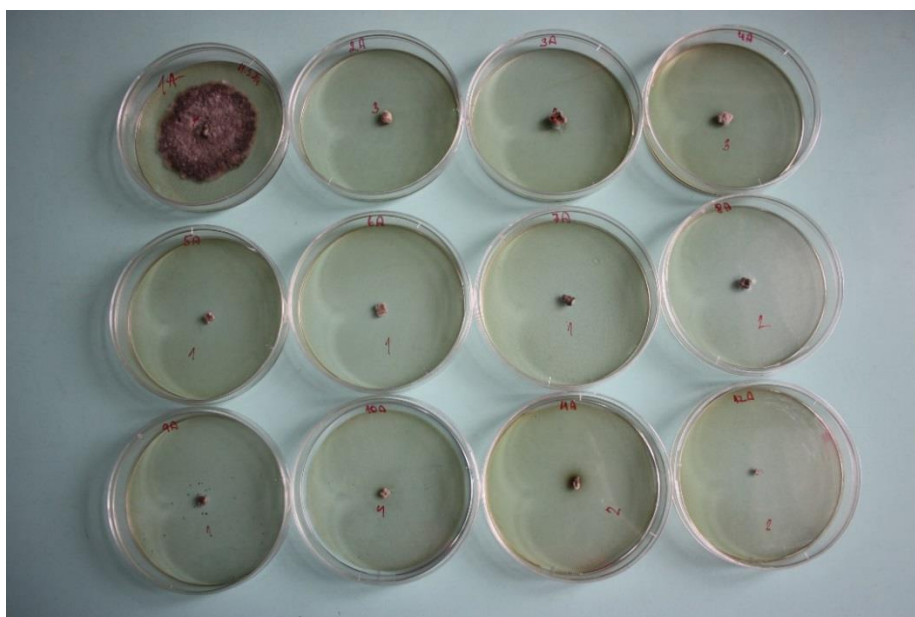


Certifikovaná metodika

**Testování citlivosti/rezistence houbových patogenů řepky olejky –  
*Sclerotinia sclerotiorum*, *Leptosphaeria maculans* a *L. biglobosa*  
k fungicidům**



Autoři:

Plachká Eva, Poslušná Jana, Mazáková Jana

OSEVA PRO s.r.o., odštěpný závod Výzkumný ústav olejnin Opava

Agritec Plant Research s.r.o.

Česká zemědělská univerzita v Praze

Opava

2016



Certifikovaná metodika

**Testování citlivosti/rezistence houbových patogenů řepky olejky – *Sclerotinia sclerotiorum*, *Leptosphaeria maculans* a *L. biglobosa* k fungicidům**

Metodika je realizačním výstupem řešení výzkumného projektu NAZV MZe QJ1310227 Nové poznatky z biologie a epidemiologie patogenů řepky a jejich rezistence k pesticidům v podmínkách České republiky jako základy racionalizace ochrany proti nim.

**Eva Plachká**

OSEVA PRO s.r.o., odštěpný závod Výzkumný ústav olejin Opava



**Jana Poslušná**

Agritec Plant Research s.r.o., Šumperk



**Jana Mazáková**

Česká zemědělská univerzita v Praze



Opava 2016



Vydal

OSEVA vývoj a výzkum s. r. o., Opava, 2016, 1. vydání

Tato publikace nesmí být přetiskovaná vcelku ani po částech, uchovávaná v médiích, přenášena nebo uváděna do oběhu pomocí elektronických, mechanických, fotografických či jiných prostředků bez uvedení osoby, která má k publikaci práva podle autorského zákona nebo bez jejího výslovného souhlasu. S případnými náměty na jakékoliv změny nebo úpravy se obraťte písemně na prvního autora.

**ISBN: 978-80-905808-1-7**

**Dedikace:** Metodika je výstupem řešení výzkumného projektu MZe NAZV QJ1310227 Nové poznatky z biologie a epidemiologie patogenů řepky a jejich rezistence k pesticidům v podmínkách České republiky jako základy racionalizace ochrany proti nim.

**Certifikaci udělil:** Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský  
Osvědčení UKZUZ 008216/2017

**Oponentní posudky vypracovali:**

RNDr. Jan Juroch, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Sekce rostlinolékařské péče, Odbor ochrany proti škodlivým organismům, Oddělení metod integrované ochrany rostlin

Ing. Lenka Odstrčilová, Ph.D., Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i., Pokusná stanice Hněvčeves

**Podíl práce**

Eva Plachká	34 %
Jana Poslušná	33 %
Jana Mazáková	33 %

**Kontakty na autory**

**Ing. Eva Plachká, Ph.D.;** e-mail: [plachka@oseva.cz](mailto:plachka@oseva.cz)

**Ing. Jana Poslušná;** e-Email: [poslusna@agritec.cz](mailto:poslusna@agritec.cz)

**Ing. Jana Mazáková, Ph.D.;** e-mail: [mazakova@af.czu.cz](mailto:mazakova@af.czu.cz)

Obsah	
Anotace.....	8
1 Úvod.....	9
2 Cíl metodiky .....	10
3 Vlastní popis metodiky .....	11
3.1 Přehled problematiky .....	11
3.1.1 Taxonomické zařazení patogena <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	11
3.1.2 Taxonomické zařazení <i>L. maculans</i> a <i>L. biglobosa</i> .....	12
3.2 Typy rezistence patogenů k fungicidům a jejich účinným látkám .....	14
3.2.1 Kvalitativní rezistence .....	14
3.2.2 Kvantitativní rezistence .....	14
3.2.3 Křížová rezistence .....	15
3.2.4 Mnohonásobná rezistence .....	15
3.2.5 Molekulární mechanismy rezistence .....	15
3.2.6 Rezistence <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> k fungicidům .....	16
3.2.7 Rezistence patogenů <i>Leptosphaeria maculans</i> , <i>L. biglobosa</i> k fungicidům.....	17
3.3 Monitoring rezistence a antirezistentní strategie .....	18
3.4 Výsledky získané během řešení projektu .....	19
3.4.1 Testování rezistence patogena <i>S. sclerotiorum</i> k fungicidům.....	19
3.4.2 Testování rezistence patogenů <i>Leptosphaeria maculans</i> a <i>L.</i> <i>biglobosa</i> k fungicidům.....	22
3.5 Vlastní metoda hodnocení citlivosti patogenů k fungicidům .....	24
3.5.1 Izolace patogena <i>S. sclerotiorum</i> a příprava na testování rezistence	24
3.5.2 Izolace patogenů <i>L. maculans</i> a <i>L. biglobosa</i> a příprava na testování rezistence .....	24
3.5.3 Příprava otrávených ploten živného média.....	25
3.5.4 Materiál a přístrojové vybavení .....	27
4 Srovnání novosti postupů.....	29
5 Popis uplatnění certifikované metodiky .....	30
6 Ekonomické aspekty spojené s uplatněním metodiky .....	31
7 Seznam použité související literatury .....	32
8 Seznam publikací, které předcházely metodice .....	34

## Anotace

Metodika obsahuje popis metod hodnocení citlivosti houbových patogenů řepky olejky *S. sclerotiorum*, *L. maculans* a *L. biglobosa* k fungicidům a seznamuje se získanými výsledky testování citlivosti získaných izolátů jednotlivých patogenů v ČR k vybraným fungicidům dostupným na českém trhu. Byli hodnoceni původci významných chorob řepky olejky: bílé hniloby řepky (původce *Sclerotinia sclerotiorum*) a fomového černání stonků řepky (původci *Leptosphaeria maculans* a *Leptosphaeria biglobosa*). U těchto patogenů byla v zahraničí prokázána rezistence ke konkrétním účinným látkám fungicidů. V ČR zatím rezistence sledovaných patogenů prokázána nebyla, nicméně byly získány/objeveny izoláty se sníženou citlivostí. Příčina rezistence je připisována opakovanému použití fungicidů se stejným mechanismem účinku. Na vznik rezistence má také vliv použitá dávka přípravku na hektar. Popisované metody hodnocení rezistence patogenů je možné využít pro monitoring rezistence prováděný státní správou, ale také privátními organizacemi. Na základě získaných výsledků je možné efektivně řídit ochranu řepky olejky proti chorobám.



