

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

VÝZKUMNÝ ÚSTAV PRO KRAJINU A
OKRASNÉ ZAHRADNICTVÍ, v.v.i.



Metodika hodnocení citlivosti podnoží ovocných dřevin vůči patogenům z r. *Phytophthora*

Luděk Laňar, Karel Černý a kol.



CERTIFIKOVANÁ
METODIKA
2020



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

**VÝZKUMNÝ ÚSTAV PRO KRAJINU A OKRASNÉ ZAHRADNICTVÍ,
v.v.i.**

**Metodika hodnocení citlivosti podnoží ovocných dřevin
vůči patogenům z r. *Phytophthora***



Luděk Laňar, Karel Černý a kol.

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.
Výzkumný ústav pro krajinu a okrasné zahradnictví, v.v.i.

Metodika hodnocení citlivosti podnoží ovocných dřevin vůči patogenům z r. *Phytophthora*

Laňar, Černý a kolektiv

Certifikovaná metodika 2020

Autorský kolektiv:

Ing. Luděk Laňar, Ph.D. (VŠÚO Holovousy s.r.o.)
Ing. Karel Černý, Ph.D. (VÚKOZ Průhonice, v.v.i.)
Ing. Marcela Mrázková (VÚKOZ Průhonice, v.v.i.)
Mgr. Markéta Hrabětová (VÚKOZ Průhonice, v.v.i.)
Ing. Ludmila Havrdová, Ph.D. (VÚKOZ Průhonice, v.v.i.)
Ing. Pavlína Jaklová, Ph.D. (VŠÚO Holovousy s.r.o.)
Ing. Bronislava Fléglová, Ph.D. (VŠÚO Holovousy s.r.o.)
Ing. Juraj Grígel (VÚKOZ Průhonice, v.v.i.)
Doc. Ing. Daniel Zahradník, Ph.D. (VÚKOZ Průhonice, v.v.i.)
Mgr. Michaela Kracíková (VŠÚO Holovousy s.r.o.)
Ing. Marián Varga (VŠÚO Holovousy s.r.o.)
Ing. Klára Scháňková (VŠÚO Holovousy s.r.o.)

Autoři fotografií:

Ing. Luděk Laňar (VŠÚO Holovousy s.r.o.)
Ing. Karel Černý, Ph.D. (VÚKOZ Průhonice, v.v.i.)
Mgr. Markéta Hrabětová (VÚKOZ Průhonice, v.v.i.)
Ing. Marcela Mrázková (VÚKOZ Průhonice, v.v.i.)

Dedikace:

Tato metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu Technologické agentury České republiky TH02030521 „Identifikace a rozšíření patogenů rodu *Phytophthora* v ovocných výsadbách a vývoj metody integrované ochrany“. Projekt byl řešen v letech 2017–2020.

Oponentní posudky vypracovali:

Odborný oponent ze státní správy: Ing. Jana Suchá (ÚKZÚZ)
Odborný oponent z oboru: RNDr. Jaroslava Marková, CSc. (Univerzita Karlova)

Vydal: © VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o. 2020
© Výzkumný ústav pro krajinu a okrasné zahradnictví, v.v.i. 2020

ISBN 978-80-87030-77-6
ISBN 978-80-87674-36-9

Obsah

Anotace	4
1 Úvod	5
2 Cíl metodiky	6
3 Vlastní obsah metodiky	6
3.1 Princip testování	6
3.2 Příprava k testům	6
3.2.1 <i>Patogenní materiál k testům</i>	6
3.2.2 <i>Rostlinný materiál k testování</i>	10
3.3 Vlastní testování	13
3.3.1 <i>Testování in vitro</i>	13
3.3.2 <i>Testování nádobovými pokusy</i>	15
3.4 Statistické vyhodnocení	20
3.4.1 <i>Vyhodnocení in vitro testů porovnávajících citlivost podnoží</i>	20
3.4.2 <i>Vyhodnocení nádobových testů</i>	21
3.5 Použitelné alternativní metody testování.....	21
3.5.1 <i>Inokulace in vitro</i>	22
3.5.2 <i>Pokusy in planta</i>	22
4 Srovnání novosti postupů	24
5 Popis uplatnění metodiky	24
6 Ekonomické aspekty	24
7 Seznam použité literatury	26
8 Seznam publikací, které předcházely metodice	27

Anotace

Metodika zpracovává tematiku hodnocení citlivosti podnoží ovocných dřevin vůči patogenům z r. *Phytophthora*. Zaměřuje se na využití domácích i zahraničních poznatků výzkumu i praxe. V úvodu jsou popsány způsoby, jakými by měl být získáván a uchováván patogenní materiál pro využití v budoucím testování. Rovněž je uveden způsob, jakým by měl být získáván a uchováván rostlinný materiál určený k testování. Dále je popsán způsob testování citlivosti podnoží laboratorní metodou *in vitro* a jsou uvedeny výhody a nevýhody tohoto způsobu testování. V následující části je zevrubně popsána metoda hodnocení citlivosti podnoží nádobovými pokusy. Jsou rovněž popsány statistické metody hodnocení výsledků. Závěrečná část je věnována popisu alternativních metod. Text je doplněn fotodokumentací.

Annotation

Methodology deals with an assessment of fruit rootstock sensitivity to pathogenic species of genus *Phytophthora*. It focuses on the use of domestic and foreign research and practical knowledge. The way how to acquire and manage pathogenic material for future experiments is described at the beginning. Following part describes the way of acquiring and managing plant material for future testing. Methodology of laboratory *in vitro* tests of fruit rootstock sensitivity to *Phytophthora* is described afterwards. It includes description of advantages and disadvantages of this testing method. Following chapter deals with methodology of pot tests and it also mention the advantages, disadvantages and risks when utilizing this method. Methodology of statistical analysis is also described. Final part is dedicated to description of alternative methods. Pictures are included for better depiction of methods.

1 Úvod

V posledních dekádách dochází u nás i ve světě k významnému zvyšování škod způsobených patogeny rodu *Phytophthora* v ovocnářství ale i v jiných zemědělských a lesnických kulturách. Vzhledem k nebezpečnosti, skrytému způsobu šíření a života patogenů z rodu *Phytophthora* a nárokům na kvalitu produkce ovoce je hlavním přístupem v managementu chorob způsobených těmito patogeny integrovaná ochrana s důrazem na prevenci a šíření patogenů. Jednou z významných zásad integrované péče je používání dostatečně odolných podnoží.

Podnož tvoří kořenovou soustavu a zpravidla i přízemní část kmene ovocného stromu. Jsou to tedy ty části, které jsou nejčastěji s patogeny rodu *Phytophthora* v přímém kontaktu a kde dochází k jejich poškození. V citlivosti podnoží jsou velké rozdíly jak mezi druhy, tak i mezi jednotlivými podnožovými odrůdami v rámci jediného druhu. U mnoha podnoží je citlivost vůči patogenům z r. *Phytophthora* poměrně dobře známá a popsána. U některých podnoží jsou ale dokumentovány i značně protichůdné výsledky. To lze přičítat zejména poměrně širokému spektru patogenních druhů, které mohou způsobovat škody, a jejich rozdílné adaptaci na odlišné půdní a klimatické podmínky. Mimoto se výrazně liší i samotná virulence jednotlivých druhů a kmenů patogenů a míra jejich adaptace na různé hostitele, tj. významnou roli hraje interakce podnož-kmen, patogen-podmínky prostředí, která se samozřejmě netestuje, ve skutečnosti má ovšem zásadní význam. V praxi to znamená často fakt, že podnož známá a používaná jako poměrně odolná v jednom geografickém areálu je citlivá k napadení v oblasti jiné, s odlišnými podmínkami a spektrem kmenů patogenů. Mimoto v současné době dochází k intenzivnímu zavlékání nových a dosud málo známých druhů patogenů či nových více virulentních linií už známých patogenů do nových oblastí. Často se pak může stát, že i podnože vnímané jako odolné jsou poškozovány výrazněji než dříve. V rámci celé řady výzkumů a hodnocení se ovšem potvrdila značná variabilita v citlivosti jednotlivých podnoží jak vůči různým druhům r. *Phytophthora*, tak i vůči různým kmenům v rámci jednoho druhu, a stejně tak byla potvrzena i odlišná virulence různých kmenů patogenů vůči svým hostitelům. Proto například může být v testech potvrzena vysoká citlivost u podnože, která je obecně nahlížena jako rezistentní, či je tak dokonce udávána šlechtitelem nebo množitelem, a naopak u odrůdy všeobecně vnímané jako vysoce citlivé (např. MM106) může být dosahováno vysoké odolnosti (Utkhede 1986, Harris 1991, Sutton a kol. 2014, Černý a kol. 2020).

Mimo používané podnože, jejichž citlivost je již poměrně spolehlivě popsána a lze ji v praxi s jistou opatrností reflektovat, jsou však na trh uváděny nové podnože, kde je většinou jejich citlivost popsána pouze šlechtitelem. Málodky je však specifikován způsob, jak k tomuto zjištění došlo. Obecně se však předpokládá, že byl proveden nějaký druh testování a sledování v místě šlechtění. S ohledem na proměnlivé půdní a klimatické podmínky jednotlivých ovocnářských regionů, ale zejména na odlišné složení patogenní flóry v různých regionech a značné variabilitě v jejich virulenci, je pak tato informace poměrně málo spolehlivá. Je tedy vhodné před širokou distribucí nové podnože otestovat její citlivost na patogenní druhy přítomné v daném regionu (což je možné a vhodné provádět na různé prostorové škále). Předkládaná metodika poskytuje návod, jakým způsobem je možné s maximální mírou spolehlivosti provádět testování nových, ale i starších podnoží za účelem zjištění jejich citlivosti k vybraným druhům rodu *Phytophthora* i jednotlivým kmenům patogenů přítomným v daném regionu.

Izoláty lokálních kmenů patogenů mohou být získány ze sbírek, kde jsou uloženy (v současnosti pouze Česká sbírka fytopatogenních oomycetů v Průhonicích), případně, a to je mnohem vhodnější, mohou být přímo získány z dotčených provozů. Nejčastěji lze předpokládat testování izolátů druhu *P. cactorum*, který v ČR převažuje, případně kmenů

druhů vzácnějších, které však mohou lokálně dominovat a působit zásadní škody (např. *P. plurivora*, *P. chlamydospora* × *amnicola* aj.). Výhodou využití čerstvě získaných kmenů je jednak adresnost (testování odolnosti na konkrétním patogenu přítomném v lokalitě) a jednak dostatečná úroveň virulence patogenu.

