

Možnosti pěstování řepky olejky v zemědělských podnicích s výskytem půdního patogena *Plasmodiophora brassicae*

Mgr. Veronika Řičařová, Ph.D.

Doc. Ing. Jan Kazda, CSc.

Jaroslava Vospělová

Uplatněná certifikovaná metodika pro praxi

*Metodika byla vytvořena za finanční podpory z projektu
Národní agentury pro zemědělský výzkum (NAZV) č. QJ 1310227*

*Katedra ochrany rostlin, FAPPZ
Česká zemědělská univerzita v Praze
2017*

Autoři:

Mgr. Veronika Řičařová, Ph.D.	50 %
Doc. Ing. Jan Kazda, CSc.	40 %
Jaroslava Vospělová	10 %

Oponentní posudky vypracovali:

RNDr. Jan Juroch, ÚKZÚZ Brno

Doc. Dr. Ing. Jaroslav Salava, VÚRV Praha

Publikaci bylo ÚKZÚZ vydáno osvědčení ÚKZÚZ 124569/2017 o uznání uplatněné certifikované metodiky v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“

Vydala:

Česká zemědělská univerzita v Praze, 2017

ISBN: 978-80-213-2809-9

Upozornění: Pro použití pesticidů jsou závazné aktualizované informace v Seznamu povolených přípravků a dalších prostředků na ochranu rostlin. Při realizaci doporučení uváděných v metodice musí být podmínky z těchto úředních dokumentů dodrženy.

Obsah

Poděkování	- 3 -
Úvod	- 6 -
Cíl metodiky	- 7 -
Patogen <i>Plasmodiophora brassicae</i> Wor.	- 8 -
Historie a současnost výskytu	- 8 -
Rozšíření ve světě.....	- 8 -
Rozšíření v České republice	- 9 -
Hostitelské rostliny.....	- 11 -
Nehostitelské rostliny.....	- 12 -
Symptomy napadení	- 12 -
Životní cyklus.....	- 13 -
Patotypy <i>Plasmodiophora brassicae</i>	- 14 -
Determinace patotypů <i>Plasmodiophora brassicae</i>	- 15 -
Hodnocení vizuálního napadení rostlin - nádorů na kořenech (ID Index of Disease)-	15
-	
Rozšíření patotypů <i>Plasmodiophora brassicae</i> v České republice	- 15 -
Podmínky pro vznik infekce na brukvovitých rostlinách.....	- 19 -
Spory <i>Plasmodiophora brassicae</i>	- 19 -
Vlhkost půdy	- 20 -
Teplota.....	- 20 -
Půdní reakce (pH).....	- 20 -
Délka dne.....	- 20 -
Struktura půdy	- 21 -
Minerální látky	- 21 -
Bor (B).....	- 21 -
Dusík (N).....	- 21 -
Způsoby šíření <i>Plasmodiophora brassicae</i>	- 22 -
Metody detekce <i>Plasmodiophora brassicae</i>	- 23 -
Biologická metoda (bioesej).....	- 23 -
Mikroskopické metody.....	- 23 -
Sérologické metody	- 24 -
Molekulární metody	- 24 -
PCR (polymerázová řetězová reakce)	- 24 -
qPCR (kvantitativní polymerázová řetězová reakce, také real – time PCR)	- 24 -

Ochrana proti šíření a infekci rostlin patogenem <i>Plasmodiophora brassicae</i>	- 26 -
Prevence šíření <i>Plasmodiophora brassicae</i>	- 26 -
Sanitace	- 26 -
Termín výsevu.....	- 27 -
Ochrana proti <i>Plasmodiophora brassicae</i>	- 27 -
Vliv osevního postupu.....	- 27 -
Lapací rostliny.....	- 28 -
Rezistentní odrůdy.....	- 28 -
Skleníkové pokusy	- 29 -
Použité odrůdy.....	- 30 -
Průběh pokusu	- 30 -
Hodnocení pokusu.....	- 30 -
Poloprovozní polní pokusy.....	- 34 -
Použité odrůdy.....	- 34 -
Hodnocení pokusů.....	- 34 -
Pozorování během vegetace	- 35 -
Výnos	- 37 -
Pokusy v sezoně 2015 – 2016	- 38 -
Fyzikální metody ochrany	- 41 -
Moření osiva.....	- 41 -
Chemická ochrana	- 41 -
Půdní fungicidy	- 42 -
Preventivní opatření k zabránění šíření patogena <i>Plasmodiophora brassicae</i> v praxi.....	- 43 -
Příloha – metodika provedení detekce spor patogena <i>Plasmodiophora brassicae</i> metodami PCR a qPCR.....	- 45 -
Izolace DNA.....	- 45 -
PCR analýza	- 45 -
Kvantitativní PCR analýza (qPCR).....	- 45 -
Přehled použité literatury	- 50 -
Popis obrázků na obálce	- 56 -