## 1 Úvod

Předkládaná metodika je výsledkem řešení projektu QJ1310227 Nové poznatky z biologie a epidemiologie patogenů řepky a jejich rezistence k pesticidům v podmínkách České republiky jako základy racionalizace ochrany proti nim. Projekt je řešen v rámci programu Komplexní udržitelné systémy v zemědělství 2012–2018 „KUS“ Národní agentury pro zemědělský výzkum při Ministerstvu zemědělství ČR. Vedle koordinátora projektu České zemědělské univerzity v Praze (dále jen ČZU v Praze) jsou řešiteli projektu Mendelova univerzita v Brně, Agritec Plant Research s.r.o., Agrotest fyto, s.r.o., OSEVA PRO s.r.o., odštěpný závod Výzkumný ústav olejnin Opava (dále jen OSEVA PRO s.r.o., oz VÚO Opava), SPZO s.r.o. a Univerzita Palackého v Olomouci. Cílem projektu je získat nové poznatky z oblasti biologie, epidemiologie a rezistence významných patogenů řepky k pesticidům využitelné v rámci integrované ochrany rostlin proti nim na území České republiky. Konkrétně se jedná o údaje o rezistenci patogenů proti fungicidům používaným v ČR, zdroje způsoby infekce, reakci na mikroklima v porostu a požadavky na vnější podmínky, etiologii některých chorob a poškození a možnost využití indukované rezistence. Metodika je výstupem části zaměřené na hodnocení rezistence houbových patogenů vůči fungicidům. Na řešení této části se podílela tato pracoviště: ČZU v Praze, Agritec Plant Research s.r.o. a OSEVA PRO s.r.o., oz VÚO Opava.

Součástí řešení projektu byl vypracován postup sběru rostlinného materiálu s příznaky sledovaných chorob, izolace patogenů z napadených pletiv, přípravy patogenů k vlastnímu testování rezistence, stanovení výchozí koncentrace fungicidů testování rezistence a samotného testování rezistence popsány v této metodice. Metodika bude k dispozici státní správě ÚKZÚZ, uživatelům projektu OSEVA PRO s.r.o., oz VÚO Opava a SPZO s.r.o. a dalším zájemcům.

## **2 Cíl metodiky**

Cílem metodiky je seznámit zájemce s výsledky testování citlivosti významných patogenů řepky olejky k fungicidům a popsat jednoduchý a vypovídací postup testování citlivosti/rezistence patogenů řepky olejky k fungicidům včetně ekonomického zhodnocení využití výsledků popsané metody v zemědělské praxi.

## **3 Vlastní popis metodiky**

### **3.1 Přehled problematiky**

#### **3.1.1 Taxonomické zařazení patogena *Sclerotinia sclerotiorum***

Patogen *Sclerotinia sclerotiorum* je řazen do říše *Fungi*, oddělení *Ascomycota*, pododdělení *Pezizomycotina*, třídy *Leotiomycetes*, podtřídy *Leotiomycetidae*, řádu *Helotiales* (syn. *Leotiales*) a čeledi *Sclerotiniaceae* (MycoBank, 2016).

#### **Charakteristika patogena *Sclerotium sclerotiorum***

V pletivech napadené rostliny se tvoří volná černá sklerocia nepravidelného tvaru velikosti 3 – 15 mm, mohou být i větší. Ta se při sklizni dostávají společně se zbytky rostlin do půdy, občas jsou šířena v osivu a zasetá. V suché půdě zůstávají po celá léta životaschopná. Ze sklerocií vyrůstá v půdě mycelium nebo v povrchové vrstvě půdy ze sklerocií rostou světle hnědé miskovité plodnice apothecia velikosti 6 až 15 mm. Stopky apothecií dosáhnou na povrch půdy až ze 4 cm hluboko ležících sklerocií. V apotheciích jsou aska (vřeska) s eliptickými askosporami. Ty jsou v suchém počasí vystřelovány a aktivně jsou šířeny větrem. Za vysoké vlhkosti askospory klíčí a infikují listy a stonky. Vznikají laločnatá apresoria (útvary, jímž patogen přiléhá k substrátu) a hyfy pronikají kutikulou. Mycelium roste inter- a intracelulárně. Pektolytickými a celulólytickými enzymy je pletivo rostlin rychle rozkládáno. Infekční nepohlavní konidie patogena nejsou tvořeny (Hoffmann, Schmutterer, 1999).

Růst apothecií probíhá v horní vrstvě půdy od konce dubna do začátku června. Optimální teplota pro jejich růst je 8 až 14 °C v horních 5 cm půdy, teploty nižší než 7 °C zpochybňují vývoj. V severním Německu je první vlna letu askospor zaznamenávána na konci dubna, druhé vlny je dosaženo v polovině května. Askospory zůstávají životaschopné při vysoké vlhkosti pouze 2 až 3 dny. Klíčení askospor vyžaduje po dobu 16 až 24 hodin volnou vodu. Teplotní optimum pro klíčení askospor je 15 až 20 °C, ale se sníženou intenzitou mohou klíčit už při 0 °C a při 25 °C. Stav porostů a klima jsou v době klíčení velmi významné faktory. Výskyt symptomů začíná být viditelný za 5 týdnů po náletu askospor (Hoffmann, Schmutterer, 1999). Optimální teplotu pro klíčení askospor a infekci rostlin stanovili Koch et al. (2006) mezi 16–22 °C, teplota nižší než 7 °C a vyšší než 26 °C nepodporovala infekci ani klíčení askospor.

Vystřelování askospor je výrazně redukováno srážkami. Pro vysoké napadení je nezbytné oteplování půdy v březnu a dubnu a nízké srážky na konci května až do poloviny června. Dále je nezbytné proměnlivé počasí a infekce ze tří nebo více apotecí na 1 m<sup>2</sup>. Opad korunních plátků podporuje infekci, protože v místě jejich zachycení na rostlině se zvyšuje vlhkost, která chrání spory před vysycháním, současně jsou korunní plátky zdrojem výživy pro klíčící askospory. To je jedním z důvodů, proč se příznaky obvykle objevují až po kvetení (Hoffmann, Schmutterer, 1999).

Ochranná opatření proti bílé hnilobě řepky/hlízence obecné spočívají především ve formě fungicidního ošetření. Efektivní způsob ochrany je použití rezistentních odrůd a vhodný osevní odstup v pěstování náchylných plodin k původci choroby, který činí 4 a více let.

### **3.1.2 Taxonomické zařazení *L. maculans* a *L. biglobosa***

Podle taxonomického zařazení patří *L. maculans* a *L. biglobosa* do oddělení *Ascomycota*, pododdělení *Pezizomycotina*, třídy *Dothideomycetes*, podtřídy *Pleosporomycetidae*, řádu *Pleosporales* a čeledi *Leptosphaeriaceae* (Kaczmarek, Jędryczka, 2011, MycoBank, 2016).

### **Charakteristika patogenů *Leptosphaeria maculans* a *L. biglobosa***

Anamorfní stadium *Phoma lingam* (teleomorfní stadium *Leptosphaeria maculans* a *L. biglobosa*) bylo dlouho považováno za velmi významného patogena způsobujícího onemocnění brukvovitých plodin. Houba přežívá pomocí pyknid a pseudoperithecií na semenech a rostlinných zbytcích (Williams, 1992).

Nepohlavní fáze představována *Phoma lingam* je tvořena nepravými plodnicemi zvanými pyknidy, ve kterých se vytváří jednobuněčné válcovité pyknospory. Pyknidy jsou kulovité, černé a dvojího typu, pro první typ je typický rozměr 200–600 µm a tloušťka stěny do 18 µm a přežívání na živém hostiteli, druhý typ o velikosti 200–500 µm a tloušťkou stěny do 50 µm se zpravidla vytváří na mrtvém pletivu hostitele (Rimmer et al., 2007). Pyknidy patogenu *Phoma lingam* jsou tvořeny silnými stěnami (15–20 µm), obsahující 8 vrstev polygonálních, pseudoparenchymatických buněk o rozměrech 2–4 µm. Uvnitř pyknid se nachází pyknospory, ty jsou na rozdíl od askospor, tvořeny jednou buňkou (4–5 x 1,5–2 µm). Jsou hyalinní až světle hnědé, válcovitého tvaru a tupě zakončené na obou koncích. Poměr délky a šířky je u pyknospor 5 : 2, na rozdíl

od askospor, které jsou dlouhé a úzké (Shoemaker and Brun, 2001). Zdrojem infekce jsou napadená semena a posklizňové zbytky. Pyknidy mohou přežít na stoncích brukvovitých rostlin dlouhou dobu. Pyknospory jsou šířeny opět pomocí vody (dešťových srážek). Vstupní branou infekce mohou být i otvory po žíru larev dřepčků: *Psylliodes chrysocephala* a *Phylotreta spp.* (Hoffmann, Schmutterer, 1999).