2 Cíl metodiky

Cílem předkládané metodiky je přinést ucelený návod, jakým je možné provádět testování jednotlivých podnoží na citlivost k patogenům rodu *Phytophthora*. Cílem tedy je poskytnout ovocnářské odborné veřejnosti, potažmo výzkumným, šlechtitelským a testovacím stanicím a univerzitám účinný nástroj, na jehož základě je možné s vysokou mírou spolehlivosti určovat citlivost jednotlivých podnoží vůči lokálně přítomným druhům a kmenům patogenů.

3 Vlastní obsah metodiky

3.1 Princip testování

Testování podnoží na citlivost k patogenům rodu *Phytophthora* je dvoustupňové. Nejdříve probíhá laboratorní *in vitro* testování na segmentech výhonů nebo letorostů (twig essay), výhodou tohoto postupu je nízká cena a malá náročnost na lidské i prostorové kapacity, a tedy možnost provedení velkých sérií testů. Ve druhé fázi jsou pak podnože testovány v nádobových pokusech. Tato část pokusu je časově a prostorově podstatně náročnější, proto ji lze použít jako druhý, ověřovací stupeň testování navázaný na prvotní screening.

Pro každou část postupu je v rámci této publikace navrženo základní schéma a metodika postupu včetně vyhodnocení vypracovaných na základě vlastních prací a literatury. V případě, kde je to možné, jsou navrženy alternativní varianty pokusu nebo alternativní modifikace jednotlivých částí na základě literatury. Pro zajištění testování je nutné výsledky porovnávat s určitými standardy. Jako srovnávací škála je používán set různě citlivých podnoží, který byl vybrán na základě našich pokusů a literatury.

3.2 Příprava k testům

3.2.1 Patogenní materiál k testům

Izolace patogenního materiálu

Odběry vzorků pro izolaci patogenů rodu *Phytophthora* je vhodné provádět v období od května do listopadu, kdy jsou tyto patogeny nejvíce aktivní a je snadnější je izolovat. Odběry musí být prováděny v nejvíce postižených částech sadů a provozů, aby byly získány cílové, nejhojnější a nejvíce škodlivé kmeny. Při odběrech by, pokud je to možné, měly být odebírány vzorky z lokalit s minimálním vlivem environmentálního stresu, který podporuje rozvoj patogenů (vliv těchto faktorů lze eliminovat pomocí vhodných preventivních opatření viz Černý a kol. 2020).

Optimální způsob izolace je z viditelných nekrotických lézí na krčcích nebo kmíncích stromků na selektivních agarových médiích. V napadených částech sadů jsou identifikovány stromy s přítomností charakteristických, aktivně se rozrůstajících lézí na krčcích a kmenech

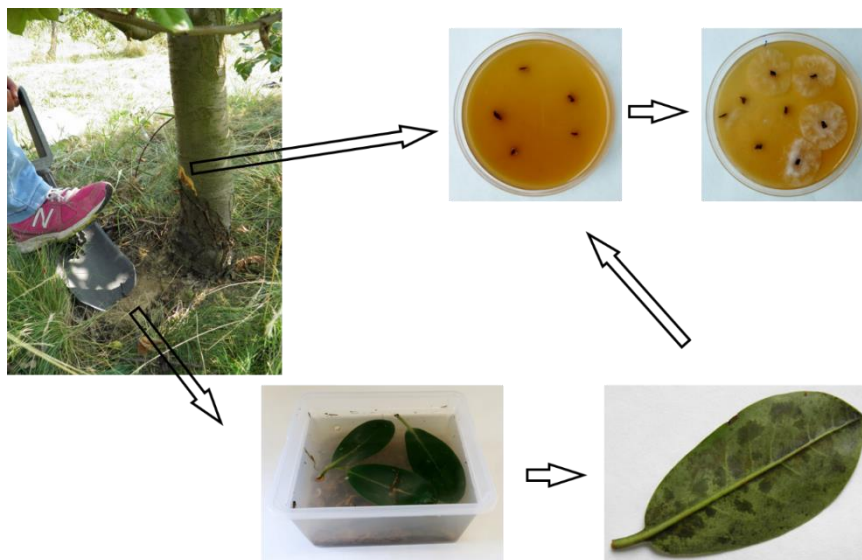
(obr. 1 vlevo). Na těchto jedincích se dlátem z poškozených krčků odstraní borka a odhalí se vodivá pletiva, resp. přechod nekrotizovaných a zdravých pletiv (obr. 1 vpravo). Širokým dlátem se odebírají proužky vodivých pletiv 3–5 mm silné, které obsahují přechod zdravých a napadených pletiv (vzorek by měl obsahovat cca 100 cm² pletiv). Vzorky odebraných pletiv se uloží do sterilních PE obalů, aby nedocházelo k vysychání, kontaminaci nebo nechtěnému rozšíření patogenu. Vzorky se uchovávají ve tmě a chladu kvůli zamezení zapaření či přehřátí odebraného materiálu. Každý vzorek musí být označen číslem odběru, přesným určením lokality pomocí GPS, datem odběru a určením druhu a podnože hostitelské rostliny. Vhodný je i popis stanoviště, zdroj rostlinného materiálu (dodavatel) a pořízení fotodokumentace. Takto odebrané a připravené vzorky musí být neprodleně transportovány do laboratoře a do 24 hod zpracovány.



Obr. 1. Typická léze krčku způsobená *P. cactorum*; vlevo charakteristické hnědavé zbarvení povrchu kůry, vpravo je po odstranění kůry viditelný přechod nekrotizovaných a zdravých pletiv.

Izolace zájmových druhů rodu *Phytophthora* v laboratorních podmínkách je poměrně obtížná, neboť se jedná o obligátní parazity se slabou kompetiční schopností. Nejvhodnější způsob izolace je inkubace aktivně napadených pletiv hostitelů na speciálních selektivních médiích s obsahem vhodných antibiotik. Principem použití selektivních izolačních médií je inhibice přítomných bakterií a hub a tím zajištění jejich neškodnosti vůči izolovaným druhům rodu *Phytophthora*. Jako selektivní izolační médium je nejvhodnější selektivní médium PARPNH (V8-juice (např. Kelsen Group A/S) 200 ml, ampicilin 200 ppm, rifampicin 10 ppm, quintozen 25 ppm, nystatin 50 ppm, hymexazol 50 ppm, agar 15 g, CaCO₃ 3 g, 0,8 l deionizované H₂O). Při přípravě izolátu se pletiva odebraná z okraje nekrózy nařežou na segmenty velké cca 3×3 mm, přičemž část každého segmentu obsahuje zdravé pletivo a část čerstvě kolonizované, případně mohou být použity segmenty z částí léze těsně přilehlých jejímu aktivnímu okraji. Segmenty jsou následně desinfikovány ponořením do 96% etanolu na 10 s, opláchnuty v deionizované sterilní vodě, vysušeny filtračním papírem a umístěny na plotny selektivního média v Petriho miskách o průměru 10 cm (cca 5–10 segmentů na misku). Inkubovány jsou ve tmě v termostatu při 20 °C. Schéma zpracování vzorku je znázorněno na

obrázku 2. Plotny s inkubovanými pleťvami se v následujících dnech periodicky kontrolují a mycelium kolonií vyrostlých ze segmentů na PARPNH médiu je prohlédnuto pod stereomikroskopem. Na základě charakteru mycelia se určí jejich příslušnost k r. *Phytophthora* a izoláty se pak odočkují na plotny s V8A (V8-juice 200 ml, CaCO₃ 3 g, 0,8 l deionizovaná H₂O), případně CA (19 g Carrot agar HiMedia, 1 H₂O) kultivačními médii. Čisté izoláty jsou pak přeneseny do zkumavek na šikmé agary (OA; Oatmeal agar HiMedia 72,5 g, 1 H₂O) a uloženy v chladničce při teplotě 12 °C, případně se přeočkují na nové agarové plotny a připraví se inokulační médium.



Obr. 2. Princip izolace oomycetů z poškozených pletiv krčku a ze substrátu.

Determinace morfologická a molekulární

Všechny získané izoláty se určují nejen morfologicky, ale i molekulárně. Morfologie kolonií se pozoruje na 3–7denních kulturách pěstovaných na V8A médiu při 20 °C ve tmě. Mikroskopické charakteristiky (zejm. znaky na gametangiích, oosporách případně chlamydosporách) izolovaných kultur se měří po 10denní kultivaci na V8A a CA médiích (viz výše). Tvorba zoosporangii je indukována ponořením agarového disku s aktivním myceliem do nesterilního půdního extraktu připraveného filtrací z 25% půdní suspenze. Zoosporangia se obvykle vytváří po 24–48 hodinách při 20 °C. Měření se nejlépe provádí pod optickým mikroskopem při zvětšení 1000×, pro každý hodnocený znak se provádí 20 měření. Příslušnost izolátů k druhu se určuje shodou s popisy uvedenými v literatuře (postačují např. monografie Erwin a Ribeiro 1996 či Gallegly a Hong 2008, případně popisy např. ve veřejně dostupné databázi <http://www.phytophthoradb.org>, případně v dílčích publikacích).

Pro účely molekulární identifikace se pak nejprve izoluje celková DNA některým ze standardních postupů izolace, nejvhodnější je použít kolonkovou izolaci s využitím komerčních extrakčních kitů např. Ultraclean Microbial DNA Isolation Kit (Qiagen). Mycelium z Petriho misky se seškrábne pomocí sterilního skalpelu a umístí do 1,5 ml mikrozkušavky, poté je možné ihned přikročit k extrakci DNA, nebo mikrozkušavky zamrazit na –80 °C a s extrakcí pokračovat později. Následuje PCR amplifikace vybraných úseků DNA, pro identifikaci oomycetů se používají sekvence ITS oblastí rDNA, případně sekvence COX I genu, ideálně se amplifikují oba tyto úseky. PCR reakce se provádí

v termocykleru za standardizovaných reakčních podmínek (teplotní cyklus reakce, složení reakční směsi) s využitím kombinací primerů ITS1/ITS4, respektive ITS4/ITS5 v případě ITS rDNA a FM85mod/OomCoxIIevup v případě COX genu. Reakční směs se připravuje v PCR boxu, obvykle se používá reakční objem pro jeden vzorek 10–50 µl (složení reakční směsi na 50 µl: 5 µl PCR pufr 10x, 4 µl MgCl₂ 25 mM, 1 µl dNTP mix 10mM, 2 µl každého primeru, 0,3 µl Taq polymerázy Qiagen, 33,7 µl H₂O v kvalitě pro PCR a 2 µl templátové DNA). Výsledek PCR reakce se ověří na 1% agarózové elektroforéze. PCR produkty se poté přečistí a dále sekvenují, ideálně se sekvenují oba komplementární řetězce. Pro tento krok molekulární identifikace (přečištění produktu PCR reakce a sekvenování) je možné využít servisních služeb některé z komerčních laboratoří např. Macrogen Europe B.V. (NL). Výsledné sekvence se pak porovnávají se sekvencemi známých druhů uloženými v databázi GenBank např. s pomocí software Blast.

