenční faktory, červeně vyznačené hodnoty značí rezistenci izolátu k dané účinné látce

Izolát	Penconazol	Tetraconazole	Fluquinconazole	Myclobutanil
1	18,73	2,35	2,35	1,03
2	6,82	6,15	6,15	1,00
3	14,09	11,62	11,62	3 144,18
4	28,36	179,27	179,27	14 977 747,78
5	2,36	1,38	1,38	1,06
6	9,82	7,54	7,54	1,06
7	2,18	2,38	2,38	1,06
8	4,45	2,15	2,15	57 290 794 398 091,30
9	1,00	1,81	1,81	14 409 425,05
10	61,18	38,38	38,38	2 421 324 403 497,45

IX. Srovnání novosti postupů

V metodice jsou uvedené postupy testování citlivosti, respektive rezistence populací patogena *V. inaequalis* z produkčních výsadeb k používaným vybraným fungicidům ze skupiny QoI a DMI. Jsou uvedeny metody stanovené jako standardní postupy mezinárodním expertním panelem FRAC a dále jsou zde popsány postupy detekce přítomnosti rezistence k uvedeným fungicidům vyvinutým v rámci řešení výzkumného projektu QJ1510353. Jedná se o zcela nový postup s využitím real-time PCR detekce pro kvalitativní i kvantitativní stanovení přítomnosti mutace G143A odpovědné za projev rezistence patogena ke strobilurinovým fungicidům a postup stanovení relativní exprese genu CYP51A dokládající přítomnost rezistence *V. inaequalis* k některým DMI fungicidům pomocí metody kombinující reverzní transkripci a real-Time PCR (RT qPCR). Detailně jsou popsány i metodiky laboratorních testů na agaru k určení citlivosti/rezistence populace

houby k vybraným účinným látkám ze skupiny QoI fungicidů a AP a DMI fungicidů. Tyto postupy je možno využít jako rychlé ekonomicky dostupné metody orientačních testů citlivosti patogena k uvedeným účinným látkám. Postup stanovení detekce mutace G143A odpovědné za projev rezistence ke QoI fungicidům byl současně zapsán jako užitečný vzor.

X. Popis uplatnění metodiky

Metodické postupy stanovení přítomnosti rezistence patogena *V. inaequalis* k vybraným fungicidním látkám ze skupiny QoI, AP a DMI fungicidů může využít kterákoliv laboratoř zabývající se danou problematikou a disponující příslušným laboratorním a přístrojovým vybavením, stejně tak využití laboratorních metod testů na agaru, eventuálně skleníkových testů. Nejjednodušší postupy stanovení přítomnosti rezistence ke QoI fungicidům v populaci patogena v dané výsadbě metodou klíčivosti spor v kapkách postříkových kapalin mohou využívat jako rychlé orientační testy i sami pěstitelé, pokud jsou vybaveni alespoň základním laboratorním vybavením (mikroskop, drobné laboratorní pomůcky – sklíčka, pipety, váhy, Petriho misky). V metodice jsou dále uvedeny informace, typy a mechanismy vzniku rezistence stejně jako popis bionomie houby *V. inaequalis*, symptomů napadení i fungicidů využívaných v ochraně proti strupovitosti, které mohou být využity např. studenty nebo dalšími oborově zaměřenými zájemci k rozšíření znalostí o tomto hospodářsky nejvýznamnějším patogenu jableň.

XI. Ekonomické aspekty

Jableň jsou nejvýznamnější ovocnou plodinou pěstovanou jako tržní kultura v České republice. Plocha produkčních výsadb jableň v ČR představuje v současné době téměř 7 tis. ha. Strupovitost jableň je hospodářsky nejvýznamnější chorobou jableň celosvětově rozšířenou ve všech oblastech, kde se toto ovoce pěstuje. Náklady vynaložené na ochranu proti strupovitosti v podstatě představují nejvýznamnější rozpočtovou položku z celého systému ochrany jableň proti škodlivým organismům a v podmínkách ČR se pohybují v závislosti na počasí, odrůdě a zvoleném systému ošetřování průměrně v rozmezí cca 15–24 tis. Kč/ha (Uvedená cena představuje jen kalkulaci za pesticidy, další náklady, tj. mzdové náklady, náklady na traktorovou práci, pohonné hmoty, odpisy, režie atd. nejsou započteny. Pokud by byly zahrnuty, tak by se uváděná položka zvýšila cca na jeden a půl až dvojnásobek). Ze zkušeností víme, že selhání chemické ochrany může zapříčinit napadení