PODĚKOVÁNÍ

Uplatněná certifikovaná metodika vznikla za významné pomoci Svazu pěstitelů a zpracovatelů olejnin, zejména doc. Ing. Petra Baranyka, CSc, Ing. Martina Volfa a Ing. Josefa Škeříka, CSc.

Autoři rovněž děkují všem pracovníkům Agronomické služby SPZO za monitoring výskytu patogena a odběr vzorků zeminy a rostlin.

Zvláštní poděkování si zaslouží Ing. Vladimír Tichý, předseda představenstva Agro Chomutice a.s. za všestrannou podporu našich projektů a Hana Špalková, agronomka Agro Chomutice a.s. za dlouholetou nenahraditelnou pomoc při polních pokusech na lokalitě Hrádek nad Nisou.

Za pomoc při polních pokusech děkují autoři i pracovníkům všech dalších zemědělských podniků, kde se uskutečnily pokusy.

Cíl metodiky

Cílem uplatněné metodiky je předložit odborné veřejnosti ucelené informace o půdním patogenu *Plasmodiophora brassicae* Wor., který v posledních letech vyvolává nádorovitost kořenů brukvovitých u ozimé řepky a šíří se po celé České republice.

Vlastní popis metodiky

Metodika poskytuje komplexní informace o patogenu *Plasmodiophora brassicae* Wor., který vyvolává nádorovitost kořenů brukvovitých u ozimé řepky. V metodice jsou shrnuty poznatky pracovníků Katedry ochrany rostlin ČZU v Praze z vlastního výzkumu a z pokusů v letech 2012 – 2016.

V metodice je popsána biologie, vývoj a rozšíření organismu *Plasmodiophora brassicae* ve světě a v České republice. Pozornost je věnována především problematice tohoto patogena z pohledu pěstitele řepky. Podrobně jsou specifikovány podmínky pro vznik infekce na ozimé řepce a rozebírány způsoby šíření na dosud nezamořené pozemky. Velká pozornost je věnována návrhu opatření k zabránění šíření a infekci rostlin řepky olejky v polních podmínkách. Samostatná kapitola popisuje pracovní postup analýzy přítomnosti a množství spor *Plasmodiophora brassicae* ve vzorcích zeminy.

V závěru metodiky jsou shrnuta opatření pro pěstitele, nutná při pěstování ozimé řepky v zemědělských podnicích, kde byl na části orné půdy prokázán výskyt patogena *Plasmodiophora brassicae*.

Srovnání „novosti postupů“

Problematika výskytu patogena *Plasmodiophora brassicae* Wor., který vyvolává nádorovitost kořenů brukvovitých u ozimé řepky dosud nebyla komplexně touto formou v České republice dosud zpracována. Dřívější práce z 90. let minulého století se věnovaly pouze výskytu patogena *Plasmodiophora brassicae* Wor., na brukvovité zelenině.

Metodika shrnuje nejnovější poznatky o problematice nádorovitosti košťálovin na řepce ve světě i v Evropě. Obsahuje výsledky z vlastního výzkumu autorů v letech 2012 – 2016.