Oživení materiálu, virulence, příprava inokula k testům

Pro testy rezistence rostlinného materiálu je nejvhodnější použít patogenní materiál izolovaný přímo z cílového provozu či zájmové oblasti. Pro testy se použije vždy více izolátů (např. 3) konkrétního druhu – nejčastěji se vzhledem k dominanci *P. cactorum* bude právě jednat o tento druh. Pro testy je vhodné použít čerstvý materiál patogenu. V případě, že byly kmeny konkrétního patogenu izolovány před delší dobou (řádově rok) a byly uloženy ve sbírce, lze odůvodněně předpokládat, že mohlo dojít k poklesu virulence během uchování vzhledem k umělým podmínkám a saprotrofní výživě mycelia. Proto je před vlastními testy vhodné nejen mycelium oživit, ale rovněž obnovit virulenci testovaných kmenů. Následující text postup těchto prací ozřejmuje.

Z kmenů uložených ve zkumavkách při 12 °C na OA agaru jsou jehlou sterilně odebrány segmenty agaru s myceliem a přeneseny na agarové plotny (V8 agar) a inkubovány při 20 °C ve tmě po dobu 7 dnů. Poté jsou narostlé kolonie vizuálně zkontrolovány, zda odpovídají určenému druhu a zda jsou prosté bakterií, případně dalších kontaminací. Pro pasážování se použijí listy či výhony hostitele, na kterém bude probíhat budoucí test. Zdravé a nepoškozené listy či cca 10 cm dlouhé segmenty výhonů se nejprve důkladně omyjí pod tekoucí vodou. Následující proces pak probíhá v aseptických podmínkách. Pletiva se dezinfikují ponořením do 96% etanolu na 20 s, poté se opláchnou v deionizované vodě, vysuší filtračním papírem a umístí do vlhké komůrky (nejlépe sterilní Petriho misky o průměru 20 cm či plastové misky). Vstup patogenu se usnadní mechanickým narušením pletiv hostitele – kutikula listů se prořízne skalpelem, případně se do výhonů raznicí vyrazí otvor o průměru cca 5 mm. Na vytvořená poškození se přiloží agarové terčíky s aktivním myceliem patogenu a v případě výhonů se překryjí kůrou a zaparafilují. Pletiva se inkubují ve tmě při 20 °C. Po objevení se hnědočerných nekrotických lézí (nejčastěji po 5–7 dnech) je kmen reisolován výše zmíněným postupem na selektivním médiu PARPNH, zkontrolována jeho čistota a konečně přeočkován na plotny V8A (viz izolace patogenního materiálu).

Kritické body přípravy patogenního materiálu

- Identita materiálu
- Virulence materiálu
- Čistota materiálu

3.2.2 Rostlinný materiál k testování

Nezbytně nutným východiskem pro spolehlivé testování je používání zdravého rostlinného materiálu s jasným původem a odrudovou pravostí. Tyto požadavky musí plnit jak podnože testované, tak podnože, které jsou používány pro porovnávání jako standardy.

Jako testovací standard jsou navrženy jabloňové podnože P14, CG11 a MM106. P14 je podnož s vysokou odolností, CG11 má střední odolnost a MM106 je citlivou podnoží. Těmito standardy je tak pokryto spektrum od citlivých až po velmi odolné, se kterým je možné v následně provedeném experimentu porovnat výsledky testované podnože. Jedná se pouze o jabloňové podnože, ale je možné je použít i jako standardy pro další podnože jádřovin i peckovin.

Jako alternativní podnože pro škálu velmi odolná, středně odolná, citlivá lze navrhnout např. B9, CG41, MM111, u peckovin např. myrobalán, Gisela 6, mahalebka apod. (blíže Černý a kol. 2020). Vždy je však vzhledem k všeobecně známé variabilitě patogenů ve virulenci vhodné ověřit testovací set v jednoduchém a finančně minimálně náročném pretestu (postačuje jednoduchý twig essay viz kap. 3.3.1).

Výchozí rostlinný materiál může sloužit k testování *in vitro* nebo k nádobovým testům. V obou případech musí být rostliny uchovávány v prostorech nebo plochách prostých infekce oomycetů *Phytophthora*. Jedná se o naprosto zásadní požadavek, který nemůže být porušen. Zásadní je i kontrola a používání neinfikované závlivkové vody. Ta by měla být ideálně z podpovrchových zdrojů, pravidelně kontrolovaná a případně preventivně filtrovaná nebo desinfikovaná. Je nutné zajistit, aby nemohlo dojít ke kontaminaci v žádném úseku od zdroje až po místo použití vody.

Způsoby udržování a získávání rostlin pro testování jsou v zásadě tři. Jsou to buď oddělky z hrůbkové matečnice, řízkovanci z bylinných nebo dřevitých řízků, případně podnože množené *in vitro*. Poslední dva typy jsou zpravidla dopěstovávány v různých sadbovačích.

1) Hrůbková matečnice – matečné rostliny podnoží jsou každý rok seřezávány pod úrovní substrátu řezem na patku. Následně jsou mírně přihrnuty. Po vyrašení nových letorostů jsou v závislosti na jejich délce rostliny přihrnovány vzdušným substrátem nejlépe např. perlitem, který je bezpečně sterilní, vzdušný i vododržný. Vyrůstající letorosty prokořeňují do nahrnutého substrátu a na konci vegetace po opadu listů mohou být opět řezem na patku odebírány. Platí podmínka, že oddělky musí být dopěstovány v prostoru, nejlépe ve skleníku, bez přítomnosti oomycetů. Výhodou tohoto matečného porostu je, že většina podnoží jádřovin je množena právě tímto způsobem a pokud budeme testovat novou podnož, s největší pravděpodobností obdržíme právě vzorek tohoto typu výpěstku. Pro porovnávání tak půjde o nejpodobnější materiál. Hlavní nevýhodou tohoto způsobu pěstování je jeho pracovní náročnost, pokud je prováděn v malém měřítku. Jedná se i o provoz, kde nejvíce hrozí riziko kontaminace oomycety. Přítomnost oomycetů by mohla významně zkreslit výsledky testů. Hrozí zde indukovaná rezistentní odpověď v průběhu twig essay, případně, a to zejména, i nechtěná kontaminace materiálu v nádobových pokusech. Proto ze symptomatických rostlin (chlorotizace listů, zmenšení, krnění a špatný vývoj výhonů) nesmí být materiál k testům odebrán. Před odběrem materiálu k testům je proto vždy nezbytné provést kontrolní odběry substrátu a kontrolní testy na přítomnost oomycetů metodou návnad (provádí se v laboratoři). Postup je následující: asi 30 cm³ půdního substrátu s kořinky z nejtěsnějšího okolí matečnice (směsný vzorek ze tří míst) se umístí do hluboké plastové misky, přelije se deionizovanou vodou 2–3 cm nad horní vrstvu substrátu a na volnou hladinu se položí očištěné, opláchnuté a povrchově dezinfikované listy rododendronů citlivého kultivaru (např. Cuningham White). Pokud je substrát kontaminován oomycety, ve vodním prostředí se vytvoří zoosporangia a

uvolněné zoospory infikují listy rododendronu. Po objevení se difúzních vodnatých skvrn na spodní straně listů se z listové čepele segmenty infikovaných pletiv vyříznou (cca 2×5 mm) a zpracují se stejným postupem jako pletiva krčků v kapitole 3.2.1. V případě potvrzení infekce materiál nesmí být testován. Hrůbková matečnice tedy vyžaduje zvýšenou kontrolu hygieny a periodické kontrolování, není-li kontaminována. Pokud jsou výsledky testů matečnice negativní, může sloužit k produkci materiálu pro testy *in vitro* (twig essay) i pro testy nádobové.

2) Řízková matečnice – jedná se o výsadbu podnoží, které jsou udržovány s krátkým kmínkem a nově vytvořené výhony jsou každoročně na patku seřezávány tzv. na hlavu. Vytvořené výhony nebo letorosty jsou následně používány pro množení dřevitými nebo bylinnými řízků. Detailní popis údržby a množení je popsán Nečasem a kol. (2016). Pro omezení rizika kontaminace je nutné řízkování do sadbovačů ve sklenicích v podmínkách bez přítomnosti oomycetů s možností dobré kontroly hygieny práce a nezávadnosti všech důležitých prvků jako pěstitelský substrát, voda a sadbovače, které musí být sterilní. Zakořenělé řízkovance lze využít pro nádobové pokusy. Výhony nebo letorosty z matečnice je možné využít pro laboratorní *in vitro* (twig essay) testy. Samozřejmostí je, že symptomatické matečnice se pro odběr materiálu (twig essay) nepoužijí.

3) *In vitro* množené rostliny – v případě, že je touto technologií podnik nebo testovací instituce vybavena, je možné připravit testovací rostliny i touto cestou. Rostlinný materiál získaný touto metodou má nejnižší riziko kontaminace a hodí se pro nádobové pokusy. V ideálním případě je vhodné porovnávat tímto způsobem namnožené standardy i testovanou podnož. Rostliny z tohoto způsobu množení je možné následně použít i pro napěstování výhonů nebo letorostů pro *in vitro* (twig essay) laboratorní testy. Tento způsob by pro své výhody v oblasti hygieny měl být preferovaným způsobem přípravy rostlinného materiálu pro následné testování. Vždy je však nutno provést kontrolní odběry substrátu před vlastními testy.

Všechny způsoby pěstování rostlin pro následné testování je možné použít, ale doba, kdy je možné dosáhnout požadovaného rostlinného materiálu pro testování je různá. Není možné reálně uvažovat o soustavném udržování hrůbkové matečnice nebo řízkové matečnice s vysokými hygienickými standardy, pokud by neměla i jiné komerční využití ve školkách, nebo by neměla jiný význam na výzkumných nebo testovacích pracovištích. Jako nejvhodnější se tedy v tomto ohledu jeví příprava rostlinného materiálu pomocí *in vitro* množení. Jde o relativně rychlý způsob rozmnožení a získání materiálu, ale zejména je u něj možné splňovat vysoké hygienické nároky. Pokud není materiál udržován přímo společností, která bude provádět testování je zpravidla možné v rámci Evropy *in vitro* množené rostliny sehnat. Často bývá i nově testovaná podnož množena a udržována v podmínkách *in vitro*. Tato možnost je tak potenciálně i nejrychlejší cestou, jak získat zdravý vstupní materiál testované podnože i standardů sloužících k porovnání.

