

CHARAKTERIZACE POPULACÍ PATOGENA *VENTURIA INAEQUALIS* V PRODUKČNÍCH VÝSADBÁCH JABLONÍ V ČESKÉ REPUBLICE

Characterisation of *Venturia inaequalis* populations in commercial apple orchards in the Czech Republic

Vávra R.¹, Sedlák P.², Vejl P.², Boček S.³, Kloutvorová J.¹

¹Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.

²Česká zemědělská univerzita v Praze

³Mendelova univerzita v Brně

Abstrakt

Cílem práce byla charakterizace populací houby *Venturia inaequalis* v produkčních výsadbách jabloní v ČR spojená s virulencí ke genu *Rvi6* (*Vf*) a s rezistencí ke strobilurinovým fungicidům způsobenou mutacemi genu pro mitochondriální cytochrom b, optimalizace postupů izolace patogena z listů a následných kultivací izolátů v *in vitro* podmínkách. Prolomení rezistence genu *Rvi6* bylo potvrzeno v produkčních jabloňových sadech na 10 lokalitách, sporulující léze strupovitosti jabloně byly zjištěny u českých odrůd Florina, Goldstar, Melodie, Otava, Rajka, Rosana, Rubinola, Selena a Topaz. Bylo získáno více než 150 izolátů *V. inaequalis* pro účely genetických analýz. Mutace G143A exonu 4 v genu mitochondriálního cytochromu b byla detekována v 75 izolátech. Jeden izolát vykázal současně virulenci ke genu *Rvi6* a mutaci G143A.

Klíčová slova: rasy patogena *V. inaequalis*, QoI rezistence, gen *Rvi6*, rezistence k fungicidům

Abstract

The aim of this work was characterization of populations of *Venturia inaequalis* in commercial apple orchards in the Czech Republic related to *Rvi6* (*Vf*) gene virulence and related to strobilurine fungicides resistance caused by mutations of mitochondrial cytochrom b gene, optimization of methods of pathogen isolation from leaves and its subsequent cultivation *in vitro* conditions. Breaking the *Rvi6* gene resistance was confirmed in the commercial apple orchards in 10 localities, sporulating scab lesions were detected at Czech varieties Florina, Goldstar, Melodie, Otava, Rajka, Rosana, Rubinola, Selena, Topaz and Vanda. Over 150 isolates for purpose of genetic analysis were obtained. The G134A mutation of exon 4 in the fungal mitochondrial cytochrome b gene was detected in 75 isolates. One isolate showed both the *Rvi6* gene virulence and the G143A mutation.

Key words: races of *V. inaequalis*, QoI resistance, *Rvi6* gene, fungicide resistance

Úvod

Choroba strupovitost jabloně vyvolávaná houbou *Venturia inaequalis* přitahuje z různých důvodů pozornost pěstitelů, konzumentů, výzkumných pracovníků a šlechtitelů již více než jedno století. Konzumenti požadují jablka bez poškození strupovitostí, pěstitelé se snaží vyhnout napadení stromů a plodů a potýkají se s účinným a finančně dostupným způsobem ochrany k této chorobě. Výzkumníci a šlechtitelé jsou postaveni před úkol najít dokonalou a trvalou ochranu. Produkce jablek, jednoho z nejvíce pěstovaného ovocného druhu mírného klimatického pásma, je v současné době závislá z velké části na chemické ochraně. Vyšlechtění a pěstování odrůd jabloní rezistentních k houbě *V. inaequalis* se jeví jako možné východisko a v druhé polovině 19. století nastal velký rozvoj šlechtění jabloní na rezistenci ke strupovitosti. Zjistilo se, že ačkoliv rod *Malus* je hlavním hostitelem patogena