- Aktuální komplexní údaje o rozšíření nádorovitosti kořenů brukvovitých v České republice na půdách, kde se pěstuje řepka olejka.
- Determinace patotypů *Plasmodiophora brassicae* z pozemků, kde se pěstuje řepka je originální a dosud nebylo v České republice provedeno.
- Ověření deklarované rezistence zahraničních odrůd řepky v podmínkách České republiky v souvislosti s rozšířením patotypů. Dosud nebylo v našich podmínkách provedeno.
- Polní poloprovozní srovnávací pokusy s rezistentními odrůdami na zamořených půdách nebyly dosud v podobném rozsahu v České republice provedeny. Výsledky jsou důležité pro pěstitele při volbě vhodné rezistentní odrůdy.
- Ověřené kvalitativní i kvantitativní molekulární metody detekce spor *Plasmodiophora brassicae* v půdě jsou originálně přizpůsobeny pro použití v České republice.

V závěru metodiky je vypracován poprvé v ČR nový souhrn opatření, která zabrání šíření patogena *Plasmodiophora brassicae* v praxi a umožní pěstovat řepku olejku i v zemědělských podnicích s potvrzeným výskytem patogena v půdě.

Popis uplatnění metodiky

V oblasti managementu a kontroly choroby nádorovitost kořenů brukvovitých a celkového přístupu k zamořeným plochám je Česká republika ještě na začátku řešení celého problému. Tato metodika by měla přinést našim pěstitelům informace podobné těm, které poskytují farmářům v zahraničí – například v Německu a Kanadě, kde se s problémem potýkají již delší dobu.

Metodika je určena především pro pěstitele řepky s výskytem i bez výskytu patogena *Plasmodiophora brassicae* na svých pozemcích a pěstitelské svazy - SPZO. Důležité informace v ní najdou i pracovníci orgánů státní správy – zejména ÚKZÚZ, Ministerstvo zemědělství a místní úřady. Informace v kapitole Determinace patogena *Plasmodiophora brassicae* využijí diagnostické laboratoře ke stanovení výskytu patogena na pozemku a míře zamoření.

ÚVOD

Půdní patogen *Plasmodiophora brassicae* Wor. způsobuje chorobu nádorovitost kořenů brukvovitých rostlin, mezi které patří i řepka olejka. V minulosti byl patogen řazen mezi prvoky, dnes se v systému nachází na pomezí živočišné a rostlinné říše (říše *Rizaria*).

Plasmodiophora brassicae se vyskytuje ve více než 60 zemích světa včetně České republiky a působí 10 – 15 % škody v celosvětové produkci řepky olejky (Dixon, 2009a). Potenciálními hostiteli *Plasmodiophora brassicae* mohou být všechny druhy z čeledi brukvovitých, včetně brukvovitých plevelů. Dříve byla nádorovitost v českých podmínkách problém spíše v zelinářství (Rod, 1996), v posledních letech se ovšem choroba šíří i na ozimé řepce. První problémy s nádorovitostí byly hlášeny na podzim 2011. Ačkoliv je patogen pravděpodobně široce rozšířen po celém území republiky, výskyt symptomů závisí na specifických klimatických podmínkách především v době setí. Celkové škody na výnosech ozimé řepky nejsou prozatím velké. Jedním z důvodů je zřejmě zatím nízké množství inokula a jeho nerovnoměrná distribuce na postižených polích. Jedná se zřejmě o počáteční stádium výskytu patogena *Plasmodiophora brassicae* na půdách, kde se běžně pěstuje řepka olejka. Vyskytly se již ovšem i četné případy, kdy byl porost řepky během zimy tak poškozen, že musel být v jarním období zaorán.

V letech 2015 a 2016 bylo opakovaně prokázáno šíření spor *Plasmodiophora brassicae* průmyslovými komposty.

Situace je závažná, protože zatím neexistuje jednoduchý, levný a environmentálně šetrný způsob chemické ochrany proti tomuto patogenu.

Co se týče managementu choroby a celkového přístupu k zamořeným plochám, je Česká republika ještě na začátku řešení celého problému. Zkušenosti ze zahraničí – například Německa a Kanady, kde se s problémem potýkají již delší dobu, mohou být pro naše farmáře a orgány státní správy inspirací.