Pohlavní fáze *L. maculans* a *L. biglobosa* se vyznačuje tvorbou plodniček pseudoperithecií, která jsou kulatá až oválná, tmavá, mírně zploštělá ve spodní části. Průměrná velikost pseudoperithecií *L. maculans* se pohybuje okolo 300–400  $\mu\text{m}$ , někdy dosahují až 500  $\mu\text{m}$  a tvoří se na epidermis stonku. Velikost plodnic *L. biglobosa* je v rozmezí 280–350  $\mu\text{m}$  a jsou pod epidermis stonku (Toscano–Underwood et al., 2003). U obou druhů je vytvořen ve středu pseudoperithecia otvor, u *L. maculans* je menší (90–100  $\mu\text{m}$ ) než u *L. biglobosa* (Kaczmarek, Jędryczka, 2011). Pseudoperithecia jsou rozdělena do pěti tříd zrání: A – nezralá pseudoperithecia, B – pseudoperithecia s tvořícími se asky, C – vytvoření nezralých askospor v askách, D – 8 plně dozralých askospor v každém asku, E – pseudoperithecia zralá, ale již prázdná, došlo k uvolnění askospor do prostředí (Jędryczka et al., 2006). Pseudoperithecia jsou tvořena asky (vřecky) o rozměrech (12) 18 21 (22)  $\times$  100–120 (150)  $\mu\text{m}$ . Podobně jako u jiných druhů z oddělení Ascomycota, obsahují aska obou druhů 8 askospor, které jsou dlouhé, rovné nebo mírně zakřiveného válcovitého tvaru. Askospory druhu *L. maculans* jsou velké v průměru 6–7  $\times$  (45) 50–60 (68)  $\mu\text{m}$ , jejich délka v poměru se šířkou je přibližně 8 : 1. Pro druh *L. biglobosa* jsou typické kratší askospory 6–7  $\times$  42–48 (60)  $\mu\text{m}$  a poměr délky k šířce je ve většině případů 7:1 (Williams, 1992). Tvořbě pseudoperithecií a následnému uvolnění askospor nejvíce prospívají hojné deště a teploty kolem 15 °C. Askospory se vyskytují v ovzduší v průběhu celého roku, ale především na podzim začátkem září a po uvolnění z plodniček jsou považovány za nejdůležitější zdroj infekce (Hoffman, Schmutterer, 1999).

### **3.2 Typy rezistence patogenů k fungicidům a jejich účinným látkám**

Fungicidní rezistence je definována jako snížená účinnost fungicidu na populaci houby nebo oomycety v důsledku jeho používání, případně jako dědičné přizpůsobení patogenu fungicidu, které vede ke ztrátě účinnosti. V podstatě jde o reakci patogenu na opakované použití stejné nebo příbuzné účinné látky se stejným působením. Patogen přestává být citlivý k účinné látce a rostlina již není dostatečně chráněna (Ackermann, 2013).

Rezistence může být buďto **vrozená**, která představuje dědičně fixovanou odolnost (necitlivost) patogenu k fungicidní účinné látce (např. fenylamidy a amidy kyseliny karboxylové nejsou účinné proti houbám, inhibitory biosyntézy sterolů, včetně inhibitorů demetylase nejsou účinné proti oomycetám apod.) nebo **získaná** následkem používání fungicidu, kdy patogen byl dříve k rizikové účinné látce citlivý (Ackermann, 2013).

#### **3.2.1 Kvalitativní rezistence**

Rezistence k některým fungicidům může být výsledkem modifikace jediného hlavního genu. Rezistence v tomto případě vede k úplné ztrátě kontroly nad původcem choroby, které se nedá zamezit ani použitím vyšších dávek, nebo častější aplikací fungicidu. Tento typ rezistence je běžně nazýván jako kvalitativní rezistence. Příkladem je rezistence k benzimidazolovým fungicidům (např. benomyl, thiophanate-methyl), která vyplývá z konformační změny cílového místa u různých patogenů nebo k látkám ze skupiny QoI azoxystrobin nebo trifloxystrobin u padlí tykvovitých (McGrath, 2001, 2005; Wyenandt et al., 2008).

#### **3.2.2 Kvantitativní rezistence**

Pokud rezistence vychází z modifikace několika interagujících genů, patogeny v závislosti na počtu genových změn (mutací) projevují různou citlivost k fungicidu. Variabilita v citlivosti uvnitř populace je kontinuální nebo unimodální a selekce se objevuje v určitém směru. Rezistence v tomto případě narušuje možnost chemické kontroly původce choroby, ale použitím vyšších dávek nebo častější aplikací fungicidu může být činnost patogena omezena. Až další selekce v genetické výbavě patogenu může následně způsobit úplnou ztrátu jeho kontroly. Jde o tzv. kvantitativní rezistenci. Kvantitativní rezistence vzniká vůči tzv. multi-site fungicidům zasahujícím do více míst metabolismu patogenu, pokud se u patogenu objeví současně několik mutací. Tento typ rezistence je

uváděn také v souvislosti s rezistencí k inhibitorům demetylace DMI (McGrath, 2001).

### **3.2.3 Křížová rezistence**

Způsoby mechanismů účinku různých účinných látek v rámci každé skupiny jsou velmi podobné nebo stejné. Patogenní populace, která je rezistentní k jednomu fungicidu v rámci určité skupiny, bude pravděpodobně rezistentní i k jiným přípravkům téže skupiny. Tento problém značně limituje kontrolu rezistence. Jakmile se jednou vyvine rezistence vůči jednomu fungicidu, ostatní účinné látky téže skupiny se pravděpodobně stanou méně účinné nebo úplně neúčinné (Brown, 2002; McGrath, 2001). Křížová rezistence může být také ale jen částečná a nové látky z téže skupiny mohou být účinnější než ty starší, ke kterým byla rezistence zaznamenána. Stupeň křížové rezistence se také liší mezi jednotlivými izoláty (Brent, Hollomon, 2007).

### **3.2.4 Mnohonásobná rezistence**

Na rozdíl od křížové rezistence, u mnohonásobné rezistence patogenní populace vykazují vznik rezistence k fungicidům více jak jedné chemické skupiny. Intenzivní používání rizikových fungicidů z různých chemických skupin může, pokud nejsou sledovány principy správné kontroly rezistence (antirezistentní strategii), vést ke vzniku mnohonásobné rezistence (Gallian et al., 2002).

### **3.2.5 Molekulární mechanismy rezistence**

Jako základní molekulární mechanismy rezistence patogenu k fungicidům se uvádějí

- a) modifikace cílového místa, na které má účinná látka působit, kdy dojde ke snížení schopnosti navázání fungicidu;
- b) syntéza jiného (zástupného) enzymu, schopného nahradit cílový enzym;
- c) zvýšená syntéza cílových míst, proti kterým má fungicid působit;
- d) snížený příjem fungicidu;
- e) metabolický rozklad fungicidu;
- f) jiné nepoznané mechanismy (Ma, Michailides, 2005).

### 3.2.6 Rezistence *Sclerotinia sclerotiorum* k fungicidům

Podle Fungicide Resistance Action Committee (FRAC, 2013) patří *S. sclerotiorum* k rostlinným patogenům s nízkým rizikem vzniku rezistence k fungicidům, nicméně rezistentní izoláty byly detekovány v mnoha částech světa. Ve Francii preventivní chemické ošetření proti bílé hnilobě stonku na počátku kvetení vedla ke vzniku rezistence patogena *S. sclerotiorum* k benzimidazolu (MBC). Rezistence kmenů *S. sclerotiorum* ke karbendazimu, jehož přednostmi je především účinnost a nižší cena, je rozšířena ve většině stěžejních oblastí pěstování řepky olejky od střední po severovýchodní části Francie (Penaud et al., 2003). Dále byla zjištěna rezistence v Číně, kde byl karbendazim používán proti této houbové chorobě od roku 1980 (Ma et al., 2009; Xu et al., 2015). Rezistentní populace *S. sclerotiorum* k benzomylu, který patří do stejné skupiny fungicidů, byly zjištěny v Kanadě (Gossen et al., 2001).