vyvolávajícího strupovitost jabloně, ne všechny druhy jsou jím napadány. Několik divoce rostoucích druhů zůstávalo imunní a u několika druhů míra náchylnosti dosahovala v určitých podmínkách polní rezistenci (Williams a Kuc, 1969). Geneticky podmíněná rezistence jabloně založená na účinku jednoho genu je patogenem překonávána vytvářením nových ras (Parisi et al., 1993; Roberts a Crute, 1994; Bénaouf a Parisi 2000; Bus et al. 2005). Tyto rasy jsou schopné překonávat imunitu i u divoce rostoucích druhů rodu *Malus*. Odolnost komerčních odrůd se mění v čase. Jako příklad je uváděna odrůda Golden Delicious. Ta byla na počátku 19. století považována za středně odolnou ke strupovitosti jabloně, v současné době je hodnocena jako náchylná (Sierotzki a kol., 1994). Již v roce 1899 Aderhold pozoroval, že rezistence jedné odrůdy je variabilní v různých lokalitách a je tedy závislá na interakci dané odrůdy a konkrétního prostředí (Aderhold, 1899). Následné výzkumy toto pozorování potvrdily a ukázaly, že konkrétní populace patogena silněji napadá odrůdu, ze které pochází (Sierotzki, 1994). Rasou jsou označovány skupiny izolátů charakteristické schopností či neschopností sporulovat na souboru hostitelů s určitým genotypem, tzv. indikačním souboru. V současné době je v literatuře popsáno 8 ras patogena *V. inaequalis*, z toho u šesti ras byl poprvé výskyt zaznamenán mimo Evropu. V západní Evropě se objevily dvě rasy patogena *V. inaequalis* překonávající *Rvi6 (Vf)* rezistenci. Rasa 6 byla poprvé popsána v Německu (Parisi et al., 1993), rasa 7 se rozšiřuje z Anglie (Roberts a Crute, 1994). Obě tyto rasy překonávající rezistenci získanou z *M. floribunda* klon 821 jsou nyní rozšířeny v zemích Evropy (Bénaouf a Parisi, 2000; Parisi a Lespinasse, 1996). V České republice bylo zaznamenáno překonání rezistence *Rvi6 (Vf)* genu poprvé v roce 2006 (Blažek a Vávra, 2006). Od tohoto roku je v České republice prováděn monitoring výskytu napadení patogenem *V. inaequalis* ve výsadbách jabloní na odrůdách s geny rezistence ke strupovitosti a zjišťována intenzita napadení (Vávra a Boček, 2009). Genetické analýzy populací houby *V. inaequalis* ukazují, že vlivem sexuální reprodukce každou zimu a selekčním tlakem ze strany hostitele a prostředí dochází k rekombinacím patogena, k jeho vývoji a vytváření nových alelických sestav ovlivňující jeho virulenci (Boone, 1971, Leonard 1987).

Těž chemická ochrana naráží na velkou adaptační schopnost patogena a selekčním tlakem vznikají populace odolné ke konkrétním účinným látkám fungicidů. Například strobilurinové fungicidy jako kresoxim-metyl nebo azoxystrobin blokují transport elektronů v dýchacím řetězci vazbou do quinol-oxidačního místa QoI komplexu III (Bartlett et al., 2002). Zheng et al. (2000) analýzou laboratorních mutantů *V. inaequalis* zjistili zásadní rozdíly v účinnosti strobilurinů na klíčení spor. Identifikoval tři mutace měnící primární strukturu bílkovinné části cytochromu b. Jednalo se o substituce v kodonech mRNA v pozicích 129 (F129L), 137 (G137R) a 143 (G143A). Tyto mutace byly dále detekovány u *Colletotrichum graminicola* (Avila-Adame et al., 2003) nebo *Golovinomyces cichoracearum* (Ishii, 2009). Autoři současně uvádějí skutečnost, že mutace 129 (F129L) a 137 (G137R), postihující exon 3, způsobují pouze částečnou rezistenci, zatímco mutace G143A v exonu 4 celkovou rezistenci ke strobilurinům. V dlouhodobém horizontu je rezistenci k fungicidům věnována soustavná pozornost zejména ze strany výrobců účinných látek. Byla vypracována teorie antirezistentní strategie, která je víceméně postupně uplatňována v praxi. Například Rosenzweig et al. (2008) navrhli antirezistentní strategii z hlediska užívání strobilurinových fungicidů v ochraně bramboru vůči *Alternaria solani*. Z hlediska účinnosti antirezistentní strategie je nezbytná efektivní metodika detekce rezistence v populacích patogenů. Možnost pro monitoring představují metody molekulární analýzy DNA, které relativně snadno a rychle umožní detekovat důležité mutace v populacích.

Cílem práce bylo charakterizovat vzorky populací *Venturia inaequalis* z českých výsadeb jabloní z hlediska virulence ke genu *Rvi6* a rezistence ke strobilurinovým fungicidům způsobené mutacemi genu pro mitochondriální cytochrom b. Cílem práce bylo rovněž

optimalizovat postupy izolace patogena z listů a následné udržování izolátů kultivací v *in vitro* podmínkách.