Již z popisu přípravy rostlinného materiálu vyplývá, že v případě záměru testovat určitou podnož, je třeba počítat s poměrně dlouhou přípravnou fází sloužící k jeho obstarání případně napěstování (zpravidla minimálně 1 rok). Ideálním stavem je, že jak testovaná podnož, tak srovnávací standardy jsou pěstovány stejným způsobem a rovněž ve stejných podmínkách. Tehdy odpadají komplikace se způsobem hodnocení a interpretací získaných výsledků, jež mohou být ovlivněny i malými rozdíly např. ve způsobu hnojení. Pokud toho z časových nebo jiných důvodů není možné dosáhnout, je nutné toto hledisko uvážit a počítat s jeho vlivem. Následné hodnocení je možné provádět, ale s rizikem potenciálního zkreslení výsledku na testované škále a určitou mírou nejistoty při interpretaci výsledků.

Zásadní je při přípravě podnoží nepoužívat přípravky ochrany rostlin, hnojiva nebo pomocné rostlinné přípravky, které by mohly měnit odolnost rostlinného materiálu k infekcím cílovým organismem. Zejména je nutné se vyhnout systémovým fungicidům a přípravkům, jež mohou mít tento vliv, i když není přímo deklarován na etiketě. Jedná se mimo jiné o přípravky obsahující tzv. fosfonáty, jež jsou součástí i některých hnojiv a pomocných přípravků, a jejichž rezidua mohou v rostlinách přetrvávat několik let. Ochranné, byť dílčí, účinky těchto přípravků mohou mít extrémně dlouhodobý efekt. Příkladem mohou být produkty Basfoliar, Atlante, nebo dnes již jako fungicid registrovaný přípravek Alginure. Z registrovaných fungicidních přípravků by měly být dále vynechány ty s deklarovanou účinností vůči oomycetům (zejm. Acrobat MZ WG, Aliette 80 WG, Delan 700 WDG, Dithane DG Neotec Previcur Energy, Proplant, Ridomil Gold MZ Pepite). Podobně je zapotřebí se vyvarovat nadměrného hnojení dusíkem.

Ochranu rostlin je vhodné zajišťovat zejména vhodnými preventivními opatřeními (teploty, vlhkost vzduchu apod.) a v případě nutnosti používat pouze kontaktní fungicidy specificky účinné proti houbám a nikoliv oomycetům. Při aplikaci hnojiv používat jen základní jednoduchá hnojiva, u kterých lze vyloučit komplexní nejasné složení obsahující např. výše zmíněné fosfonáty. Insekticidní a akaricidní přípravky je možné používat bez omezení.

Před vlastním použitím jakéhokoliv rostlinného materiálu pro porovnávací testy je nezbytné provést jeho testování na přítomnost patogenů r. *Phytophthora*. Naprosto zásadní je tento požadavek zejména v případě nádobových testů, kde přítomnost patogenu může zásadním způsobem ovlivnit výsledky a prakticky není možné materiál před použitím v testu se 100% jistotou zbavit patogenů. Testování je možné objednat na pracovištích, kde s daným patogenem pracují a mají vyvinuty spolehlivé metody k jeho detekci, případně k určení konkrétního druhu. V současnosti testování materiálu provádí např. VÚKOZ Průhonice a VŠÚO Holovousy.

Rostliny k nádobovým testům by měly vypadat následovně. Z hrůbkové matečnice by se mělo jednat o jednoleté oddělky, ideálně tříděné na určitou velikostní třídu průměru kořenového krčku např. 6–8, 8–10 nebo 10–12 mm. Kořenová soustava by měl být zdravá, hustá a v rámci vybraných podnoží vyrovnaná. V případě řízkovanců by se mělo jednat rovněž o jednoleté zakořenělé rostliny s vyrovnaným růstem a prokořeněním. I v tomto případě je vhodné mít maximálně uniformní rostliny tříděné na určitou velikostní třídu průměru kořenového krčku. V podstatě shodné jsou nároky na *in vitro* množené podnože, tedy uniformní velikost a prokořenění. V každém případě je vhodné používat rostliny s délkou nadzemní části minimálně 20 cm.

Výhony k *in vitro* (twig essay) testům musí být zdravé, bez vnějších poškození a pokud možno uniformní ve svém příčném průměru. Listy během vegetace i povrch výhonů by měl být bez barevných odchylek. Pokusy je vhodné provádět koncem zimy na plně vyzrálých výhonech.

Lze předpokládat, že všechny nově zaváděné podnože budou vegetativně množenými podnožemi s uniformní genetickou informací. V případě testování generativně množených podnoží je možné jejich napěstování z výsevu při dodržení všech výše uvedených nároků na pěstování, hygienu, ochranu a uniformitu materiálu a v testu použít jednoleté nebo dvouleté semenáče. Díky jejich genetické variabilitě lze u těchto podnoží předpokládat i větší variabilitu v získaných výsledcích. Ta však bude odpovídat variabilitě, kterou lze předpokládat i při jejich použití na trvalých stanovištích po výsadbě a měla by poměrně dobře odpovídat realitě. Nutností pak ale bude testování vyššího počtu rostlin.

Potřebná množství materiálu pro nádobové pokusy

Pro jeden test je nezbytné pro každou jednotlivou podnož a variantu použít minimálně 20 ks na jedno opakování při minimálně třech opakováních. U každé podnože je testována varianta kontrolní bez inokulace a varianta inokulovaná. To nám dává pro každou podnož nutnost dopěstovat minimálně 120 ks vyrovnaných rostlin. Pokud budeme uvažovat, že pro dosažení vyrovnaně rostoucích rostlin před vlastní inokulací bude nutné počítat se zhruba 25% rezervou, bude nutné kontejnerovat 160 rostlin. Uvážíme-li dále nevyrovnanost matečného porostu, ze kterého budou rostliny získávány, a předpoklad dopěstování 50 % uniformních rostlin dostáváme se k číslu 320 ks. To je cílový počet rostlin, jenž by měl být množen, aby bylo dosaženo vysoké spolehlivosti zajištění výchozího materiálu pro následné testy. Pokud by mělo být testováno větší množství kmenů patogenů, je nutné tento počet adekvátně zvýšit. Obecně platí pravidlo, že čím vyšší budou počty testovaných rostlin a lepší pokrytí variability ve virulenci kmenů patogenu, tím lepších a spolehlivějších výsledků bude dosaženo.

Kritické body přípravy materiálu

- Odrůdová pravost, spolehlivost původu.
- Zdravotní stav výchozího materiálu.
- Udržení zdravotního stavu během pěstování rostlin pro testování a absence oomycetů.
- Maximální možná uniformita ve způsobu pěstování a péče o výchozí materiál, maximální uniformita materiálu vstupujícího do testu.

3.3 Vlastní testování

3.3.1 Testování *in vitro*

Metodika pokusu je založena na testech publikovaných Jeffersem a kol. (1981) a Scottem a kol. (1992) s dalšími úpravami. Vlastní testy virulence *in vitro* se provádí v 200/250ml Erlenmayerových baňkách nebo kádinkách s cca 30 až 50 ml (podle typu nádoby) agarového média. Je nutné, aby byly nádoby o něco vyšší, než segmenty testovaného materiálu a aby byly naplněny médiem stejnoměrně a do stejné výše. Jako médium je vhodné použít CMA (viz výše) s přidanými antibiotiky ampicilinem (250 mg/l) a rifampicinem (10 mg/l). Na střed média v každé nádobě se umístí cca 5mm kruhový segment s myceliem testovaných kmenů získaný z okraje aktivně rostoucí jeden týden staré kolonie na V8A médiu. V případě kontrolních nádob se jako inokulum použije pouze 5mm terčik média bez mycelia. Po inokulaci se nádoby inkubují jeden týden ve tmě v termostatu při 20 °C. Je nutné nádoby průběžně kontrolovat a případné kontaminované kusy z pokusu vyloučit.

Pokus je vhodné provést v předjaří. Výhony testovaného materiálu se nastříhají na cca 10 cm dlouhé segmenty (bezsuché, bez poškození atp.), vybírají se segmenty se shodným průměrem dle typu materiálu (ideálně 5–8 mm). Segmenty se povrchově sterilizují (7 min 10% SAVO, 1 min 96% EtOH) a 3× omyjí sterilní destilovanou vodou, tato část práce se již provádí v laminárním boxu. Spodní část segmentu (cca 0,5–1 cm) se z protilehlých stran seřízne do ploché špičky a odhalí se takto živá vodivá pletiva. Takto připravené segmenty se umístí do připravených nádob s narostlým myceliem tak, že se ve vertikální poloze zapíchnou do okraje rostoucí kolonie (3–4 segmenty/nádoba), poté se neprodyšně uzavřou alobalem. Po celou dobu práce je nutné dbát na dodržení směru růstu výhonů. U každé nádoby se zaznamená přesný čas inokulace výhonů. Pro kontrolu se využijí nádoby s médiem bez přítomného inokula, do kterých se výhony umístí stejným způsobem. Nádoby

s inokulovanými segmenty se umístí zpět do termostatu (20 °C) a průběžně se kontroluje rozvoj infekce a případných kontaminací (obr. 3).

Rozvoj infekce lze většinou dobře identifikovat změnou barvy pletiv v průběhu postupující kolonizace. Pokus se ukončuje po cca 7–10(14) dnech inkubace, kdy v nejvíce citlivé variantě je délka lézí cca 60–70 mm. Segmenty výhonů se vyjmou z nádob a opatrně se odstraní borka, aby došlo k odhalení vodivých pletiv a bylo zřetelné jejich poškození. Kolonizovaná pletiva jsou charakteristická barevnými změnami, přechod do pletiv zdravých je zpravidla velmi ostrý (obr. 3 vpravo). Okamžitě po odstranění borky se změří maximální délka nekrotizace na obou stranách segmentu (s plochým seříznutím), přičemž se musí vzít v úvahu hloubka zanoření segmentu do média. Místo kontaktu segmentu a povrchu agaru je obvykle velmi dobře patrné jako tenká linie. Délka lézí se měří na desetiny mm. Při každém měření (čtveřice segmentů v nádobě) se zaznamená přesný čas. Z kapacitních důvodů je možné segmenty po ukončení pokusu šokově zamrazit na –80 °C a vyhodnocování provádět postupně. Pro každý typ podnože je nutné otestovat minimální počet 20 segmentů (vhodnější je ovšem vyšší počet zejména u generativně množených podnoží), pokus je nezbytné 2× opakovat.