Účinné látky, jako je iprodion, viclozin nebo procymidon, které patří do jiné fungicidní skupiny - dikarboxymidy se středním až vysokým rizikem vzniku rezistence (FRAC, 2013), byly používány od poloviny sedmdesátých let 20. století a to hlavně proti houbám rodů *Botrytis*, *Sclerotinia* a *Monilinia*. Dikarboxymidy byly nahrazeny benzimidazolovými fungicidy, protože v mnoha případech již nebyly kvůli rezistenci účinné. První rezistentní kmeny byly zjištěny v laboratoři, později i na poli (Brent, Hollomon, 2007). Rezistence vůči iprodionu, účinné látce ze skupiny dikarboximidů, byla detekována u příbuzných druhů například *S. homoeocarpa*, *S. minor* nebo *Botrytis cinerea* (Zhou et al., 2014). Křížová rezistence k benzomylu a iprodionu byla zjištěna v Číně (Attanayake et al., 2013). Obecně v Číně, kde se ročně pěstuje více jak 7 milionů ha řepky olejky (Zhou et al., 2014), bylo nalezeno velké množství rezistentních mutantů *S. sclerotiorum*. Kmeny odolné vůči dimethachlonu (Zhou et al., 2014), fludioxonilu (Kuang et al., 2011) a boscalidu (Wang et al., 2015) byly většinou zjištěny v laboratorních podmínkách. Pozitivní křížová rezistence byla zjištěna mezi fludioxonilem a dikarboximidem, jež jsou považovány z hlediska vzniku rezistence za vysoce rizikové (Kuang et al., 2011).

Odstrčilová (2007) pracovala v laboratorních testech s izoláty patogena *S. sclerotiorum* z kmínu a hodnotila dynamiku růstu na plotnách otrávených fungicidy. Zjistila, že tvorba sklerocií nebyla přímo závislá na velikosti kolonie a na množství vytvořeného mycelia. První sklerocia se začala tvořit již po 72 hodinách po naočkování, a to u variant Rovral Flo (úč. I. iprodione), Topsin (úč. I.



thiophanate-methyl), Proline (úč. I. prothioconazole) a Amistar (úč. I. azoxystrobin). Na kontrole bez fungicidu se sklerocia začala tvořit za 120 hod a při ukončení pokusu byl jejich počet nejvyšší. Omezený počet sklerocií se vytvořil po 96 hodinách u varianty obsahující fungicid Capitan (úč. I. flusilazol) a do ukončení pokusu byl téměř neměnný. U variant obsahující fungicidy Boscalid (úč. I. boscalid) a Pictor (úč. I. boscalid, dimoxystrobin) se sklerocia začala tvořit po více než 140 hod. Jejich počet pak u varianty s obsahem Boscalidu rychle narůstal, ale u varianty s obsahem Pictoru byla tvorba pomalejší. U variant obsahující fungicidy Alert (úč. I. flusilazol, carbendazim), Bumper Super (úč. I. prochloraz, propiconazol) a Cerelux Plus (úč. I. flusilazol, fenpropimorph, dimetylmorfolin) se nevytvořila vůbec žádná sklerocia. Celková hmotnost vytvořených sklerocií se částečně odvíjela od jejich počtu. Nejvyšší hmotnost sklerocií byla u neošetřené kontroly a přípravku Proline. U ostatních variant se hmotnost sklerocií snižovala v tomto pořadí: Topsin, Amistar, Boscalid, Rovral Flo, Pictor a Capitan.

### **3.2.7 Rezistence patogenů *Leptosphaeria maculans*, *L. biglobosa* k fungicidům**

V dnešní době jsou nejčastěji používány proti *L. maculans* a *L. biglobosa* fungicidy ze skupiny DMI (inhibitory demethylace) – konkrétně triazoly např. účinná látka tebukonazole a metkonazole (Šaroun, 2008). Tato skupina je nejvíce ohrožena mechanismy rezistence, jako je zvýšené vylučování toxické látky, změna cílového místa, zvýšená poptávka po produktu cílového místa a nadprodukce proteinu cílového místa (Prokop, 2010). Podle výsledků pracovní skupiny zaměřené na azoly (FRAC, 2015), jsou triazoly hodnoceny středním rizikem vzniku rezistence.

Ve své práci testovala Hegebarth (2010) 140 kmenů izolátů *L. maculans* a *L. biglobosa* z různých míst Evropy k DMI fungicidům (de-methylační inhibitory). Testy citlivosti ukázaly, že patogen *L. biglobosa* vykazoval mírně vyšší citlivost ke všem testovaným DMI fungicidům než *L. maculans*. U obou druhů byly hodnoty EC<sub>50</sub> pro difekonazol a prochloraz nejnižší, následoval metkonazol a flusilazol, vyšší hodnoty ED<sub>50</sub> byly naměřeny pro tebukonazol a prothiokonazol. Rozptyl hodnot ED<sub>50</sub> byl podobný u obou druhů patogenů. Nejvyšší hodnoty ED<sub>50</sub> byly zjištěny u prothiokonazolu a tebukonazolu, následovaly flusilazol, metkonazol, prochloraz a difekonazol.

### **3.3 Monitoring rezistence a antirezistentní strategie**

Bittner (2016) shrnuje informace ze semináře IIRB v rakouském Frauenkirchenu k problematice řízení (managementu) rezistence:

Součástí antirezistentní strategie je:

- monitoring a predikce,
- minimalizovat počet fungicidních zásahů,
- střídat přípravky s různým mechanismem účinku,
- použití tank-mixů či hotových směsí fungicidů s různým mechanismem účinku je nutné, nepoužívat sólo účinné látky,
- použití správných dávek (velmi vysoké dávky fungicidů urychlují selekci rezistentních kmenů),
- neaplikovat opakovaně nízké a neúčinné dávky fungicidů,
- pokud je to možné použít „multi-site“ fungicidy (účinkují na více cílových místech patogenu), ale není jich bohužel dostatek.

Vznik rezistence vůči fungicidům je mnohdy zaviněn samotnými pěstiteli díky jejich nevhodnému používání výlučně rizikových fungicidů. Cena a účinnost fungicidního přípravku jsou pro pěstitele stále více rozhodující než riziko vzniku rezistence patogenů, protože užití managementu rezistence může být dražší a méně účinné, než užití samotného jediného fungicidu po celou sezónu. Přitom méně nákladné fungicidy jsou pravděpodobně mnohdy užívané intenzivněji, zatímco drahé přípravky jsou používány v redukováných dávkách nebo v delším časovém rozmezí. Praktický dopad chemických, biochemických, genetických a epidemiologických rizikových faktorů na vývoj rezistence záleží na podmínkách používání fungicidu. Pokud je výskyt patogena nízký, např. kvůli nepříznivým klimatickým podmínkám, aplikujeme fungicid také zřídka nebo rotačně či ve směsi s jinými typy fungicidů a používáme také nechemické způsoby ochrany. Pokud mohou plodiny z předcházející sezóny sloužit jako zdroj inokula pro následující plodiny, měl by být na následující plodiny použit jako první fungicid z jiné chemické skupiny, než jaký byl naposledy používán na předchozích plodinách (Jeřábková, 2010).

Systematické hodnocení všech potenciálních rizikových faktorů a podmínek, za kterých je fungicid používán jako např. míchání a střídání fungicidů, načasování jejich použití a četnost jejich používání, umožňuje stanovit stupeň rizika vzniku rezistence a příslušné strategie při používání ochranných přípravků (Brent, Hollomon, 2007).