CÍL METODIKY

Mezi pěstiteli existuje rámcové povědomí o patogenu *Plasmodiophora brassicae* a jeho škodlivosti pro brukvovité plodiny. Šíření patogena mimo zelinářské oblasti v ČR v posledních 5 letech však prokázalo, že pěstitelé mají o tomto škodlivém organismu zkreslené představy. Velmi často výskyt patogena na svých pozemcích tají nejen před orgány státní správy, ale i před svými sousedy. Většina zemědělských podniků v počátečních fázích výskytu neprovádí žádná nutná eradikační či preventivní opatření k zabránění škod a šíření tohoto škodlivého organismu. Symptomatická determinace choroby na rostlinách je poměrně jednoduchá. Stanovit výskyt životaschopných spor v půdě a stanovit stupeň zamoření (počet spor v definovaném objemu půdy) je však možný pouze ve specializovaných laboratořích.

Cílem metodiky je:

- Seznámit pěstitele s vlastnostmi, vývojem a rozšířením organismu *Plasmodiophora brassicae*.
- Specifikovat podmínky pro vznik infekce na ozimé řepce.
- Objasnit způsoby šíření.
- Popsat pracovní postupy při kvantitativní i kvalitativním rozboru půdy v laboratorních podmínkách na přítomnost spor *Plasmodiophora brassicae*.
- Rozpracovat postupy zabráňující šíření a infekci rostlin řepky olejky patogenem *Plasmodiophora brassicae* v polních podmínkách.
- Shrnout opatření při pěstování ozimé řepky v zemědělských podnicích, kde na části orné půdy byl prokázán výskyt patogena *Plasmodiophora brassicae*.

Metodika je určena především pro pěstitelé řepky s výskytem i bez výskytu patogena *Plasmodiophora brassicae* na svých pozemcích a pěstitelské svazy – SPZO Praha. Důležité informace v ní najdou i pracovníci orgánů státní správy – zejména ÚKZÚZ, Ministerstvo zemědělství a místní úřady. Informace v kapitole Determinace patogena *Plasmodiophora brassicae* využijí diagnostické laboratoře ke stanovení výskytu patogena na pozemku a stupni jeho zamoření.

PATOGEN *Plasmodiophora brassicae* WOR.

Historie a současnost výskytu

Nádorovitost kořenů brukvovitých je spjata s počátkem pěstování brukvovitých rostlin. První písemné zmínky pochází z encyklopedie Plinia staršího *Naturalis historia* a od Columelly z 1. století našeho letopočtu. Chorobě, konkrétně nádorům, nebyla tehdy přisuzována velká váha a byla často vysvětlována například jako vznik křížence brukvovitých rostlin bez bulev s rostlinami, které bulvy mají nebo tyto anomálie přisuzovali hmyzu (Aist, 1977). Podle druhu brukvovité zeleniny a jeho významu v dané části Evropy byla nádorovitost i pojmenovávána. V severní Evropě mělo velký význam zelí a nádorovitost se pojmenovávala podle tvaru nádoru – „club foot“ (Británie) v překladu „noha s boulemi“. Další názvy vznikaly modifikací - Klumprot (Norsko), Kaalbrok (Dánsko) a Klumprotsjuka (Švédsko). Naopak v jižní Evropě „trpěl“ touto chorobou spíše květák a název se odvozoval od slova „hernia“ – „kýla“ (Španělsko, Francie), ernia (Itálie). Ve Španělsku se této chorobě říkalo i zelná příjice. Poprvé byl patogen popsán jako *Plasmodiophora brassicae* ruským vědcem Michailem Woroninem v roce 1878 (Dixon, 2009a, Rod, 1996). V rámci kolonizace byl patogen zanesen i na americký kontinent a do Austrálie, do Číny a Japonska se dostal pravděpodobně ještě dříve (Dixon, 2009a). Vůbec první zmínka o *Plasmodiophora brassicae* v českých zemích pochází od fytopatologa F. Sitevského. Bylo to z okolí Veselí nad Lužnicí, kde se zpracovávalo kruhárenské zelí (Rod, 1996).