Přítomnost patogenu v nekrotickém pletivu se potvrdí reizolací (viz kapitola 3.2.1).



Obr. 3. Inkubace inokulovaných výhonů v Erlenmayerových baňkách a kádinkách (vlevo), odhalená pletiva segmentů výhonů při měření délky lézí (vpravo).

Kritické body provedení testu

- Sterilní podmínky.
- Průběžná kontrola vývoje pokusu.
- Rychlé vlastní měření.
- Zaznamenání přesné délky inkubace pro každou nádobu zvlášť.

3.3.2 Testování nádobovými pokusy

Založení testu

Druhou fází testování je využití nádobových testů. Tyto testy více odpovídají skutečné odolnosti nebo citlivosti jednotlivých odrůd, protože pracují s infekcí přes kořeny a kořenový krček, které jsou v reálných podmínkách hlavní vstupní branou infekce. Pro nádobové testy lze využít rostlinný materiál napěstovaný podle výše popsaných způsobů (viz kap. 3.2.2), tedy oddělky, řízkovance nebo *in vitro* množené rostliny. U generativně množených podnoží lze použít semenáče. Mělo by se ideálně jednat o jednoleté výpěstky, pokud možno všechny napěstované stejným způsobem a pěstované ve shodných podmínkách. Materiál musí být naprosto vyrovnaný a v bezvadném zdravotním stavu. Před zahájením pokusu je nutné provést orientační test na přítomnost oomycetů na pokusném materiálu. Mělo by být provedeno cca 10 nezávislých odběrů a následných testů (viz kap. 3.2.2) pro každou jednotlivou podnož tak, aby byla pokryta prostorová variabilita pěstební plochy. Pokud testy prokáží přítomnost patogenu, není smysluplné pokračovat v přípravě pokusu.

Při negativním výsledku může následovat hrnkování (kontejnerování) rostlin. Nejlépe během měsíce dubna se rostliny vysází do hranatých kontejnerů 9×9×14 cm. Ty jsou vhodné pro následné umístění do náplavových nádob. Jedna náplavová nádoba je používána jako jedno opakování. Do jedné nádoby se pak vejde až 32 rostlin. Je možné použít i větší kontejnery například velikosti 11×11×21 cm nebo i kulaté 2–3 litrové kontejnery, ty budou ale přinášet větší nároky na prostor. Ideálně by se mělo jednat o kontejnery tzv. růžarské, které jsou vyšší než širší a umožňují větší rozvoj kořenového systému rostlin při hustším sponu.

Pro výsadbu můžeme použít rašelinový substrát s upraveným pH na hodnotu 6,5 a zásobním hnojením 3–4 kg plného hnojiva na m³. Substrát musí být před použitím propařen, stejně tak musí být použity nové či důkladně omyté a vydezinfikované kontejnery a náplavové nádoby. Vše musí probíhat v podmínkách bez přítomnosti oomycetů tak, abychom s jistotou vyloučili nechtěnou kontaminaci rostlin.

Budeme-li uvažovat tři opakování po 20 rostlinách ve dvou variantách kontrolní a inokulované (+ jistá rezerva), je vhodné vysázet minimálně 80–100 rostlin od jedné podnože na jednu variantu ošetření (inokulace konkrétním kmenem patogenu či kontrola). Po nasazení se podnože ponechají růst zhruba jeden měsíc, aby vyrašily a dobře zakořenily. Udržují se ve stejných podmínkách a jsou standardně ošetřovány a provádí se zálivka (obr. 4). Zde je nutné podotknout, že po celou dobu od nasazení až po vyhodnocení pokusu platí stejné vysoké nároky na hygienu práce, kdy nesmí dojít ke kontaminaci zálivkovou vodou ani jinými způsoby.

Jakmile jsou rostliny prokořeněné a narůstají, je možné přistoupit k založení vlastního testu. Rostliny jsou přetříděny a jsou vybrány vyrovnaně rostoucí rostliny. Pro každou podnož je vybráno minimálně 60 rostlin (3×20 ks) pro jednu variantu ošetření (inokulace konkrétním kmenem patogenu či kontrola). Při standardně prováděném pokusu s testováním např. tří kmenů patogenu bude celkem testováno minimálně 240 rostlin.

Inokulace rostlin probíhá následovně. Z připravených Petriho misek s V8A agarem a inokulem příslušného druhu rodu *Phytophthora* jsou odebírány malé terčíky o průměru 5 mm, které jsou vkládány zhruba 1 cm hluboko pod povrch substrátu ke kořenovému krčku rostlin (obr. 5). Ke každé rostlině jsou vloženy tři inokulované agarové terčíky, které jsou mírně zahrnuty substrátem. Stejný postup je prováděn i u kontrolní varianty, zde jsou však vkládány terčíky sterilního agaru, které nejsou inokulovány patogenem. Inokulum se odebírá z cca 1–2 cm širokého růstového okraje kolonií testovaných kmenů pěstovaných cca 5–7 dnů na V8A pevném médiu.



Obr. 4. Pěstování podnoží určených pro následné testování.



Obr. 5. Inokulace, vkládání agarového terčíku do substrátu.

Rostliny jsou následně umisťovány do náplavových nádob. Jako náplavové nádoby se osvědčily velkoobjemové (60 l) obdélníkové černé nádoby s rozměry 40×69×28 cm bez otvorů (obr. 6). Tyto nádoby jsou následně pomocí malé technické úpravy ve spodní části osazeny malým ventilem, který umožňuje vypouštění náplavové vody. Nádoby mohou být následně umístěny na rošty nad náplavovými stoly. To umožňuje jednoduché vypouštění vody právě do náplavových stolů, kde může být voda sbírána a centrálně odváděna do dezinfekční kádě.



Obr. 6. Založení pokusu. Náplavové nádoby, do kterých jsou umístěny podnože po inokulaci, slouží k periodickému zaplavitelní kontejnerů vodou.

Závlahový režim

Rostliny umístěné do náplavových nádob jsou ihned po založení pokusu naplaveny na 48 hodin. Následně jsou periodicky v týdenním intervalu naplavovány vždy na 24 hodin. Naplavovány jsou shodně rostliny inokulované i kontrolní bez inokulace. Naplavení slouží k vytvoření stresu kořenového systému a k vytvoření vhodných podmínek pro infekci rostlin oomycety.

Naplavení se provádí do výšky substrátu. Napouštění vody musí být pozvolné, aby substrát stíhal nabírat vodu, zejména pokud by byl přeschlý. Po uplynutí stanoveného času naplavení se následně voda z jednotlivých náplavových nádob vypustí. V případě nádob s inokulovanými rostlinami je nutné tuto vodu nevypouštět do kanalizace, ale provést nejprve její desinfekci ve sběrné kádě pomocí chlomanu sodného (Savo 150 ml na 500 l odpadní vody). Po několika hodinách se může voda vypustit do kanalizace. Voda sbírána z rostlin neinokulovaných se může vypouštět přímo, pokud je celá odpadní cesta mimo možnost kontaminace vodou z inokulovaných rostlin. Jak již bylo zmíněno, naplavení probíhá jednou týdně. Pokud panuje velmi teplé počasí, rostliny rychle transpirují a dochází k vysychání substrátu, je možné v intervalu mezi jednotlivými naplaveními rostliny standardním způsobem zalévat. Naplavování by mělo probíhat celou vegetační sezónu, pokud není pokus ukončen dříve z důvodu rychlé reakce na infekce a uhynutí infikovaných rostlin. Je třeba i zde

upozornit na dodržování hygieny během naplavování a odpouštění tak, aby nedocházelo ke kontaminaci kontrolních kádí například odstříkující vodou. Je vhodné, pokud jsou infikované a kontrolní porosty odděleny, buď prostorově nebo technicky, ale ostatní podmínky zůstávají stejné.

Pokus by měl probíhat v průběhu vrcholu vegetačního období (červen–srpen), pokud možno při regulované teplotě. Teplota by měla být nastavena na optimální teplotu růstu mycelia patogenu, což bývá obvykle kolem 22 °C (liši se dle druhu, např. při testu *P. syringae*, což je druh dominující v chladnějších oblastech, je vhodné nastavit teplotu kolem 18 °C). Teploty nesmí překračovat příliš vysoké hodnoty (cca 35 °C), protože může dojít ke snížení aktivity mycelia patogenu či dokonce k jeho odumření.

Hodnocení

Při zakládání pokusu v době inokulace je vhodné upravit rostliny tak, aby měly pouze 5 letorostů vyrůstajících z jedné rostliny. Pomůže to následnému hodnocení růstu nadzemní části, respektive se sníží jeho časová náročnost, jelikož na každé rostlině budeme zaznamenávat maximálně 5 hodnot. Pokud bychom tuto úpravu neprovedli, je možné na některých rostlinách očekávat vysoké počty krátkých letorostů, což by prodloužilo interval při následném měření.

Během vegetace probíhají v týdenních intervalech orientační vizuální kontroly stavu porostu a vývoje reakce na infekci. Je možné v měsíčních intervalech provádět měření nárůstu letorostů, kdy je u každé rostliny vždy směrem od nejvýše položeného letorostu měřena a zaznamenávána jejich délka. Měsíčním měřením je možné zaznamenat, kdy dochází k nejsilnějšímu nástupu efektu infekce na růst rostlin, je však pracovně náročná. Pokud nemáme zájem na exaktním zjištění nástupu redukce růstu a stačí nám vizuální hodnocení, je možné toto měření provést až na konci pokusu jednorázově před destruktivním hodnocením kořenového systému. Během vegetace je vhodné sledovat vývoj kořenového systému a namátkovými kontrolami rostlin zaznamenávat výskyt barevných změn kořenů, případně výskyt nekrotizace kořenového krčku. Během vegetační zkoušky, nebo jen na její závěr se zaznamenává mimo měření celkové délky letorostů i vizuální hodnocení každé rostliny na stupnici 1–5:

- 1 - standardně rostoucí zdravá rostlina,
- 2 - mírná redukce vitality (první příznaky žloutnutí listů, kratší výhony),
- 3 - střední redukce vitality (významné žloutnutí listů, významná redukce růstu, první vadnutí letorostů),
- 4 - silná redukce vitality (většina letorostů zvadlých nebo uschlých, žloutnutí většiny listů),
- 5 - uhynulá rostlina.