## **Jak postupovat při podezření na výskyt rezistence**

Nižší účinnost, případně i selhání fungicidu může mít více příčin. Mohou to být nevhodný termín aplikace nebo nevhodně zvolený fungicid, nedostatečná intenzita ochrany za extrémního infekčního tlaku, nevhodné podmínky pro aplikaci nebo účinnost (nízké nebo vysoké teploty, dešťové srážky po aplikaci aj.), nekvalitní aplikace apod. Všechny tyto možnosti by měly být posouzeny a vyloučeny. Pokud trvá podezření na sníženou citlivost patogenu k rizikovému fungicidu, je třeba kontaktovat zástupce držitele rozhodnutí o registraci a dohodnout odběry vzorků pro laboratorní testy citlivosti patogenu (Ackermann, 2013).

## **3.4 Výsledky získané během řešení projektu**

### **3.4.1 Testování rezistence patogena *S. sclerotiorum* k fungicidům**

Na pracovištích v Opavě a Šumperku bylo celkem v letech 2013–2015 testováno 42 izolátů patogenu *S. sclerotiorum* vůči vybraným fungicidům Horizon 250 EW, Pictor a Efilor. Testy byly provedeny na otrávených plotnách živného média s různou koncentrací fungicidu. Byla vyhodnocena inhibice růstu testovaných izolátů k vybraným fungicidům v základní koncentrační řadě (0,2; 0,4; 0,8 a 1,6 % fungicidu), která byla odvozena od registrované dávky přípravku Horizon 250 EW (1 l/ha). Pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) testovaných izolátů *S. sclerotiorum* byla koncentrační řada rozšířena o koncentrace: 0,1; 0,01; 0,0125; 0,00625; 0,003125; 0,0015625 %.

Z hodnocení vlivu na inhibici růstu mycelia vyplynulo, že u přípravku Efilor, Pictor a Propulse nebyly pozorovány velké rozdíly mezi izoláty, zatímco u fungicidů Horizon 250 EW a Prosaro 250 EC byly zaznamenány významné rozdíly mezi izoláty. U fungicidu Horizon 250 EW byl zaznamenán větší rozptyl mezi izoláty (cca 30 %) u koncentrace 0,01 %, 0,003125 % a u fungicidu Efilor koncentrace 0,003125 %.

Žádný z testovaných izolátů patogenu *S. sclerotiorum* nevykazoval sníženou citlivost vůči testovaným fungicidům (Horizon 250 EW, Efilor a Pictor) v základní testovací koncentrační řadě. U testovaných izolátů patogenu *S. sclerotiorum* byla stanovena minimální inhibiční koncentrace fungicidu Horizon 250 EW při koncentraci 0,1 %, u fungicidu Efilor byla stanovena při

koncentraci vyšší než 0,0125 %, u fungicidu Pictor byla stanovena při koncentraci 0,00625 %.

Tabulka 1: Stanovené hodnoty MIC testovaných kmenů *S. sclerotiorum* k jednotlivým fungicidům

Fungicid	MIC (%)	MIC ( $\mu$ l/ml)
Horizon 250 EW	0,1	1
Efilor	<0,0125	<0,125
Pictor	0,00625	0,0625

Na pracovišti ČZU bylo detailně pracováno s 15 izoláty. Byla hodnocena inhibice růstu a počet sklerocií. Pro testování citlivosti izolátů *S. sclerotiorum* byla využita stejná metodika a základní koncentrace fungicidů jako na pracovištích v Opavě a Šumperku a ty byly dále rozšířeny o koncentraci 0,000390625 % u přípravku Pictor. Otestováno bylo 5 fungicidů – Horizon, Pictor, Efilor, Propulse a Prosaro 250 EC.

Pro testování fungicidu Horizon 250 EW byly založeny 3 série testů. V první sérii testů nebyl v koncentracích vycházejících z polních dávek používaných v praxi (1,6; 0,8; 0,4; a 0,2 %) zaznamenán růst mycelia u žádného izolátu. Jednalo se o 100% inhibici růstu mycelia. V druhé sérii testů nebyl u koncentrace 0,1 % zaznamenán růst mycelia u žádného izolátu. U 0,05 % koncentrace přípravku inhibice růstu mycelia činila u dvou izolátů 90,2 % a 93,73 %, zatímco u zbylých 13 izolátů činila inhibice opět 100 %. U koncentrace 0,025 % to bylo obdobné, jen s tím rozdílem, že mycelium *S. sclerotiorum* narostlo u jiných izolátů. U nejnižší koncentrace byl zaznamenán růst mycelia u 9 izolátů, inhibice se pohybovala v rozmezí 79,61–98,43 %. V 3. sérii testů narostlo mycelium *S. sclerotiorum* u izolátů pocházejících ze všech lokalit. U nejvyšší koncentrace (0,00625 %) se pohybovala inhibice v širokém rozmezí 7,25 – 80,98 %, z čehož vyplývá rozdílnost mezi jednotlivými izoláty. U koncentrace 0,003125 % a 0,0015625 % se objevily 2 případy, kdy inhibice činila 0 %. U nejnižší koncentrace 0,0007813 byla zaznamenána 0 % inhibice u 2 izolátů.

U fungicidu Efilor se s postupným snižováním koncentrace mírně zvyšoval průměrný počet sklerocií. 100 % inhibice růstu mycelia byla pozorována

u koncentrace 0,0125 % u čtyř izolátů, zatímco 0 % inhibice nebyla zaznamenána. Nejnižší hodnota inhibice byla 3,73 % u jednoho izolátu *S. sclerotiorum*.

V laboratorních testech s přípravkem Propulse byl pozorován zvyšující se počet sklerocií a to nepřímo úměrně s koncentrací přípravku. Nejvyšší hodnota inhibice růstu mycelia byla pozorována u izolátů z lokality Černuc a činila 97,25 % u koncentrace 0,0125 %, zatímco nejnižší hodnota inhibice 0,0 % byla zaznamenána u jednoho izolátu (koncentrace 0,0015625 %).

Průměrný počet sklerocií se opět zvyšoval se snižováním koncentrace přípravku Prosaro. Tento přípravek vykazoval vysokou účinnost i v koncentraci 0,0125 %, kdy jen u jednoho izolátu činila inhibice 93,92 %, zatímco u ostatních byla 100 %. Nejnižší hodnota inhibice byla pozorována u koncentrace 0,0015625 % u jednoho izolátu a rovnala se 6,47 %.

Fungicid Pictor byl nejúčinnější z vybraných přípravků, proto byla jeho původní koncentrace dvakrát snižována. Tento přípravek vykazoval vysokou účinnost i v koncentracích 0,0625 %, 0,003125 %, 0,00078125 % a 0,000390625 %, zatímco u fungicidů Horizon 250 EW, Efilor, Prosaro 250 EC a Propulse se účinnost výrazně snižovala od koncentrace 0,0625 %. Nejnižší hodnota inhibice byla zaznamenána u jednoho izolátu koncentrace 0,000390625 % a rovnala se 51,57 %.

Tabulka 2: Stanovené hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) testovaných kmenů *S. sclerotiorum* k jednotlivým fungicidům, ČZU Praha

Fungicid	MIC (%)	MIC ( $\mu$ l/ml)
Horizon 250 EW	0,025	0,25
Efilor	<0,0125	<0,125
Propulse	<0,0125	<0,125
Prosaro 250 EC	0,0125	0,125
Pictor	0,0015625	0,015625

### 3.4.2 Testování rezistence patogenů *Leptosphaeria maculans* a *L. biglobosa* k fungicidům

Pro stanovení citlivosti patogenů *L. maculans* a *L. biglobosa* bylo vybráno 5 fungicidů: Horizon 250 EW (úč. l. tebukonazol), Efilor (ú. l. metkonazol, boskalid), Pictor (ú. l. dimoxystrobin, boskalid), Propulse (ú. l. prothiokonazol, fluopyram) a Prosaro 250 EC (ú. l. tebukonazol, prothiokonazol). Nejvíce testů citlivosti bylo provedeno s přípravkem Horizon 250 EW. U tohoto přípravku byly nastaveny testované koncentrace. Výchozí koncentrace vycházely z dávky přípravku a jeho koncentrace v postřikové jíše. Na základě zjištění 100% inhibice růstu patogenů byly pro stanovení MIC do testování zařazeny nižší koncentrace vybraných přípravků.