40–60 % (ale i více) plodů původcem strupovitosti, takto napadené ovoce není realizovatelné jako konzumní. Zpřesnění systému ochrany na základě získaných poznatků o rezistenci/citlivosti populace houby vyřazením neúčinných přípravků ze systému a zvýšením účinnosti ochrany tak vede k významnému zvýšení tržeb a rentability produkce. Souvisejícím přínosem je snížení zátěže prostředí cizorodými látkami nadbytečně aplikovanými neúčinnými přípravky díky jejich vyřazení z ošetřování, pokud se k nim prokáže na dané lokalitě vznik rezistence patogena.

XII. Seznam použité literatury

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

ANONYM 1. Resistance overview. 2017 [online]. Fungicide action committee. Dostupné z <http://www.frac.info/resistance-overview>>.

ANONYM 2. QoI fungicides – Introduction and General Information [online]. Fungicide action committee. 2017. Dostupné z <<http://www.frac.info/working-group/qol-fungicides>>.

ANONYM 3. Registr přípravků na ochranu rostlin. 2017 [online]. Ministerstvo zemědělství. Dostupné z <http://eagri.cz/public/app/eagriapp/POR/Detail.aspx?id=23693&stamp=1428334362981>.

ANONYM 4. AP fungicides – Introduction and General Information. 2017 [online]. Fungicide action committee. Dostupné z <http://www.frac.info/working-group/ap-fungicides>.

ANONYM 5. SDHI fungicides – Introduction and General Information. 2017 [online]. Fungicide action committee. Dostupné z <http://www.frac.info/working-group/sdhi-fungicides>

BAUDYŠ, E., BENADA, J., ŠPAČEK, J. 1962. Zemědělská fytopatologie, Díl IV. – choroby ovocných rostlin. Praha: ČAZV, s. 203–211.

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

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

GISI, U., SIEROTZKI, H., COOK, A. MCCAFFERY, A. 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science*. (58), p. 859–867.

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

KLOUTVOROVÁ, J, LÁNSKÝ, M., OUŘEDNÍČKOVÁ, J. 2011. Integrovaná ochrana jaderovin. Certifikovaná metodika. Holovousy: Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o. s. 92. ISBN 9788087030202.

KÖLLER, W. AND WILCOX, W. F. 1999. Evaluation of tactics for managing resistance of *Venturia inaequalis* to sterol demethylation inhibitors. *Plant Disease*. (83), p. 857–863.

MACHARDY, W., E. 1996. Apple scab: biology, epidemiology, and management. APS. St. Paul, Minnesota. p. 545. ISBN 0890542066.

MCGRATH, M. T. 2001. Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew: Experiences and challenges. *Plant Disease*. 85(3), p. 236–245.

NIKOU, D., MALANDRAKIS, A., KONSTANTAKAKI, M., VONTAS, J., MARKOGLU, A., ZIOGAS, B. 2009. Molecular characterization and detection of overexpressed C-14 alpha-demethylase-based DMI resistance in *Cercospora beticola* field isolates. *Pesticide. Biochemistry and Physiology*. (95), 18–27.

OLAYA, G., KÖLLER, W. 1999. Diversity of kresoxim-methyl sensitivities in baseline populations of *Venturia inaequalis*. *Pesticide Science*. (55), p. 1083–1088.