Před následným rozbořením kořenového systému se odebírají vzorky na reizolace patogenu. Cílem je potvrdit přítomnost inokulovaného patogenu v ošetřených variantách a jeho absenci v kontrole, případně ověřit, jestli nedošlo ke kontaminaci jiným druhem. Vzorky se odebírají směsné ze substrátu (substrát s jemnými kořínky) nebo z krčků z nekrotizovaných pletiv několika rostlin (3–5 v každém opakování) a zpracovávají se obdobně, jak je popsáno v příslušných kapitolách 3.2.1 a 3.2.2.

Po vyhodnocení nadzemní části následuje vyhodnocení kořenového systému. Každá rostlina je opatřena identifikační visačkou. Většinu nadzemní části odstraníme a ponecháme jen asi 10 cm úsek kmínku pro snadnou manipulaci a označení. Rostliny, resp. kořenové systémy následně jednu po druhé zbavujeme pěstební substrátu tak, abychom v minimální míře poškodili kořeny. První nejhrubší zbavení substrátu je možné provést jeho oklepáváním

„na sucho“, nebo „na mokro“ vyplavováním v kádi s vodou. Následně je kořenový systém vyplachován v čistší vodě, aby byl zcela zbaven substrátu (obr. 7 a 8). Rostliny jsou postupně umisťovány na vhodnou podložku, kde je provedena fotodokumentace a je možné provést vizuální hodnocení stavu kořenů. Zaznamenává se velikost, hustota a rovněž barva kořenů a výskyt příznaků infekce (odumřelé hnědě či černě zbarvené kořeny). Velmi vhodné je zaznamenání procentuálního podílu hniloby kořenů.



Obr. 7. Vyplavování substrátu z kořenového systému pokusných rostlin.



Obr. 8. Propláchnutý kořenový systém podnože Cornell Geneva 11.

Kořeny jsou po lehkém povrchovém osušení rozděleny na hlavní kořen a vedlejší kořeny. Všechny kořeny nižšího řádu (vedlejší kořeny) jsou odstřiženy a zbylá část od kořenového krčku po poslední významné rozvětvení je považována za hlavní kořen. Následně jsou hlavní kořen i vedlejší kořeny zváženy v čerstvém stavu (tzv. živá hmotnost). Poté se hlavní kořen rozstříhne podélně na dvě poloviny, aby mohl lépe vysychat. Obě části, tedy hlavní i vedlejší kořeny, se vloží do papírových sáčků, v kterých jsou vkládány do sušičky. Tam jsou vysušeny na konstantní hmotnost. Zpravidla postačují 3 dny při teplotě 80 °C. Následně jsou zvlášť hlavní a vedlejší kořeny zváženy v suchém stavu.

Po získání všech údajů je možné provést statistickou analýzu a porovnání hodnot testované podnože s hodnotami srovnávacích standardních podnoží, na jejichž základě je stanoveno, jedná-li se o podnož málo, středně nebo velmi citlivou.

Je opět nutné podotknout, že i při ukončovacích pracích je nutné dodržovat hygienu, aby nedocházelo ke kontaminaci testovaným patogenem. Veškeré pěstební i pracovní prostory, proplachovací kádě, květináče a další materiály musí být desinfikovány. Pracovníci musí používat obuv, která je při vstupu a výstupu na pracoviště desinfikována. Rovněž substrát, který zbude po čištění kořenových systémů, je nutné desinfikovat. Zde se doporučuje desinfekce chemickým fumigantem Basamid Granulát (účinná látka dazomet) postupem uvedeným na etiketě přípravku, případně Savem. Materiál se poté odveze na skládku. Veškeré organické zbytky je nejvhodnější likvidovat pálením.

Kritické body nádobových pokusů

- Udržení hygieny práce po celé období vegetačního pokusu.
- Udržení srovnatelných podmínek pro kontrolní a inokulované varianty.
- Udržení vhodných teplot, zabránění přehřátí.

3.4 Statistické vyhodnocení

3.4.1 Vyhodnocení *in vitro* testů porovnávajících citlivost podnoží

Před vlastním vyhodnocením testu je nutné provést přípravu dat. Na každém vzorku (segmentu) se provádí dvě měření. Vzhledem k jejich obvyklé vysoké korelaci (v rámci testovaného souboru $r = 0,87$) s nimi nelze zacházet jako s nezávislými a pro účely dalšího zpracování se každá dvojice měření nahradí jejich aritmetickým průměrem. Dále se vzhledem k různé délce inkubace provede korekce na rozdílnou dobu trvání pokusu. V krátkém intervalu pokusu lze považovat růst mycelia za lineárně závislý na čase, proto se korekce provede dle vzorce

$$y_n = \frac{t_n}{t} y,$$

kde t je skutečná doba trvání pokusu, t_n je normovaná doba (10 dní), y je skutečná míra poškození a y_n je míra poškození přepočtená na normovanou dobu.

Délka lézí, jakožto veličina růstová, je zpravidla veličinou s normálním rozdělením pravděpodobnosti. Dále použité metody zpracování jsou navíc dosti robustní vůči porušení předpokladu robustnosti, jiné korekce dat tedy nejsou potřebné.

Vyhodnocení statistické významnosti rozdílů délky lézí mezi různými skupinami (podnožemi, kmeny a kombinacemi podnoží a kmenů) se provádí metodou mnohonásobného porovnání pomocí Welchových testů s Holmovou korekcí (Anděl 2019). Tato metoda je zvolena z důvodu velkých rozdílů ve variabilitě jednotlivých vzorků. Výsledky jsou nejlépe prezentovány formou homogenních skupin na hladině významnosti 0,05.

3.4.2 Vyhodnocení nádobových testů

V rámci nádobových testů je obvykle vyhodnocováno více veličin. Dvě z nich – délka výhonů a hmotnost sušiny kořenů – jsou spojité růstové veličiny. Jejich zpracování se řídí zásadami popsány v sekci 3.4.1.

Dalšími hodnocenými veličinami může být počet odumřelých a počet poškozených rostlin na konci pokusu. V obou případech se jedná o veličiny s binomickým rozdělením pravděpodobnosti. Statistická významnost rozdílů v počtu mrtvých, resp. poškozených rostlin se v tomto případě vyhodnocuje metodou mnohonásobného porovnání veličin s binomickým rozdělením (Anděl 2019). Podíly mrtvých, resp. poškozených, rostlin ošetřených různými způsoby označíme za statisticky významně odlišné, pokud platí následující nerovnost:

$$\left| \arcsin \sqrt{\frac{X_i}{n_i}} - \arcsin \sqrt{\frac{X_j}{n_j}} \right| \geq \sqrt{\frac{1}{8} \left(\frac{1}{n_i} - \frac{1}{n_j} \right)} q_{k,\infty}(\alpha)$$

kde X_i a X_j jsou počty mrtvých rostlin při i -tém, resp. j -tém způsobu ošetření, n_i a n_j jsou odpovídající výchozí počty rostlin, k je počet způsobů ošetření a $q_{k,\infty}(\alpha)$ je kritická hodnota studentizovaného rozpětí na hladině významnosti α .

Při testech jsou zjišťovány také kategoriální veličiny nabývající více hodnot než dvou, přičemž tyto hodnoty jsou jistým způsobem uspořádané. Příkladem je vizuální hodnocení zdravotního stavu rostlin na 5stupňové škále. Vyhodnocení je v takovém případě založeno na ordinálním regresním modelu (Agresti 2002):

$$\text{logit}(P(Y \leq j)) = \log \frac{p_1 + \dots + p_j}{p_{j+1} + \dots + p_J} = \beta_{0,j} + \beta x,$$

kde p_j je pravděpodobnost, že hodnota závislé proměnné Y nabude hodnoty j , J je počet možných stavů veličiny Y , x je způsob ošetření a $\beta_{0,1}, \dots, \beta_{0,J}, \beta$ jsou regresní koeficienty. Významnost rozdílů mezi způsoby ošetření lze opět znázornit pomocí homogenních skupin.

Kritické body statistického vyhodnocení

- Dostupnost korektních dat – v průběhu pokusu musí být pro všechny způsoby ošetření zajištěny shodné podmínky.
- Je vhodné zajistit obdobné počty měření pro všechny způsoby ošetření.

3.5 Použitelné alternativní metody testování

Testování podnoží, pokud má poskytnout dostatečně vypovídající výsledky musí proběhnout ve dvou pokusech (výsledky musí být nezávisle verifikovány). Navržené schéma počítá v prvním pokusu s testováním *in vitro*, které je jednodušší a podstatně levnější a teprve pro druhý stupeň je navrženo testování *in planta*, které poněkud více odpovídá přirozenějšímu procesu infekce podnoží a lze je pro vyšší náročnost provádět spíše s podnožemi, které z prvního kola testů vyšly jako potenciálně odolné. Navržené techniky patří mezi

nejpoužívanější, přesto se používají i další postupy, které mohou poskytnout stejně dobré výsledky (mohou mít ovšem jistá omezení) a v případě možností mohou být rovněž použity. V následujícím textu jsou tyto postupy v jednoduchosti přiblíženy spolu s příslušnými citacemi tak, aby mohly být případné doplňující informace snadno získány a metody použity. Vždy před provedením vlastního pokusu je ovšem zapotřebí provést přípravný pokus s omezeným množstvím testovaného materiálu pro ověření podmínek a metodiky.

3.5.1 Inokulace *in vitro*

Metoda testování *in vitro* detailně popsaná v kap. 3.2.1 může být modifikována na základě pokusu Guzmána a kol. (2007) a využita v méně vybavených provozech, které ovšem disponují alespoň minimálními hygienicky vyhovujícími prostory. Segmenty výhonů odebrané a podobně ošetřené jako ve zmíněném pokusu se vertikálně zapíchnou do sterilního (vydezinfikovaného) plastového kontejneru vyplněného do dvou cm výšky inokulovaným substrátem. Substrát sestává z 56% (v/v) sterilního vermikulitu, 19% suspenze s inokulem testovaného kmene (připraví se zvláště v laboratoři a obsahuje $4-5 \cdot 10^6$ myceliálních fragmentů na 1 ml suspenze), 14% sterilního zeleninového bujónu (např. 200 ml V8-džusu, 2 g CaCO_3 a 800 ml sterilní H_2O ; Mircetich a Matheron 1976) a 11% sterilní destilované vody. Inokulovaný substrát lze připravit i dalšími způsoby na základě např. inokulovaného prosa (Mircetich a Matheron 1976 aj., viz níže). Délka lézí se měří zpravidla po dvou týdnech inkubace při 20 °C. Inkubace probíhá v uzavřené místnosti za dostatečných hygienických podmínek a minimalizace kontaminace.