Bylo pracováno s izoláty *L. biglobosa* a *L. maculans*. Již od prvních testů bylo patrné, že mezi nimi existují mírné rozdíly v mycelárním růstu a citlivosti k fungicidům. Mycelium izolátů *L. biglobosa* rostlo rychleji, ale vykazovalo naprosto odlišnou strukturu a nevytvářelo hustý povlak po celé ploše Petriho misky. Izoláty *L. maculans* sice rostly o něco pomaleji, ale již na první pohled bylo zřejmé, že je jejich mycelium hustější a silnější.

U 7 izolátů bylo provedeno detailnější srovnání citlivosti:

Srovnáním citlivosti izolátů k fungicidu Horizon 250 EW při jednotlivých koncentracích bylo zjištěno, že od MIC 0,0125 % pro většinu izolátů se citlivost patogenů k fungicidní účinné látce tebuconazole rychle snižovala.

Srovnáním citlivosti izolátů k fungicidu Efilor při jednotlivých koncentracích bylo možné sledovat, že u přípravku Efilor byla zaznamenána menší citlivost izolátů již při koncentraci 0,0125 % (průměrná inhibice růstu všech izolátů byla 92,86 %) oproti ostatním přípravkům. Při testování dalších koncentrací již nedocházelo k tak prudkému poklesu citlivosti jako u přípravku Horizon 250 EW a jeho inhibiční schopnosti byly vyrovnané.

Srovnáním citlivosti izolátů k fungicidu Pictor při jednotlivých koncentracích byla inhibiční schopnost přípravku Pictor podle výsledků nejvyšší ze všech zkoušených přípravků. Růst mycelia byl pozorován od koncentrace 0,003125 % a s dalšími koncentracemi se postupně citlivost patogenů snižovala. Přesto pokles citlivosti nebyl tak prudký jako u přípravků Horizon či Efilor.

Srovnáním citlivosti izolátů k fungicidu Propulse při jednotlivých koncentracích byla citlivost hodnocena jako relativně vysoká. Její pokles vzhledem ke snižujícím koncentracím byl nižší než u přípravků Horizon či Efilor,

ale vyšší než u fungicidu Pictor. Při testování přípravku Prosaro 250 EC byl zaznamenán kromě jednoho izolátu (V1/12) nárůst mycelia již při první použité koncentraci 0,0125 %. MIC pro tento izolát V1/12 byla stanovena na 0,0125 %, ostatní izoláty měly pravděpodobné MIC ve vyšších koncentracích a to mezi koncentracemi 0,0125 % a 0,025 %.

Srovnáním citlivosti všech izolátů k fungicidu Prosaro 250 EC při jednotlivých koncentracích byla citlivost vzhledem k ostatním přípravkům průměrná. Při koncentraci 0,0125 % došlo kromě jednoho izolátu vždy k nepatrnému nárůstu mycelia. Pokles inhibiční schopnosti přípravku Prosaro byl prudší než u fungicidu Propulse.

Z dalšího šetření bylo prokázáno, že při koncentraci 0,00625 % vykazovaly izoláty nejnižší citlivost k přípravku Horizon 250 EW, po něm k Efiloru. Inhibiční schopnosti fungicidů Pictor, Propulse a Prosaro 250 EC je možno hodnotit jako relativně vyrovnané, přesto nejlepšího výsledku dosáhl fungicid Pictor.

Hledání MIC ukázalo, že u přípravku Horizon 250 EW byla stanovena na 0,0125 %. U přípravku Efilor byl u koncentrace 0,0125 % zaznamenán nárůst mycelia u všech izolátů. MIC u tohoto přípravku se pohybovala mezi koncentracemi 0,0125 % a 0,0250 %. Podobné výsledky byly zjištěny i u fungicidů Propulse a Prosaro 250 EC, kde pouze u jednoho izolátu byla stanovena MIC na 0,0125 %. U přípravku Pictor byly jako MIC určeny nižší hodnoty a to koncentrace 0,0015625 % a 0,003125 % (ČZU Praha).

## Souhrn

Z uvedených výsledků vyplývá, že v rámci provedeného průzkumu byly na území ČR z konkrétních lokalit získány izoláty patogenů *Sclerotinia sclerotiorum*, *Leptosphaeria maculans* a *L. biglobosa* s vysokou citlivostí k testovaným koncentracím fungicidů Horizon 250 EW, Efilor, Pictor, Propulse a Prosaro 250 EC. Pro stanovení MIC byly využity nižší koncentrace fungicidů, než je registrovaná dávka na 1 ha. Rozdílná citlivost byla zaznamenávána v závislosti na fungicidu až u koncentrací nižších než 0,025 %. Zatím tedy nelze tuto variabilitu v citlivosti vůči testovaným fungicidům hodnotit jako rezistenci. Nelze ji však podcenit a je nutné dodržovat zásady antirezistentní strategie v používání fungicidů v polních plodinách.

### **3.5 Vlastní metoda hodnocení citlivosti patogenů k fungicidům**

#### **3.5.1 Izolace patogena *S. sclerotiorum* a příprava na testování rezistence**

Zdrojem pro získání čisté kultury patogena *S. sclerotiorum* jsou sklerocia získaná z pletiv napadených částí rostlin (stonek, kořenový krček). Všechny kroky týkající se získání čisté kultury patogena a samotných testů rezistence provádíme ve sterilních podmínkách laminárního boxu. Sklerocia patogena *S. sclerotiorum* před samotnou kultivací sterilizujeme v 30% roztoku SAVO po dobu 3 minut, opláchneme třikrát ve sterilizované vodě a po té necháme usušit na sterilním filtračním papíru. Každé sklerocium samostatně umístíme do středu plastové či skleněné Petriho misky (průměr 9 cm) na čistou živnou půdu PDA (bramboro-dextrózový agar – Potato Dextrose Agar). PDA připravíme dle návodu výrobce (např. HIMEDIA). Na misky uvedeme identifikaci patogena.

Sklerocia inkubujeme 3 až 5 dnů při laboratorní teplotě ve tmě a následně odebereme terčíky mycelia z okrajů narostlé kultury patogena, které přeočkujeme na nové živné médium. V případě kontaminace, které se často objevují u déle skladovaných sklerocií, mycelium patogena přeočkováváme tak dlouho, dokud nezískáme jeho čistou kulturu. Máme-li problémy s bakteriálními kontaminacemi, můžeme při izolaci patogena použít některé z antibiotik (chloramfenikol, tetracyklin v koncentraci 100 µg/ml agaru), které přidáme do zchlazeného živného média.

#### **3.5.2 Izolace patogenů *L. maculans* a *L. biglobosa* a příprava na testování rezistence**

Pro izolaci patogenů *Leptosphaeria spp.* použijeme infikované listy řepky olejky. Z listového pletiva vystříháme části s typickými skvrnami, na kterých jsou patrné pyknidy. Ty povrchově sterilizujeme v 20% roztoku SAVO po dobu 3 minut a třikrát opláchneme v destilované vodě. Poté pletivo osušíme na sterilním filtračním papíru a skvrnu s pyknidami vložíme do vlhké komůrky (Petriho miska se třemi vrstvami navlhčeného filtračního papíru), aby bylo podpořeno zrání pyknid. Po dvou dnech inkubace při teplotě 20 °C přemístíme jednu pyknidu (monopyknidiální izolace) nebo uvolněný sorus pykno spor ze skvrny pomocí sterilní jehly na živnou půdu (PDA nebo V8 juice agar) v Petriho miskách. V tomto kroku pracujeme v laminárním boxu, kde máme umístěný stereomikroskop, s jehož pomocí odebíráme jednotlivé pyknidy. Každou Petriho misku podél spoje



zabalíme pomocí parafilmové pásky a popíšeme označením izolátu a datem. Izoláty kultivujeme v termostatu při teplotě cca 20 °C. Po nárůstu mycelia z pyknid izoláty přeočkujeme. Pomocí očkovací jehly ožehnuté nad plamenem přeneseme část mycelia z izolátu na povrch agarů v Petriho misce. Každou Petriho misku ošetříme stejně jako u izolace parafilmovou páskou a popíšeme. Izoláty opět kultivujeme při teplotě cca 20 °C. Za 4 až 21 dní po nárůstu mycelia izoláty můžeme použít k testování. Dlouhodobě lze izoláty uchovávat v chladničce při teplotě 8 °C.