Materiál a metody

Hodnocení virulence *Venturia inaequalis* na odrůdách nesoucích gen *Rvi6* (*Vf*)

Průzkum produkčních sadů s následným vyhodnocením stupně napadení odrůd byl proveden v letech 2006 až 2011 v lokalitách, ve kterých došlo k výskytu strupovitosti na rezistentních odrůdách v České republice od roku 2006. Napadení bylo hodnoceno po sekundárních infekcích (v roce 2011 bylo hodnocení provedeno po primárních infekcích) v lokalitách Břasy a Spálené Poříčí v západních Čechách, Žernov ve východních Čechách, Buková Lhota a Branice ve středních Čechách, Rohozec na jižní Moravě (okres Brno-venkov) a dalších lokalitách, kde se projevy strupovitosti objevily v roce 2010: Lysice, a Lomnice u Tišnova na jižní Moravě a Kopidlna ve východních Čechách. Sledovanými odrůdami nesoucími gen rezistence *Rvi6* (*Vf*) byly Admirál, Florina, Goldstar, Karmína, Melodie, Otava, Rajka, Rosana, Rubinola, Selena, Topaz a Vanda. Napadení strupovitostí jabloně bylo hodnoceno na listech s použitím stupnice 1–9 (1: bez napadení, 2: napadení do 1 %, 3: 1–5 %, 4: mezistupeň, 5: ± 25 %, 6: mezistupeň, 7: ± 50 %, 8: ± 75 %, 9: více než 90 % listů napadeno) (Lateur a Populer, 1994).

Postup izolace houby *Venturia inaequalis* a kultivace *in vitro*

Hlavní pozornost byla zaměřena na izolaci patogena z nepohlavních spor – konidií, vzniklých ať už z primárních nebo sekundárních infekcí. V menší míře byly zkoušeny rovněž izolace z askospor. Optimalizace postupu získání izolátů spočívala ve vyhodnocení úspěšnosti následujících 4 metod.

Metoda 1:

Konidie *V. inaequalis* byly odebírány ze sporulujících lézí na napadených listech jabloní a přeneseny na vodní agar (2%, Fluka). Konidie byly rozetřeny suchou skleněnou sterilní tyčinkou po povrchu agaru a pak inkubovány 48 hod při 22 ± 2 °C. Po té byly pod mikroskopem vyhledávány klíčící konidie, které byly přeočkovávány na CYGA (Chloramphenicol Yeast Glucose Agar, 4%, HIMEDIA), vhodný pro potlačení růstu nežádoucích mikroorganismů. Dále byly kultury kultivovány střídavě na PDA agaru (Potato Dextrose Agar, 3,9 %, HIMEDIA) a CYGA (4%).

Metoda 2:

Po setření z listů sterilní injekční jehlou byly konidie *V. inaequalis* umístěny do plastových lahvíček se sterilní destilovanou vodou. Vzniklá suspenze spor byla po naředění (2–3 spory viditelné v zorném poli mikroskopu při zvětšení 10×45) nanášena na agarovou plotnu v Petriho misce s živným médiem CYGA (4%). Po 10 dnech v kultivačním boxu se stálou teplotou 19 °C byly vyhledávány vytvořené kolonie patogena, ze kterých bylo mycelium přeočkováno na čerstvé živné médium MEA (Malt Extract Agar, 4%, HIMEDIA) a následně byla kultura udržována střídavým pasážováním na PDA (3,9%) a MEA (4%) při teplotě 20 °C.

Metoda 3:

Sterilní injekční jehlou byly bodově odebrány konidie ze sporulujících lézí na listech a suchou cestou přeneseny na agarovou plotnu s živným médiem CYGA (4%). Po uzavření Petriho misek parafilmem byly tyto uloženy na denním světle v laboratoři při teplotě 20 ± 2 °C. Z vytvořených kolonií patogena bylo cca po 10 dnech od nasazení kultur sterilní preparační jehlou přeneseno mycelium houby na čerstvé médium MEA (4%) a následně byla kultura udržována dle schématu uvedeného v postupu 2, tj. střídavým pasážováním na 3,9% PDA a 4% MEA.

Metoda 4:

Preparační jehlou byla preparována pseudoperithecia *V. inaequalis* a po roztlačení v kapce sterilní vody byly zralé askospory odsáty mikropipetou. Suspenze askospor byla naředěna ve 150 µl sterilní vody (v případě snahy získat monosporický izolát byly sporové suspenze ředěny v desetinásobku objemu sterilní vody) a vyseta na povrch kultivačního média PDA (3,9%) nebo ALA (Apple Leaf Agar) připravených na bázi extraktů z hlíz bramboru, respektive listů jabloní. Základní extrakty byly připraveny následujícím postupem: Extrakt PD (Potato Dextrose) – 300 g brambor bylo homogenizováno pomocí mixéru, rozvařeno v 1 l deionizované vodě a scezeno přes hrubou gázu. Extrakt AL (Apple Leaf) – 300 g mladých listů jabloně homogenizováno a smícháno s 300 mg Polyvinylpyrrolidonu (Sigma). Homogenát byl přiveden k varu a po zchladnutí a usazení byla čirá fáze centrifugována k odstranění sedimentujících složek a následně filtrována. Připravené extrakty byly použity pro přípravu finální kultivační půdy v následujícím složení: 50 ml extraktu + 50 ml deionizované vody + 2 g glukózy + 1,5 g agaru. Média pro první fázi kultivace (3 pasáže) byla obohacena kombinací antibiotik cefotaxim a streptomycin (resp. tetracyklin) v množství 100 mg.l⁻¹ každé antibiotické složky. Kultivace probíhala ve vlhčeném kultivačním boxu SANYO. Pasážování kultur probíhalo po sedmi dnech vývoje mycelia technikou přenosu bločků vyříznutých z plotny porostlé myceliem, možný se ukázal i přetisk nebo přenos konidií smyvem nebo stěrem preparační jehlou. V první fázi u polysporických kultur bylo vyříznuto větší množství malých bločků (2×2 mm) a přeneseno izolovaně na různé misky.

Detekce polymorfismu 4. exonu genu pro cytochrom b

K analýzám sloužily připravené monosporické izoláty patogena. Mycelium bylo setřeno sterilní kličkou do tekutého dusíku a následně homogenizováno skleněnou tyčinkou na jemný prach. DNA byla extrahována z homogenátu pomocí kitu DNeasy Plant Mini Kit (Sigma). Exon 4 genu mitochondriálního genu pro cytochrom b byl amplifikován primery 5' TGCAAGATAAATCTGAGTTGACG3' a 5' TGGTTGTTAGGCTC TTCAATGAATAAT3' navrženými dle sekvence AF004559 nukleotidové databáze NCBI podle Zheng a Köller (1997) v termocykleru C1000 (BioRad, USA). Amplifikované fragmenty byly analyzovány metodou SSCP (konformační polymorfismus ssDNA) pomocí systému detekce mutací DCodeXR (Bio-Rad, USA) a zjištěné polymorfismy byly ověřeny přímou sekvenací produktů pomocí genetického analyzátoru ABI PRISM310 (Applied Biosystems, USA).

Výsledky a diskuse

Hodnocení virulence *Venturia inaequalis* na odrůdách nesoucích gen *Rvi6* (*Vf*)

Výsledky hodnocení výskytu strupovitosti jabloně na odrůdách nesoucích gen rezistence *Rvi6* (*Vf*), pěstovaných v různých lokalitách ČR, jsou uvedeny v tabulce 1. V prvních letech hodnocení, kdy byla strupovitost jabloně zaznamenána na rezistentních odrůdách, byly odrůdy Goldstar, Otava, Rubinola a Topaz (nesoucí gen *Rvi6*) napadeny ve všech lokalitách ve větší intenzitě (stupeň 7 a 8). Odrůdy Selena, Melodie a Rajka byly v prvních letech hodnocení napadeny menší intenzitou (stupeň 2–6), v pozdějších letech hodnocení však trpěly silnými infekcemi (stupeň 7 a 8). V lokalitě Žernov byla výsadba s odrůdami Goldstar, Rajka a Rubinola hodnocena jen v letech 2006–2008. Na odrůdách Karmína a Admirál nebylo pozorováno žádné napadení, důvodem je zřejmě polygenní rezistence těchto odrůd. Odrůda Angold, u které se kromě genu *Va* uvádí ještě polygenní rezistence (Williams a Kuc, 1969), byla napadena strupovitostí jabloně pouze v některých letech slabými primárními infekcemi bez sporulace (hodnocení není zahrnuto v tabulce). U odrůdy Florina, která nese vedle genu rezistence *Rvi6* (*Vf*) též gen *Rvi1* (dříve označovaný *Vg*), došlo k napadení v lokalitě Buková Lhota ve středních Čechách, zatímco v lokalitách Těnovice a Branice zůstala tato odrůda bez napadení. Výskyt strupovitosti jabloně na odrůdách s genem *Rvi6* (*Vf*) byl pěstiteli pozorován

i v dalších lokalitách např. Choustníkovo Hradiště a Dolany, kde pěstitelé provádějí chemickou ochranu a hodnocení intenzity napadení nelze objektivně provádět.