Jinou vhodnou modifikací pokusu je test následující. Upravené a povrchově vydezinfikované segmenty podnoží (viz kap. 3.2.1) se v laminárním boxu či jiných hygienicky dostatečně odpovídajících podmínkách (čistá uzavřená místnost) dále zpracují. Do prostřední části segmentu se sterilně vyrazí raznicí mělký otvor až na xylém a pletiva se odstraní. Do vzniklé rány se myceliem dovnitř vloží terčík agarů o průměru 5 mm odebraný z aktivního růstového okraje 7 dnů staré kolonie testovacího kmene. Na ránu se přiloží zpět kůra a rána se zparafilmuje (Bielenin a Jones 1988). Inokulované segmenty se vloží do vlhkých komůrek inokulovaným bodem nahoru na dostatečně silnou vrstvu sterilní buničiny adekvátně navlhčené sterilní vodou. Vlhká komůrka se ihned překryje potravinářskou fólií. Inkubace trvá zpravidla dva týdny (nutno ověřovat vývoj lézí) při cca 20 °C, pokud možno ve tmě. Po ukončení pokusu se odstraní pokožka a změří se délka lézí (odečte se průměr rány).

3.5.2 Pokusy *in planta*

V případě, že podnik nedisponuje dostatečným laboratorním zázemím pro provádění *in vitro* testů, ale např. pouze jednoduchým skleníkovým provozem či dostatečně vhodnými prostory, lze tuto metodu nahradit podobným postupem. Jako testovací materiál se používají celé kontejnerované podnože a patogen se přímo inokuluje na rostlinu. Místo inokulace se povrchově dezinfikuje otřením buničinou namočenou v 96% etanolu a v místě se vyrazí sterilní raznicí 6mm široký otvor až na dřevo a pletiva se odstraní. Do vzniklé rány se myceliem dovnitř vloží terčík agarů o průměru 5 mm odebraný z aktivního růstového okraje 7 dnů staré kolonie testovacího kmene. Na ránu se přiloží zpět kůra a rána se zparafilmuje (Bielenin a Jones 1988). Inkubace trvá dva týdny při cca 20 °C a teplota nesmí výrazně překročit optimum růstu testovaného kmene, čili cca 25 °C. Na konci testu se parafilm sejme, jemně se obnaží vodivá pletiva a změří se délka léze, případně se plocha léze obkreslí přes pauzovací papír (poté se oskenuje a plocha změří pomocí vhodného softwaru, např. ImageJ).

Od výsledných hodnot se odečte délka (plocha) rány vyražené do pletiv a vyhodnotí se příslušnými metodami (viz kap. 3.4).

Pokud prostorové možnosti limitují rozsah testů, lze provést směsnou inokulaci více kmenů konkrétního druhu patogenu. V takovém případě je vhodné napěstovat inokulum testovaných kmenů v samostatných nádobách a smíchat je ve stejném poměru. V rámci pokusu ovšem do testu vstupují potenciálně kompetiční vztahy mezi jednotlivými kmeny (kompetice nemusí souviset s virulencí ale např. s rychlostí růstu mycelia apod.), což může ovlivnit výsledky testu.

Pro přípravu inokula lze použít následující postup, případně jeho variace. Sterilní plastové nádoby o objemu 0,5 l se naplní 250 ml sterilního vermikulitu a 20 ml sterilních ovesných vloček. Směs se přelije 175 ml V8 bujónu (200 ml V8-džusu, 2 g CaCO₃ a 800 ml sterilní H₂O) a zaočkuje se čistou kulturou příslušného kmene (segmenty agarů s myceliem z růstového okraje kolonie na agarové plotně). Po 4–6týdenní inkubaci se inokulum vypláchne sterilní vodou a odstraní se zbytky živin obsažených ve V8 bujónu. Poté se inokulum přidává jako 1% příměs (objemová) do sterilního pěstebního substrátu, do kterého se následně přesazují zakořenělé řízkovance (Mircetich a Matheron 1976, Matheron a Mircetich 1985). Při inokulaci se osvědčilo zvýšit podíl inokula v substrátu na cca 4–5 %. Namísto popsaného postupu lze použít jako nosné médium např. loupané proso, kdy se sterilizuje směs 700 ml zrn prosa s 50 ml bujónu (1 l zeleninového Joker džusu a 14,1 g CaCO₃; Marçais a kol. 2011), případně samotné proso (Robin a kol. 2001), které se po sterilizaci inokuluje cca deseti 8mm segmenty agarů s myceliem odebranými z růstového okraje čisté kultury na Petriho misce na 100 ml inokula (Robin a kol. 2001). Autoklávuje se 2× po 20 minutách při 120 °C. Inkubace vždy trvá minimálně 4 týdny ve tmě v termostatu při 20 °C, před inokulací pěstebního substrátu je vždy nutné zkontrolovat stav inokula, zda je dobře prorostlé myceliem patogenu, a zda nedošlo ke kontaminaci např. druhy z r. *Penicillium* či *Aspergillus*. Kontaminované inokulum se nepoužívá. Do výsledné směsi se do přiměřených kontejnerů sází zakořenělé oddělky, řízky či semenáče. Kultivace pak dále probíhá, jak je uvedeno v hlavní kapitole 3.3.2.

V případě minimálního laboratorního vybavení lze provést jednoduchý experiment na záhonu, který je vlastně obdobou twig essay, kdy se inokulují přímo kmínky podnoží. V místě inokulace (báze kmínku) se povrchově dezinfikuje 96% etanolem, sterilně se do kůry raznicí vyrazí 6mm kruhový otvor až na xylém a do rány se vloží odpovídající terčík agarů s myceliem testovaného kmene patogenu dovnitř. Rána se uzavře vyraženým terčíkem kůry a zparafilmuje (Elena a Tsipouridis 2000). Pracuje se za suchého bezvětřného počasí, kmínky se inokulují na jednu stranu (nejlépe severní). Po zparafilmování je vhodné kmínky ovázat PE páskou jako ochranu před povětrnostními vlivy. Test může probíhat několik měsíců (zpravidla 2–3, v průběhu se kontroluje rozvoj poškození), po ukončení pokusu lze měřit délku léze či její plochu (viz výše). V případě tohoto testu lze doporučit navýšení počtu sazenic, případně nezávislé opakování testu. V průběhu testu je zapotřebí dbát na hygienu provozu, aby nedošlo k nechtěnému úniku patogenu. Výhodou testu je snadné provedení prakticky v jakýchkoliv podmínkách, nevýhodou pak fakt, že metodika hůře odráží přirozený způsob infekce. Avšak vzhledem k tomu, že velká část infekcí proběhne přímo na krčcích či kořenových korunkách, má tento typ testu rovněž uplatnění.

4 Srovnání novosti postupů

Metodika pojednává o testování podnoží ovocných druhů na citlivost k patogenům rodu *Phytophthora*. Určení citlivosti/odolnosti jednotlivých podnoží vůči lokálním kmenům patogenů je jedním z pilířů dlouhodobě efektivní integrované ochrany sadů vůči těmto patogenům. Toto hodnocení nebylo dosud v ČR prováděno, v praxi se přebíraly výsledky dosažené v zahraničí, či se spoléhalo na případné empirické zkušenosti z praktického pěstování, což v současné době, kdy začínají být ovocnářské provozy vystaveny masivní invazi patogenních oomycetů, již nedostačuje. Nadto situaci v ovocnářství komplikuje extrémní zahraniční konkurence, tlak na maximální úspory a postupné snižování počtu efektivních přípravků na ochranu rostlin.

Metodika popisuje celý průběh testování a metodiku práce a zaměřuje se zejména na klíčové prvky postupů, které je nutné dodržet pro spolehlivé testování a dosažení žádoucích výsledků. Metodika dopodrobna uvádí aspekty a rizika, které je nutné mít na paměti a které by mohly experimenty narušit a výrazně ovlivnit výsledky, či je zcela znehodnotit. Novost postupů je spatřována zejména v zaměření na ovocné druhy (podnože) s přihlédnutím k jejich specifickým v oblasti rozmnožování a jejich použití. V neposlední řadě je novost spatřována v zapracování i alternativních zahraničních postupů testování, které nabízí jako metodickou alternativu. Důležitým aspektem je zohlednění výsledků vlastního výzkumu a získaných vlastních zkušeností, jež zajišťují komplexnost a novost metodiky.

5 Popis uplatnění metodiky

Certifikovaná metodika je určena ovocným školkařům a pěstitelům ovoce v případě, že budou uvádět na trh, nebo mít zájem o využívání nové podnože, a budou chtít znát její citlivost k patogenům rodu *Phytophthora*. Její použití je možné i pro testování již používaných podnoží. Na základě této metodiky mohou pěstitelé či školkaři při přiměřeném vybavení provádět testování sami (alespoň do jisté míry), nebo ve spolupráci či na objednávku u výzkumných pracovišť, testovacích stanic či univerzit. Metodiku je rovněž možné využívat i dlouhodobě ke šlechtitelským a výzkumným účelům. Informace v ní uvedené a popsané lze uplatnit i v okrasném školkařství (šlechtění na odolnost např. u vřesovcovitých). Je zdrojem informací a metodickým postupem nejen pro pracovníky školkařských a ovocnářských podniků, případně testovacích organizací, ale i pro pedagogy vysokých škol a rovněž pro jejich studenty. Metodika je vydána v elektronické podobě a bude volně k dispozici všem zájemcům o danou problematiku na internetových stránkách VŠÚO Holovousy s.r.o.

6 Ekonomické aspekty

Z pohledu uplatnění metodiky a jejího ekonomického dopadu do školkařské a ovocnářské výroby vycházíme z odhadů o současných i potenciálních budoucích ztrátách. Výsledky řešeného projektu TH02030521 prokázaly, že více než 60 % zásilek podnoží ve školkařském sektoru je kontaminováno patogeny r. *Phytophthora*. Vlastní výskyt napadených rostlin v těchto zásilkách je nižší, ale přesto je jasné, že kontaminace porostů ve školkách a následně v sadech je velmi častá a rozšíření těchto patogenů se stává plošným problémem. Za daných podmínek se navíc předpokládá nárůst jeho významu.

Jelikož není možné spoléhat na současná opatření uplatňované integrované ochrany v oblasti kontaminace výsadbového materiálu, je nanejvýš potřebné zajistit, aby při výskytu patogenu byla odolnost používaných rostlin, zejména jejich podnoží, co nejvyšší. To může jednak bránit většímu šíření patogenu, ale především omezit potenciální ekonomické ztráty ve školkách a sadech. Konzervativní odhad vycházející z plošného testování prováděného v rámci řešeného projektu předpokládá, že minimálně 5 % mladého výsadbového materiálu je těmito patogeny napadeno. V letech 2014–2019 bylo každoročně vysazováno více než 300 ha ovocných výsadeb (Buchtová 2019). Rozvoj choroby je samozřejmě závislý na několika dalších faktorech, ale pokud bychom předpokládali, že se choroba může rozvinout na 1 % vysázené plochy, jedná se při zahrnutí všech investičních prostředků a budoucích ztrát na výnosech o každoroční ztrátu v řádu statisíců nebo jednotek milionů Kč. V případě školkařské výroby je rovněž odhadováno snížení ztrát v řádu statisíců až milionů Kč ročně.