### 3.5.3 Příprava otrávených ploten živného média

Pevnou živnou půdu PDA připravíme podle návodu, suspendováním 39 g PDA (výrobce) v 1000 ml destilované vody, po té sterilizujeme v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut a ochladíme na 50 °C. Živnou půdu bez obsahu fungicidu využijeme jako kontrolní variantu.

Příprava 1 l V8 juice agarů pro testy citlivosti patogena *Leptosphaeria* spp: Smícháme 800 ml destilované vody a 200 ml V8 džusu (zeleninový džus). Navážíme 0,75 g CaCO<sub>3</sub> a přidáme do roztoku. Jelikož se CaCO<sub>3</sub> špatně rozpouští, použijeme magnetické míchadlo a po dobu 15 minut směs na magnetické míchačce mícháme. K promíchané směsi přidáme 15 g agarů. Hotovou směs sterilizujeme po dobu 15 minut při teplotě 121 °C. Živnou půdu ponecháme samovolně vychladnout či ochladíme na cca 50 °C.

Po vychladnutí pipetujeme do agarů vypočtené množství fungicidního přípravku tak, abychom získali potřebnou koncentraci fungicidu, a promícháme.

Na 1 Petriho misku o průměru 9 cm nalijeme 20 – 25 ml živné půdy (PDA, V8) bez fungicidu nebo živné půdy s přidaným fungicidem. Každou Petriho misku označíme danou koncentrací, testy provádíme ve třech opakováních. Celkový počet hodnocených členů musí splňovat podmínky pro vypovídací schopnost testů.

K rozpuštění testovaných fungicidů můžeme použít DMSO (dimethylsulfoxid). V případě testování fungicidů tento krok není nutný, protože fungicidy jsou zpravidla dobře rozpustné ve vodě. V testech citlivosti musí být dodržen jednotný postup z důvodu vzájemné srovnatelnosti testů. Proto je nutné vynechání tohoto kroku zhodnotit na počátku zakládání sérií jednotlivých testů.

## Stanovení výchozích koncentrací

Na základě screeningového testu si stanovíme výchozí koncentrace. Výchozí koncentrace se odvíjejí z koncentrace registrované dávky testovaného přípravku v postřikové jíše.

## Hodnocení úrovně citlivosti patogenů k fungicidům

K posouzení úrovně citlivosti testovaných izolátů *S. sclerotiorum* průběžně zaznamenáváme radiální růst mycelia patogenu (cm) u všech testovaných koncentrací, dokud mycelium neošetřené kontroly zcela nepokryje plochu Petriho misky.

K posouzení úrovně citlivosti testovaných izolátů *L. maculans*, *L. biglobosa* odečet růstu mycelia provádíme v intervalu 14 až 30 dní po očkování. Ve srovnání s patogenem *S. sclerotiorum* je u těchto patogenů růst mycelia pomalejší. Proto jsou testy zakládány na V8. V případě, že použijeme živnou půdu PDA, je růst patogena ještě pomalejší. Vyhodnocení potom provádíme do 30 dní od očkování bez ohledu na velikost mycelia na kontrole bez fungicidu. U těchto patogenů odečítáme průměry narostlého mycelia vždy v kříži (kolmo na sebe) a tyto dvě hodnoty pro každé opakování zprůměrujeme.

Výsledky testů citlivosti nafotíme pro následnou dokumentaci.

Procento inhibice růstu patogenů (I) pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) vypočteme dle vzorce (Pandey et al. 1982):

$$I (\%) = \left[ \frac{\text{průměr na kontrole} - \text{průměr na testované koncentraci}}{\text{průměr na kontrole}} \right] \times 100.$$

Pro výpočet je možné použít také vzorec:

$$I = \{100 - [(dcp/dk) \times 100]\},$$

kde I – inhibice vyjádřená v procentech, dcp – průměr opakování na testovanou koncentraci a dk – průměr kontroly (Šromová 2015).

### 3.5.4 Materiál a přístrojové vybavení

#### Odběry rostlinných vzorků s příznaky napadení

- zahradnické nůžky, nůž, malý rýč na odběr rostlin,
- vzorky rostlin řepky s příznaky napadení patogenem, sklerocia patogena,
- sáčky, vzorkovnice na uložení čerstvě odebraných vzorků,
- datum a místo sběru: kraj, okres, katastr, GPS souřadnice,
- informace o fungicidním ošetření během vegetace plodiny, ze které byly odebírány vzorky,

#### Izolace patogena

- vzorky rostlin řepky s příznaky napadení,
- skalpely, preparační jehly, pinzety, nůžky,
- Petriho misky, parafilm,
- pevná živná půda PDA (Potato Dextrose Agar),
- V8 juice, CaCO<sub>3</sub> (uhličitan vápenatý), agar
- destilovaná voda,
- dezinfekční roztoky:
  - sterilizace sklerocií: SAVO,
  - sterilizace nástrojů: denaturovaný líh,
  - sterilizace povrchů: Incidin Liquid (Ecolab),
- čisté prostředí: samostatná místnost/oddělený prostor,
  - germicidní lampa, aseptický (laminární) box,
- termostat.

#### Testování citlivosti k fungicidům

- izoláty patogena:
  - čisté kultury patogenů *S. sclerotiorum*, *L. maculans*,  
*L. biglobosa*
- testované fungicidy,
- pevná živná půda PDA (Potato Dextrose Agar), V8 jiice agar
- Petriho misky o průměru 9 cm, parafilm
- sterilní prostředí,
- očkovací jehly pro odběr mycelia patogena,
- termostat
- měření růstu patogena: pravítko nebo posuvné měřítko s digitální stupnicí,

- prosvětlovací deska pro prosvětlení Petriho misky s izolátem pro stanovení okraje růstu patogena,
- formulář a psací potřeby pro záznam změřených hodnot,
- fotoaparát pro fotodokumentaci.

#### Zpracování výsledků testování citlivosti patogenů k fungicidům

- PC s vhodným softwarem (např. Microsoft Office, Statistica),
- psací potřeby,
- kalkulačka.

#### 4 Srovnání novosti postupů

V ČR dosud nebyla k dispozici česky psaná metodika hodnocení citlivosti rezistence patogenů *Sclerotinia sclerotiorum*, *Leptosphaeria maculans* a *L. biglobosa* k fungicidům. Metoda hodnocení rezistence patogenů k fungicidům byla zpracována na základě zahraničních a českých publikací a vlastních poznatků. Byl vypracován postup pro stanovení výchozí koncentrační řady testování rezistence patogenů k fungicidům. V metodice jsou uvedeny první poznatky o citlivosti sledovaných patogenů k fungicidům, jejichž izoláty byly získány v ČR. Jedná se o nové poznatky v rámci České republiky. Získané poznatky je možné využít v rámci antirezistentní strategie pro používání fungicidů proti původcům významných chorob řepky olejky a to bílé hnilobě řepky a fomovému černání stonků řepky. Na základě ověřené metody popsané v této metodice je možné tyto poznatky nadále rozšiřovat a ověřovat úroveň rezistence patogenů k fungicidům a na základě těchto informací výhledově eliminovat neefektivní aplikace fungicidních přípravků na ochranu řepky olejky.

## 5 Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika je primárně určena orgánům státní správy (ÚKZÚZ) a organizacím pověřeným k výkonu odborných činností pro provádění monitoringu rezistence významných patogenů řepky olejky k fungicidům, dále výzkumným a poradenským organizacím, které se zabývají monitorováním rezistence vybraných houbových patogenů. Metodiku je možné také uplatnit u dalších hostitelských plodin patogenů např. slunečnice, luskoviny, mák, kmín, zeleniny a další. Získané výsledky je možné uplatnit:

- pro účely postregistrační kontroly fungicidů vyplývající ze zákona o rostlinolékařské péči,
- v integrované ochraně rostlin,
- upřesnění antirezistentní strategie pro konkrétní oblast pěstování řepky olejky a dalších hostitelských plodin sledovaných patogenů *S. sclerotiorum*, *L. maculans* a *L. biglobosa*.

Metodika bude dostupná v elektronické podobě na webových stránkách ÚKZÚZ a na pracovištích autorů, kteří ji budou poskytovat zájemcům v rámci prezentace pracovišť.