Další výskyty strupovitosti jabloně byly hlášeny zahrádkáři z několika lokalit ve středních a východních Čechách a na Moravě. Šíření populací patogena virulentních na odrůdách s geny rezistence je možné přenosem s rostlinným materiálem (výsadbový materiál, podnože, rouby), vzdušnými proudy (askospory houby *V. inaequalis* byly objeveny ve vzorcích atmosféry ve výšce až 10 km) nebo mutacemi patogena měnící jeho virulenci ke genu rezistence. Tato poslední možnost je v Čechách málo pravděpodobná vzhledem k vysokému počtu lokalit s výskytem populací schopných virulence na odrůdách s genem rezistence *Rvi6* (*Vf*) a je tudíž nepravděpodobné, že by k mutacím docházelo u patogena v takovém rozsahu. Na druhou stranu např. na lokalitě Rohozec došlo k náhlému prolomení rezistence v roce 2008 pouze v některých blocích výsadeb, mladší výsadba odrůdy Rubinola, založená ve vzdálenosti necelého kilometru od silně napadeného bloku, zůstala v roce 2008 bez známek poškození strupovitostí jabloně. Na základě genetických analýz lze zatím konstatovat, že se zřejmě populace nijak nevymyká standardu v Evropě.

Tabulka 1: Napadení odrůd s genem *Rvi6* (*Vf*) v lokalitách v ČR v letech 2006–2011

Odrůda	Gen	Lokalita	2006	2007	2008	2009	2010	2011
			Stupeň napadení (1–9)					
Admirál	<i>Vf – Rvi6</i>	Milčice	N	N	1	1	1	N
		Střížovice	N	N	1	1	1	N
Florina	<i>Vf – Rvi6</i> , <i>Vg – Rvi1</i>	Branice	N	N	1	1	1	N
		Buková Lhota	4	2	5	5	5	N
		Těnovice	1	1	1	1	1	N
Goldstar	<i>Vf – Rvi6</i>	Branice	N	N	8	8	8	N
		Břasy	5	3	5	6	6	N
		Buková Lhota	6	4	7	7	8	N
		Kopidlno	N	N	N	N	7	8
		Rohozec	N	N	6	8	8	6
		Žernov	6	4	6	N	N	N
Karmína	<i>Vf – Rvi6</i>	Střížovice	1	1	1	1	1	N
		Těnovice	1	1	1	1	1	N
Melodie	<i>Vf – Rvi6</i>	Branice	N	N	6	6	6	N
		Břasy	2	2	7	7	8	N
		Těnovice	1	1	1	1	3	N
Otava	<i>Vf – Rvi6</i>	Břasy	8	4	8	8	8	N
		Kopidlno	N	N	N	N	6	6
		Těnovice	1	3	5	8	8	N
Rajka	<i>Vf – Rvi6</i>	Alšovice	N	2	3	3	3	N
		Kopidlno	N	N	N	N	7	7
		Spálené Poříčí	6	4	6	6	4	N
		Žernov	2	2	2	N	N	N
Rosana	<i>Vf – Rvi6</i>	Alšovice	N	2	4	4	4	N
		Branice	N	N	3	6	6	N
		Břasy	5	3	6	6	6	N

Odrůda	Gen	Lokalita	2006	2007	2008	2009	2010	2011
			Stupeň napadení (1–9)					
		Kopidlno	N	N	N	N	6	7
		Těnovice	1	1	1	3	3	N
Rubinola	<i>Vf – Rvi6</i>	Alšovice	N	2	7	7	8	N
		Branice	N	N	8	8	8	N
		Břasy	8	4	8	8	8	N
		Buková Lhota	7	4	8	8	8	N
		Spálené Poříčí	7	4	7	7	7	N
		Rohozec	N	N	6	8	8	6
		Těnovice	6	4	6	8	8	N
		Lomnice u Tišnova	N	N	N	N	N	6
		Žernov	3	2	4	N	N	N
Selena	<i>Vf – Rvi6</i>	Břasy	6	4	6	6	8	N
		Buková Lhota	3	2	5	5	8	N
		Spálené Poříčí	3	2	4	4	8	N
		Těnovice	2	2	6	8	8	N
		Lomnice u Tišnova	N	N	N	N	N	7
Topaz	<i>Vf – Rvi6</i>	Branice	N	N	8	8	8	N
		Břasy	7	4	7	7	8	N
		Buková Lhota	6	4	7	7	8	N
		Kopidlno	N	N	N	N	7	8
		Spálené Poříčí	6	4	6	6	8	N
		Těnovice	6	5	8	8	8	N
		Lomnice u Tišnova	N	N	N	N	N	7
Žernov	7	4	7	7	8	N		
Vanda	<i>Vf – Rvi6</i>	Branice	N	N	8	8	8	N
		Břasy	6	3	6	6	8	N