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

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

SCALLIET G, BOWLER J, LUKSCH T, KIRCHHOFER-ALLAN L, STEINHAEUER D, WARD, K. NIKLAUS M, VERRAS A, CSUKAI M, DAINA A, FONNÉ-PFISTER, R. 2012. Mutagenesis and functional studies with succinate dehydrogenase inhibitors in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS one*. 7(4), p. 35429.

SIEROTZKI H, SCALLIET G. 2013. A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Phytopathology*. 103(9), p. 880–887.

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

WYENANDT, CH. A, MAXVELL, N, WARD, D. L., 2008. Fungicide programs affect practical resistance development in cucurbit powdery mildew of pumpkin. *HortScience*. 43(6), p. 1838–1845.

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

XIII. Seznam publikací, které předcházely metodice

KLOUTVOROVÁ, J., DEMELOVÁ, Š., RYBANSKÁ, D., JAKLOVÁ, P., KUPKOVÁ J. 2015. Ověření účinnosti fungicidu Aliette 80 WG proti *Venturia inaequalis* (Cook) Wint. *Vědecké práce ovocnářské*. (24), s. 121–127. ISSN 0231-6900.

JAKLOVÁ, P. 2018. Aktuálne problémy v ochrane proti chrastavivosti a možnosti ochrany s dôrazom na zníženie potreby fungicídov. *Sady a vinice*. s. 3, 22–25.

JAKLOVÁ, P., KLOUTVOROVÁ, J., KUPKOVÁ, J. 2017. Srovnání agresivity dvou populací *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter. *Vědecké práce ovocnářské*. (25), s. 147–152. ISSN 0231-6900.

JAKLOVÁ, P., KLOUTVOROVÁ, J., ČMEJLA, R. 2018. Monitoring rezistence *Venturia inaequalis* ke strobilurinovým fungicidům pomocí metody real-time PCR. In: ŠEFROVÁ, H., ŠAFRÁNKOVÁ, I. (eds.): XXI. Česká a slovenská konference o ochraně rostlin: sborník abstraktů. MENDELU v Brně, 5.– 6. září 2018, 140 s.

JAKLOVÁ P., ČMEJLA R., KLOUTVOROVÁ, J., ed. 2018. Monitoring of *Venturia inaequalis* resistance to strobilurine fungicides by real-time PCR. *Konference Applications of plant pathology: from field to clinic: sborník abstraktů*. Londýn, 18. duben 2018.

KLOUTVOROVÁ, J., JAKLOVÁ, P., KUPKOVÁ, J. KUPKA, M. 2018. Ověření vedlejší účinnosti přípravku Atlante Plus proti *Venturia inaequalis* (Cook) Wint. Vinař – sadař. (2), s. 60–62. ISSN 1804-3054.

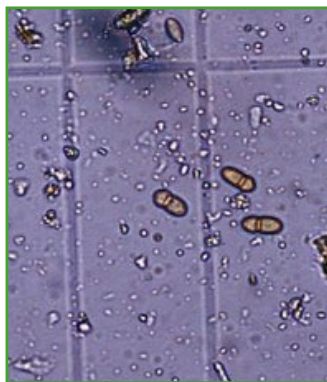
MAŇASOVÁ, M., WENZLOVÁ, J., ZOUHAR, M., MAZÁKOVÁ, J., RYŠÁNEK, P., BALÁŽOVÁ, K. 2017. Vliv esenciálních olejů na původce strupovitosti jabloně *Venturia inaequalis*. Zahradnictví. (1), s. 68–72. ISSN 1213-7596.

VÁVRA, R., KLOUTVOROVÁ, J., BLAŽEK, J., SEDLÁK, P., VEJL, P., MELOUNOVÁ, M., BOČEK, S. 2015. Detekce ras a populací rezistentních k fungicidům patogena *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. na území České republiky. Certifikovaná metodika. Holovousy: VŠÚO Holovousy s.r.o. ISBN 978-80-87030-44.