Pokud bude na základě testování a výběru odolných podnoží na rizikových plochách, či jednoduše z preventivních příčin, prioritně těchto podnoží vhodně plošně využíváno, je možné tyto ztráty významně redukovat. Velmi závažným faktem je, že k šíření patogenů r. *Phytophthora* v současnosti ve zvýšené míře dochází i materiálem pocházejícím ze zahraničí a s probíhající globalizací obchodu s výpěstky nelze vyloučit i výskyt nových druhů nebo více virulentních genotypů druhů přítomných. Toto potenciální riziko může být využíváním odolných podnoží výrazně redukováno. Výhodou využívání odolných podnoží založených na lokálních výsledcích testování je, že jejich uplatňování s sebou nepřináší pěstiteli žádné další náklady, pomineme-li případné licenční množitelské poplatky u právně chráněných odrůd.

7 Seznam použité literatury

- AGRESTI, A. *Categorical Data Analysis, 2nd ed.* Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2002. ISBN: 978-0-471-45876-0.
- ANDĚL, J. *Statistické metody.* Praha: Matfyzpress, 2019. ISBN: 978-80-7378-381-5.
- BIELENIN, A. a A. L. JONES. Prevalence and Pathogenicity of *Phytophthora* spp. from sour cherry trees in Michigan. *Plant Disease*. 1988, č. 72, 473–476. DOI: 10.1094/PD-72-0473
- BUCHTOVÁ I. *Situační a výhledová zpráva. Ovoce.* Praha: MZe ČR, 2019. ISBN 978-80-7434-526-5.
- ČERNÝ, K. a kol. *Integrovaná ochrana ovocných dřevin před patogeny z r. Phytophthora.* Průhonice: VÚKOZ, v.v.i., 2020 [v tisku].
- ELENA, K. a K. TSIPOURIDIS. Evaluation of resistance of stone fruit rootstocks to *Phytophthora* crown rot. *J. Phytopathology*, 1999, č. 37, 254–258. DOI: 10.1046/j.1439-0434.2000.00514.x.
- ERWIN, D. C. a O. K. RIBEIRO. *Phytophthora disease worldwide.* St. Paul: APS Press, 1996. ISBN: 978-0890542125.
- GALLEGLY, M. E. a C. HONG. *Phytophthora, identifying species by morphology and DNA fingerprints.* St. Paul: APS Press, 2008. ISBN: 978-0-89054-364-1.
- GUZMÁN, G., LATORRE, B. A., TORRES, R. a W. F. WILCOX. Relative susceptibility of peach rootstocks to crown gall and *Phytophthora* root and crown rot in Chile. *Ciencia e investigación agraria*, 2007, č. 34, 31–40. DOI: 10.4067/S0718-16202007000100004.
- HARRIS, D. The *Phytophthora* diseases of apple. *Journal of Horticultural Science*, 1991, č. 66, 513–44. DOI: 10.1080/00221589.1991.11516181.
- JEFFERS, S. N., ALDWINCKLE, H. S., BURR, T. J. a P. A. ARNESON. Excised twig assay for the study of apple tree crown rot pathogens *in vitro*. *Plant Disease*, 1981, č. 65, 823–825. DOI: 10.1094/PD-65-823.
- MARÇAIS, B., CAËL, O. a C. DELATOUR. Interaction between root rot basidiomycetes and *Phytophthora* species on pedunculate oak. *Plant Pathology*, 2011, č. 60, 296–303. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2010.02378.x.
- MATHERON, M. E. a S. M. MIRCETICH. Pathogenicity and relative virulence of *Phytophthora* spp. from walnut and other plants to rootstocks of English walnut trees. *Phytopathology*, 1985, č. 7, 977–981. ISSN: 0031-949X.
- MIRCETICH, S. M. a M. E. MATHERON. *Phytophthora* root and crown rot of cherry trees. *Phytopathology*, 1976, č. 66(5), 549–558. ISSN: 0031-949X.
- NEČAS, T., NÁMĚSTEK, J., LAŇAR, L., LÁČÍK, J., ONDRÁČEK, I., MÉSZÁROS, M., WOLF, J. a J. KOSINA. *Metody řízkování podnoží vybraných ovocných druhů.* Holovousy: VŠÚO Holovousy s.r.o., 2016. ISBN: 978-80-87030-52-3.
- ROBIN, C., CAPRON, G. a M. L. DESPREZ-LOUSTAU. Root infection by *Phytophthora cinnamomi* in seedlings of three oak species. *Plant Pathology*, 2001, č. 50, 708–716. DOI: 10.1046/j.1365-3059.2001.00643.x.
- SCOTT, E. S., WICKS, T. J. a T. C. LEE. The development of an assay for resistance to *Phytophthora cambivora* in almond rootstocks using shoots excised from tissue cultures. *Plant Pathology*, 1992, č. 41, 639–645. DOI: 10.1111/j.1365-3059.1992.tb02465.x.
- SUTTON, T. B., ALDWINCKLE, H. S., AGNELLO, A. M. a J. F. WALGENBACH. *Compendium of Apple and Pear Diseases and Pests, 2nd ed.*, St. Paul: APS Press, 2014. ISBN: 978-0-89054-433-4.
- UTKHEDE R. S. Biology and control of apple crown rot caused by *Phytophthora cactorum*: A review. *Phytoprotection*, 1986, č. 67, 1–13. ISSN: 0031-9511.

8 Seznam publikací, které předcházely metodice

ČERNÝ, K. a kol. *Integrovaná ochrana ovocných dřevin před patogeny z r. Phytophthora*. Průhonice: VÚKOZ, v.v.i., 2020 [v tisku].

ČERNÝ, K., GRÍGEL, J., HRABĚTOVÁ, M., HAVRDOVÁ, L. a D. ZAHRADNÍK. Efficacy of Fungicides for Potential Control of the Most Frequent *Phytophthora* in Czech Nurseries. In: *Diseases and Insects in Forest Nurseries. Proceedings and abstracts*. Kuşadası: IUFRO Working Party 7.03.04, 2018, s. 7–11.

ČERNÝ, K., MRÁZKOVÁ, M. a M. HRABĚTOVÁ. Význam patogenů z r. *Phytophthora* ve školkařství a možnosti ochrany, I. díl. *Zahradnictví*, 2017, č. 16(9), 50–52. ISSN: 1213-7596.

ČERNÝ, K., MRÁZKOVÁ, M. a M. HRABĚTOVÁ. Význam patogenů z r. *Phytophthora* ve školkařství a možnosti ochrany, II. díl. *Zahradnictví*, 2017, č. 16(10), 38–41. ISSN: 1213-7596.

ČERNÝ, K., MRÁZKOVÁ, M., HAVRDOVÁ, L., STRNADOVÁ, V. a M. HRABĚTOVÁ. Výskyt patogenů r. *Phytophthora* na dřevinách ve veřejné zeleni a v zahradnických provozech jako hlavních zdrojích infekce a možná opatření. In: BARTA, M. a E. ONDRUŠKOVÁ, eds. *Dřeviny vo verejnej zeleni 2018. Recenzovaný zborník príspevkov z vedeckej konferencie*. Nitra: Ústav ekológie lesa UAV 2018, s. 36–41. ISBN 978-80-89408-30-6.

ČERNÝ, K., STRNADOVÁ, V., GREGOROVÁ, B., HOLUB, V., TOMŠOVSKÝ, M., MRÁZKOVÁ, M. a S. GABRIELOVÁ. *Phytophthora cactorum* causing bleeding canker of common beech, horse chestnut, and white poplar in the Czech Republic. *Plant Pathol.*, 2009, č. 58(2), 394. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2008.01970.x.

GRÍGEL, J., ČERNÝ, K., MRÁZKOVÁ, M., HAVRDOVÁ, L., ZAHRADNÍK, D., JÍLKOVÁ, B. a M. HRABĚTOVÁ. *Phytophthora* spp. v ovocných sadech ČR. In: NOVÁKOVÁ, A., ed. *Sborník příspěvků z workshopu MICROMYCO 2007*. České Budějovice: Ústav půdní biologie BC AV ČR, v.v.i., 2019. ISBN 978-80-86525-10-5.

GRÍGEL, J., ČERNÝ, K., MRÁZKOVÁ, M., HAVRDOVÁ, L., ZAHRADNÍK, D., JÍLKOVÁ, B. a M. HRABĚTOVÁ. Recent outbreak of *Phytophthora* root and collar rot in fruit orchards in the Czech Republic. *Phytopathologia Mediterranea*, 2019, č. 58(2), 261–275. DOI: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-10614.

GRÍGEL, J., MRÁZKOVÁ, M., ČERNÝ, K., HAVRDOVÁ, L. a M. HRABĚTOVÁ. Riziko poškození sadů ovocných dřevin plísněmi rodu *Phytophthora*. *Vinař Sadař*, 2018, č. 5, 72–73. ISSN: 1804-3054.

HOLUB, V., ČERNÝ, K., STRNADOVÁ, V., MRÁZKOVÁ, M., GREGOROVÁ, B. a Š. GABRIELOVÁ. The survey of some factors affecting bark lesion development caused by *Phytophthora cactorum* on common beech and other broadleaved trees. *J. For. Sci.*, 2010, č. 56(3), 93–100. DOI: 10.17221/104/2009-JFS.

JÍLKOVÁ, B., ČERNÝ, K., MRÁZKOVÁ, M., HAVRDOVÁ, L., ZAHRADNÍK, D., GRÍGEL, J., a M. HRABĚTOVÁ. *Phytophthora* spp. ve školkařských provozech ČR a citlivost vůči vybraným fungicidům. In: NOVÁKOVÁ, A., ed. *Sborník příspěvků z workshopu MICROMYCO 2007*. České Budějovice: Ústav půdní biologie BC AV ČR, v.v.i., 2019. ISBN 978-80-86525-10-5.

MRÁZKOVÁ, M., ČERNÝ, K., STRNADOVÁ, V. a N. FILIPOVÁ. *Identifikace symptomů napadení dřevin a okrasných rostlin patogeny z rodu Phytophthora de Bary*. Certifikovaná metodika MZe 6/2011-056. QH71273. Průhonice: VÚKOZ, v.v.i., 2011.