Legenda: N – nehodnoceno

Výsledky izolace patogena

Za období 2008–2010 bylo získáno více než 150 izolátů *V. inaequalis*, které následně sloužily k analýzám DNA pro posouzení rezistence k vybraným fungicidům ze skupiny strobilurinů. V případě izolací z konidií se osvědčily postupy 1 a 3, tj. přenesení spor z listů suchou cestou na živné médium. V případě aplikace metody 2 docházelo ve velké míře ke kolonizaci substrátu nežádoucími mikroorganismy, zejména kvasinkami a saprofytickými houbami, fáze separace *V. inaequalis* tak byla značně komplikována. Jako optimální se jeví metoda 1, při které je zaručena tvorba monosporových izolátů. Velmi zajímavou se ukazuje i metoda získání monosporových izolátů z askospor. Ve všech případech se ukázalo jako nezbytné použití antibiotik (chloramfenicol, cefotaxim v kombinaci se streptomycinem nebo tetracyklinem) k potlačení růstu bakteriálních kultur. V případě izolace z konidií je žádoucí odebrat vzorky listů se sporulujícími lézemi vzniklými z primárních infekcí, a to v nejranější fázi kolonizace listu, z důvodu omezení výskytu doprovodných nežádoucích kultur, zejména saprofytických hub a kvasinek.

Výsledky detekce polymorfismu 4. exonu genu pro cytochrom b

Metodou SSCP byly zjištěny dvě různé alely exonu 4, které se lišily elektroforetickou mobilitou jednovláknových DNA. Tento dimorfismus ukázal na sekvenční variabilitu uvnitř analyzovaného exonu. Sekvenací obou alel byly zjištěny následující skutečnosti. SSCP alela "a" korespondovala sekvenčně s nukleotidovým záznamem "wild type" sekvence AF004559 (Zheng a Köller, 1997), zatímco SSCP alela „b“ obsahovala malou změnu v nukleotidové sekvenci. Konkrétně se jednalo o substituci G/C v pozici 23 exonu 4 (428. báze mRNA), která v důsledku mění smysl kodonu 143, kdy je neutrální glycin nahrazen hydrofobním alaninem. Z hlediska výskytu je podstatné, že mutace G143A byla detekována v 75 izolátech pocházejících především z výsadeb využívajících chemickou ochranu proti strupovitosti. U 29 izolátů byla detekována přírodní (wild type) alela. Bližší specifikaci výskytu uvádí tabulka 2, kde je zároveň uvedena rezistence k fungicidům zjištěná testem klíčivosti spor ve strobilurinových přípravcích. Výsledky molekulární analýzy kopírovaly výskyt rezistence izolátů k fungicidu Discus (kresoxim-methyl) a Zato 50 WG (trifloxystrobin) ověřené testem klíčivosti spor (Kloutvorová et al., 2009). Zheng et al. (2000) nebo později Fontaine et al. (2008) uvádějí, že nositelé mutace G143A vykazují 100% odolnost vůči strobilurinovým fungicidům. Výsledky našich analýz tuto skutečnost potvrzují, nicméně nelze tento výsledek paušalizovat na celou skupinu strobilurinů. 100% rezistenci vykazují tyto mutanty pouze u kresoxim-methylu nebo trifloxystrobinu. Klíčovým zjištěním této části práce je skutečnost, že v komerčních sadech již došlo k posunu genetické rovnováhy na stranu mutantních kmenů *V. inaequalis* nesoucích právě mutaci G143A, to znamená, že se v důsledku dlouhodobého užívání této skupiny látek vyselektovala mutantní část populace, která byla zřejmě i u nás nedílnou složkou celkové populace, jak uvádí například Zheng et al., (2000). Izolát virulentní na rezistentní odrůdě Rubinola (gen *Rvi6*) z lokality Rohozec vykazuje zároveň rezistenci ke strobilurinům (mutace G143A). Toto potvrzuje předpoklad, že kombinovaný selekční tlak rezistentní odrůdy a jednostranné chemické ochrany vede k selekci adaptovaných komplexních kmenů a jeho rozšíření. Tato událost pouze dokazuje, že užívání rezistentních odrůd a chemické ochrany má jak své výhody tak omezení a proto je nezbytné při volbě odrůdy a případné strategie chemické ochrany ve významných pěstebních oblastech vycházet ze skutečných vlastností populace *V. inaequalis* zjištěných pravidelným monitoringem výskytu virulentních a k fungicidům rezistentních kmenů. Z genetického hlediska lze konstatovat, že hlavní příčinou tohoto posunu (nikoliv vzniku mutací) je s vysokou pravděpodobností evidentně nefungující nebo dokonce vědomě neuplatňovaná antirezistentní strategie doporučovaná výrobcí fungicidů v souvislosti s intenzivním užíváním fungicidů. Tyto strategie byly dlouhodobě vyvíjeny již v 80. letech. Komplexní review předkládá například Staub a Sozzi (1984), moderní vizi přináší již v úvodu zmiňovaný Rosenzweig et al. (2008) právě pro strobiluriny.