XIV. Přílohy



A) Klíčící askospora *V. inaequalis*



B) Dvoubuněčné askospory

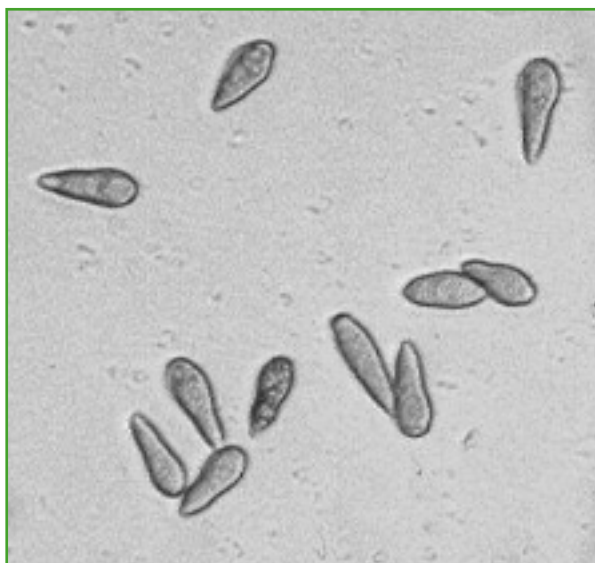


C) Vřečka se zralými askosporami

Obr. 1: A – C Fotografie askospor *V. inaequalis*

Zdroj: VŠÚO Holovousy

Autor: Kloutvorová J.



A) Konidie *V. inaequalis*



B) Klíčící konidie *V. inaequalis*

Obr. 2: A – B Fotografie konidií *V. inaequalis*

Zdroj: VŠÚO Holovousy

Autor: Kloutvorová J.



A) Listy jabloně napadené houbou *V. inaequalis*



B) Listy jabloně napadené houbou *V. inaequalis*

Obr. 3: A – B Fotografie listů napadené houbou *V. inaequalis*

Zdroj: VŠÚO Holovousy

Autor: Kloutvorová J.



A) Rozočkovaný monosporický izolát *V. inaequalis*

Obr. 4: Příklad monosporického izolátu *V. inaequalis*

Autor: Jaklová P.

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

UKZUZ 117978/2018

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

Název metodiky: **Metodika kvantitativní detekce mutace v genu CytB u *Venturia inaequalis* a postupů stanovení rezistence patogena k vybraným fungicidům**

Autor/autoři: **Ing. Jana Kloutvorová; Ing. Pavlína Jaklová; RNDr. Radek Čmejla, Ph.D.; Prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc.; Ing. Miloslav Zouhar, Ph.D.; Ing. Jana Mazáková, Ph.D.; Ing. Marie Maňasová**

Název organizace/cí: **Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.; Česká zemědělská univerzita v Praze**

Místo vydání: **Holovousy**

Rok vydání: **2018**

Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu/podpory na rozvoj výzkumné organizace č. NAZV č. QJ1510355 „Zvyšování efektivity ochrany jableň proti strupovitosti“.

Využívá projekt „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví, rybolov“? **ANO x NE**

V případě, že projekt využívá „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví a rybolov“, je výsledek typu N_{met} zdarma k dispozici všem zájemcům na webových stránkách http://www.vsuo.cz/108/Metodiky_a_odborne_publicace/

Brno 19. 9. 2018

.....
Razítko odborného orgánu státní správy

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy:

Ing. Daniel Jurečka

Funkce zástupce odborného útvaru státní správy:

ředitel ústavu

.....
Podpis zástupce odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitelky Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZe:

V dne1.9.2018..

.....
Ing. Pavlína Adam, Ph.D.

**Metodika kvantitativní detekce mutace v genu *cyt b* u *Venturia inaequalis*
a postupů stanovení rezistence patogena k vybraným DMI fungicidům.**

Autoři: Ing. Jana Kloutvorová, Ing. Pavlína Jaklová, RNDr. Radek Čmejla, Ph.D.

Vydal: VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.

Grafická úprava a sazba: Jan Slezák - OUTSOURCING

Tisk: Reprint s.r.o.

Počet kopií: 100

ISBN 978-80-87030-58-5