## 6 Ekonomické aspekty spojené s uplatněním metodiky

Monitoring citlivosti patogenů *S. sclerotiorum*, *L. maculans* a *L. biglobosa* k fungicidům bude spojen s více náklady, které budou v závislosti na způsobu financování pokryty z veřejných nebo neveřejných zdrojů, respektive jejich kombinací. Výše nákladů se bude odvíjet od rozsahu prováděné činnosti.

V případě zjištění nízké účinnosti fungicidu v polních podmínkách metodika nabízí postup, na jehož základě je možné ověřit, zda se jedná o sníženou citlivost patogenu k fungicidům, nebo zda je příčinou např. nevhodný termín ošetření respektive chyba v aplikaci. V závislosti na patogenu jsou po získání jeho čisté kultury k dispozici první výsledky do 14 dnů od založení testu. Zjištění snížené citlivosti patogenu ke konkrétnímu fungicidu na dané lokalitě umožňuje jeho vyloučení z aplikace a použití fungicidu s dostatečnou účinností. Tím se vyloučí použití neefektivního a neekonomického zásahu proti houbovým patogenům. V dlouhodobých pokusech bylo v případě silného infekčního tlaku houbových patogenů docíleno navýšení výnosů dle zvoleného fungicidu mezi 5 až 30 procenty. To znamená, že při průměrném výnosu 3 t/1 ha v zemědělském podniku, který pěstuje řepku na 200 ha, je reálný předpoklad, že při výkupní ceně 9 tisíc Kč řepky za 1 t může dojít při zvolení fungicidu s vysokou účinností (navýšení výnosu 30 %) k zvýšení tržeb až o 1.620 tisíc Kč. To je ve srovnání s aplikací fungicidu s nízkou účinností (navýšení výnosu 5 %) o 1.350 tisíc Kč více.

## 7 Seznam použité související literatury

- Ackermann P. 2013. Problematika rezistence oomycet a houbových patogenů révy k fungicidům a antirezistentní strategie. [http://www.ekovin.cz/uploads/Soubory/rezistence\\_2013\\_11\\_03.pdf](http://www.ekovin.cz/uploads/Soubory/rezistence_2013_11_03.pdf)
- Attanayake R.N., Carter P.A., Jiang D., del Río-Mendoza L., Chen W. 2013. *Sclerotinia sclerotiorum* populations infecting canola from China and the United States are genetically and phenotypically distinct. *Phytopathology* 103 (7): 750–761.
- Bittner F., Chalupný K., Chochola J. 2016. Management rezistence u cukrové řepy, 2. část. LISTY CUKROVARNICKÉ a ŘEPAŘSKÉ. 64 LCaŘ 132, č. 2, únor 2016. ([http://www.cukr-listy.cz/on\\_line/2016/PDF/64-66.pdf](http://www.cukr-listy.cz/on_line/2016/PDF/64-66.pdf))
- Brent K.J., Hollomon D.W. 2007. Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How Can it be Managed? Fungicide Resistance Action Committee, Brussels, Belgium, 56 pp.
- FRAC, 2013. Pathogen risk list. Fungicidal Resistance Action Committee. [online]. [2016-07-06] <<http://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/pathogen-risk-list.pdf?sfvrsn=8>>
- Gossen B.D., Rimmer S.R., Holley J.D. 2001. First report of resistance to benomyl fungicide in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* 85 (11): 1206.
- Hoffmann G. M., Schmutterer H. 1999. Parasitäre Krankheiten und Schädlinge an landwirtschaftlichen Kulturpflanzen. 2.erweiterte und ergänzte Auflage. Verlag Eugen Ulmer. 71 Stuttgart. 675 s.
- Jędryczka M., Kaczmarek J., Czernichowski J. 2006. Development of a decision support system for kontrol of stem canker of oilseed rape in Poland. *IOBC/wprs Bulletin*. 29 (7). 269 – 278.
- Jeřábková H. 2010. Rezistence k fungicidům v populaci padlí tykvovitých v České republice. Diplomová práce. Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci. s. 84. (<http://theses.cz/id/yu8dsk/77181-675718914.pdf>)
- Kaczmarek J., Jędryczka M. 2011. Characterization of two coexisting patogen populations of *Leptosphaeria* spp., the cause of stem tanker of Brassicas. *Acta Agrobotanica*. 64 (2). 3 – 14.
- Kuang J., Hou Y. P., Wang J. X., Zhou M. G. 2011. Sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* to fludioxonil: in vitro determination of baseline sensitivity and resistance risk. *Crop Protection*, 30(7), 876-882.



Ma H. X., Chen Y., Wang J. X., Yu W. Y., Tang Z. H., Chen C. J., Zhou M.G. 2009. Activity of carbendazim, dimethachlon, iprodione, procymidone and boscalid against *Sclerotinia* stem rot in Jiangsu province of China. *Phytoparasitica* 37 (5): 421–429.

MA Z.; MICHAELIDES T. J. (2005): Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*. 24: 853–863.

Pandey D. K., Tripathi N.N., Tripathi R.D., Dixit S.N. 1982. Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheit und Pflanzenschutz* 89 (6): 344–349.

Penaud A., Huguet B., Wilson V., Leroux P. 2003. Fungicide resistance of *Sclerotinia sclerotiorum* in French oilseed rape crops. In *Proceedings of 11th International Rapeseed Congress*. Pp. 6-10

Prokop M. 2010. Výskyt rezistence houbových patogenů vůči fungicidním účinným látkám, mechanismy, rizika vzniku a ovlivňující faktory. *Rostlinolékař*. 21 (5). 30 – 33.

Shoemaker R. A., Brun H. 2001. The teleomorph of the weakly aggressive segregate of *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Botany*. 79. 412 – 419.

Šaroun J. 2008. Ochrana fungicidy a regulace růstu. *Zemědělec* [online]. 15. února 2008. [cit. 2015-2-07]. Dostupné z <<http://zemedelec.cz/ochrana-fungicidy-a-regulace-rustu/>>.

Toscano–Underwood C., Huang Y. J., Fitt B. D. L., Hall A. M. 2003. Effects of temperature on maturation of pseudothecia of *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* on oilseed rape stem debris. *Plant Pathology*. 52. 726 – 736.

Wang Y, Duan YB, Zhou MG. 2015. Molecular and biochemical characterization of boscalid resistance in laboratory mutants of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology*, 64: 101–108. doi: 10.1111/ppa.12246

Williams P. H. 1992. Biology of *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 14. 30 – 35.

Xu D, Pan Y, Zhang H, Li X, Dai Y, Cao S, Gao Z. 2015. Detection and characterization of carbendazim resistance in *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from oilseed rape in Anhui Province of China. *Genet. Mol Res*. 11; 14(4): 16627 - 38. doi: 10.4238/2015.December.11.10.

Zhou F., Zhang X. L., Li J. L., Zhu, F. X. 2014. Dimethachlon resistance in *Sclerotinia sclerotiorum* in China. *Plant Dis*. 98:1221-1226.

## 8 Seznam publikací, které předcházely metodice

Plachká, E. 2015: Ochrana řepky proti houbovým chorobám na jaře. Agrotip 3/2015. BASF spol. s r.o., 40 s., s. 10-11.

Poslušná, J., Plachká E. 2015. Testování citlivosti patogenů *Leptosphaeria* spp. a *Sclerotinia sclerotiorum* vůči vybraným fungicidům. In. Sborník abstraktů. XX. Česká a slovenská konference o ochraně rostlin. Praha, 1. – 3. září 2015. Str. 73.

Poslušná, J., Plachká, E. 2015. Testování citlivosti *Sclerotinia sclerotiorum* vůči vybraným fungicidům do řepky. Úroda 12/2015, vědecká příloha časopisu. 207-210 ISSN 0139-6013

Ručková, J., 2015: Stanovení citlivosti patogenů *Leptosphaeria maculans* a *L. biglobosa* k vybraným fungicidům. Diplomová práce. Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Katedra ochrany rostlin. 2015 ČZU v Praze. S. 86.

Šromová, M., 2015: Stanovení citlivosti patogena *Sclerotinia sclerotiorum* k vybraným fungicidům. Diplomová práce. Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Katedra ochrany rostlin. 2015 ČZU v Praze. S. 95.