Závěr

První výskyty strupovitosti jabloně na odrůdách nesoucích gen rezistence *Rvi6* (*Vf*), pěstovaných v produkčních výsadbách na několika vzájemně vzdálených lokalitách, byly v České republice zaznamenány v roce 2006. Od tohoto roku se objevovaly výskyty v dalších vzájemně vzdálených lokalitách. Sledování virulence patogena je důležité z hlediska výběru rezistentní odrůdy v dané lokalitě při zakládání nových výsadeb. Antirezistentní strategie nemohou fungovat bez důsledného a dlouhodobého monitoringu rezistence k fungicidům ať již na fenotypové úrovni nebo na úrovni molekulární. V tomto ohledu výsledky této práce přinášejí jistou naději právě z hlediska účinnějšího monitorování výskytu rezistence v sadech. Ve světle získaných výsledků je požadavek na účinný monitoring populace *V. inaequalis* více než oprávněný. Zmíněnou metodou SSCP je možné charakterizovat poměrně jednoduše a

spolehlivě rozsáhlé soubory vzorků bez nároku na finančně nákladné a vysoce sofistikované vybavení a proškolení laborantů. Pro genetické analýzy studovaného patogena je nezbytné disponovat čistými monosporickými izoláty.

Tabulka 2: Charakteristika izolátů z hlediska detekované mutace mitochondriálního genu pro cytochrom b v souvislosti s detekovanou odolností k strobilurinovým fungicidům

Rok	Původ (lokalizace výsadby)	Počet izolátů	Odrůda	Rezistence ke kresoxim-methylu	Mutace G143A
2007–2009	Veselý Žďár	3	Rubín	N	–
	Kladno	4	okrasná odrůda	N	–
	Radňov	7	neznámá odrůda	N	–
	Žernov	7	Topaz	N	–
	Brno	1	Golden Delicious	N	–
	Rohozec	1	Goldstar	N	–
		1	Rubinola	N	+
		5	Šampion	+	+
	Lysice	1	Jonagold	+	+
	Tuchoraz	1	Golden Delicious	+	+
	Velké Bílovice	7	Golden Delicious	+	+
	Holovousy – Včelín	14	Idared	+	+
	Holovousy – Kamenec	2	Gloster	+	+
	Lázně Bělohrad	1	nahodilý semenáč	–	–
	Kamenice	2	Šampion	+	+
		2	Golden Delicious	+	+
	Choustníkovo Hradiště	2	Jonagold	+	+
	Dolany	2	Golden Delicious	+	+
Praha Ruzyně – VÚRV	5	Rubín	+	+	
Dobrá Voda – PL1	2	Jonagold	+	+	
2010	Velké Němčice	1	Idared	N	+
	Petrovičky	3	Golden Delicious	N	+
	Těšetice	12	Golden Delicious	N	+
	Velký Třebešov	2	Golden Delicious	N	+
	Velké Bílovice	5	Golden Delicious	N	+
	Lysice (Zeas, as.)	2	Jonagold	N	+
	Lysice (pěstitel Fojt)	5	Vanda	N	–
	Lysice (Agrokonzor)	2	Golden Delicious	N	+

Legenda: + rezistence v testu klíčivosti konidií / detekce mutace; – citlivost v testu klíčivosti konidií / mutace nedetekována; N – netestováno

Dedikace

Výsledky byly získány za podpory Národní Agentury pro Zemědělský Výzkum Ministerstva zemědělství ČR v rámci řešení grantového projektu QH71172 „Identifikace kmenů a ras strupovitosti (*Venturia inaequalis* CKe. Wint.)“.

Použitá literatura

- Aderhold, R. (1899): Auf welche Weise können wir dem immer weiteren Umsichgreifen des *Fusicladiums* in unseren Apfeln beugehen und welche Sorten haben sich bister dem Pilz gegenüber am widerstandsfähigsten gezeigt. *Pomol. Monatsch.* XLV:266–272.
- Avila-Adame, C; Olaya, G.; Köller, W. (2003): Characterization of *Colletotrichum graminicola* Isolates Resistant to Strobilurin-Related QoI Fungicides. *Plant disease* 87 (12): 1426–1431.
- Bartlett, D. W.; Clough, J. M.; Godwin, J. R.; Hall, A. A.; Hamer, M.; Parr-Dobrzanski, B. (2002): Review: The strobilurin fungicides. *Pest Management Science* 58: 649–662.
- Bénaouf, G.; Parisi, L. (2000): Genetics of the host-pathogen relationship between *Venturia inaequalis* races 6 and 7 and *Malus* species. *Phytopathology* 90: 236–242.
- Blažek, J.; Vávra, R. (2006): Napadení rezistentních odrůd jabloní strupovitostí v ČR. *Zahradnictví* 12: 14–15.
- Boone, D. M. (1971): Genetics of *Venturia inaequalis*. *Annu.Rev. Phytopathol.* 9:297–318.
- Bus, V. G. M.; Laurens, F. N. D.; Van de Weg, W. E.; Rusholme, R. L.; Rikkerink, E. H. A.; Gardiner, S. E.; Bassett, H. C. M.; Plummer, K. M. (2005): The *Vh8* locus of a new gene-for-gene interaction between *Venturia inaequalis* and the wild apple *Malus sieversii* is closely linked to the *Vh2* locus in *Malus pumila* R12740-7A. *New Phytologist*. 166(3):1035–1049.
- Fontaine, S.; Remuson, F.; Fraissinet-Tachet, L.; Micoud, A.; Marmeisse, R.; Melayah, D. (2008): Monitoring of *Venturia inaequalis* harbouring the QoI resistance G143A station in French orchards as revealed by PCR assays. *Pest Management Science*. 65: 74–81.
- Ishii, H. (2009): QoI fungicide resistance: Current status and the problems associated with DNA based monitoring. In: Gisi, U.; Chet, I.; Gullino, M. L. (Eds.) *Recent developments in management of plant diseases*. Springer Netherlands, pp. 37–45.
- Kloutvorová, J.; Lánský, M.; Kupková, J.; Vávra, R.; Svoboda, A.; Boček, S. (2009): Monitoring citlivosti populací houby *Venturia inaequalis* k vybraným pesticidům. *Věd. práce ovocn.*, 21: 37–45.
- Lateur M.; Populer C. (1994). Screening fruit tree genetic resources in Belgium for disease resistance and other desirable characters. *Euphytica* 77:147-153
- Leonard, K. J. (1987): The host population as a selektive faktor. 163–179. in: *Population of plant pathogens*: Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Parisi L., Lespinasse Y., Guillaumes J., Kruger J. 1993. A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the *Vf* gene. *Phytopathology* 83: 533–537.
- Parisi, L.; Lespinasse, Y. (1996): Pathogenicity of *Venturia inaequalis* strains of race 6 on apple clones (*Malus* sp.). *Plant Dis.* 80: 1179–1183.
- Roberts, A. L.; Crute, I. R. (1994): Apple scab resistance from *Malus floribunda* 821 (*Vf*) is rendered ineffective by isolates of *Venturia inaequalis* from *Malus floribunda*. *Norw. J. Agric. Sci.* 17: 403–406.
- Rosenzweig, N.; Atallah, Z. K.; Olaya, G.; Stevenson, W. R. (2008): Evaluation of QoI Fungicide Application Strategies for Managing Fungicide Resistance and Potato Early Blight Epidemics in Wisconsin. *Plant Disease* 92 (4): 561-568.
- Sierotzki, H.; Eggenschwiler, M.; Boillat, O.; McDermott G. J.; Gessler, C. (1994). Detection of variation in virulence toward susceptible Apple cultivars in natural populations of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 84: 1005–1009.
- Staub, T.; Sozzi, D., (1984): Fungicide resistance – a continuing challenge. *Plant disease* 68:1026–1031.
- Vávra, R.; Boček, S. (2009). Virulence strupovitosti ve výsadbách s prolomenou rezistencí. *Zahradnictví* 12:12–14.

Williams, E. B.; Kuc, J. (1969): Resistance in *Malus* to *Venturia inaequalis*. *Annu. Rev. Phytopathology* 7: 223–246.

Zheng, D.; Koller, W. (1997): Characterization of the mitochondrial cytochrome b gene from *Venturia inaequalis*. *Current Genetics* 32 (5): 361–366.

Zheng, D.; Olaya, G. ; Köller, W. (2000):. Characterisation of laboratory mutants of *Venturia inaequalis* resistant to strobilurin-related fungicide kresoxim-methyl. *Current Genetics* 38: 148–155.

Kontaktní adresa 1. autora

Radek Vávra Ing., Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o, Holovousy 1, 508 01 Hořice, e-mail: vavra.vsuo@seznam.cz