Rozšíření ve světě

Nádorovitost se vyskytuje na celém světě, nejvíce však v oblastech mírného pásu Evropy a Asie a ve všech oblastech s intenzivním pěstováním brukvovitých rostlin. V posledních 10 – 15 letech začala *Plasmodiophora brassicae* napadat řepku olejku ve více než 60 zemích světa včetně Kanady, Německa, Polska a Francie a působí 10 – 15% škody v celosvětové produkci řepky (Dixon, 2009a). Ve Francii byla choroba kuriozitou až do roku 1981, kdy se zde nádorovitost prudce rozšířila (Rouxel et al., 1983). Britové Clarkson et Brokenshire (1984) psali o 31 případě napadení na ozimé řepce mezi lety 1979 – 84, zejména ze severní a západní části Anglie. Nárůst výskytu v Anglii je spojován s expanzí plochy oseté ozimou řepkou. V současnosti působí nádorovitost velké škody na řepce zejména ve Skotsku a Wallesu (Dixon, 2009a). V kanadských prériích byla nádorovitost na řepce identifikována poprvé v roce 2003 a od této doby se stále šíří napříč celou Kanadou (Hwang et al., 2012; Strelkov et al., 2007). Rozsáhlá infekce se objevuje i na plochách jarní řepky ve Švédsku (Wallenhammar et al. 2014).

Ze sousedních zemí České republiky, kde se nádorovitost vyskytuje, lze jmenovat Německo a Polsko. V Německu byly problémy s patogenem prokázány v 80. letech v krajích Schwerin a Rostock (Daebler et al., 1980). V současnosti se nádorovitost šíří celým Německem, významný výskyt na řepce olejce byl zjištěn v roce 2005 a od té doby se rozšiřuje na pozemních, kde se řepka pěstuje (Diederichsen et al., 2014). Problémy byly také zaznamenány v sousedním Polsku, kde byl patogen v 80. letech prokázán u 160 půdních vzorků odebraných z různých částí celého Polska (Robak, 1991). V současnosti se infekce *Plasmodiophora brassicae* na řepce vyskytuje ve všech polských vojvodstvích (Jedryczka et al., 2014). Situace na Slovensku není příliš zmapována, nádorovitost se na pozemcích zřejmě vyskytuje, významné škody na řepce ovšem ještě nejsou hlášeny.

O efektivitě šíření patogena si lze udělat představu podle situace, která nastala v roce 2003 v okolí kanadského Edmontonu (provincie Alberta). Bylo zde zamořeno 12 pozemků, v roce 2007 to ale bylo již 250 pozemků (Strelkov et al., 2008) a v roce 2012 bylo patogenem zamořeno přes 1000 polí, patogen se také rozšířil do sousedních provincií Saskatchewanu (Strelkov et al., 2012) a Manitoby (Cao et al., 2009). Protože se jedná o půdního patogena, je jeho identifikace a monitoring velmi náročný. Zejména také proto, že symptomy nepropukají každou vegetací a patogen může přežívat na pozemku po dlouhou dobu (Strelkov et al., 2012).

Rozšíření v České republice

Studium rozšíření *Plasmodiophora brassicae* na území ČR bylo prováděno s důrazem na rozpoznání zamořených pozemků používaných k pěstování ozimé řepky. Předchozí studie zabývající se rozšířením tohoto patogena byly prováděny zejména na pozemcích s brukvovitou zeleninou. Rozsáhlý monitoring nádorovitosti zeleniny prováděl v letech 1984 - 1986 (Rod, 1986). Tato studie objevila nádorovitost na celém území České republiky i Slovenska (bývalé Československo). Nejvyšší zamoření bylo zmapováno v oblastech tradičního pěstování brukvovité zeleniny, jako jsou okresy Mělník, Litoměřice, Pardubice, Hradec Králové, Olomouc, Prostějov a Brno-město. Nejčastější přítomnost nádorovitosti byla pozorována u kvěťáku, zelí, růžičkové kapusty a u kedluben, naproti tomu střední až nízké bylo postižení ozimé a jarní řepky. Celkově byla plocha zasažená nádorovitostí odhadnuta na 15 - 20 tisíc hektarů, což v době studie odpovídalo 0,3 – 0,4 % obhospodařované půdy. Kromě profesionálních zemědělských ploch bylo jako významný zdroj nádorovitosti uvedeno zahrádkaření, které má významnou roli na množství infekce i dnes, protože zahrádkáři se často zbavují organických zbytků tak, že je vyhodí na pole.

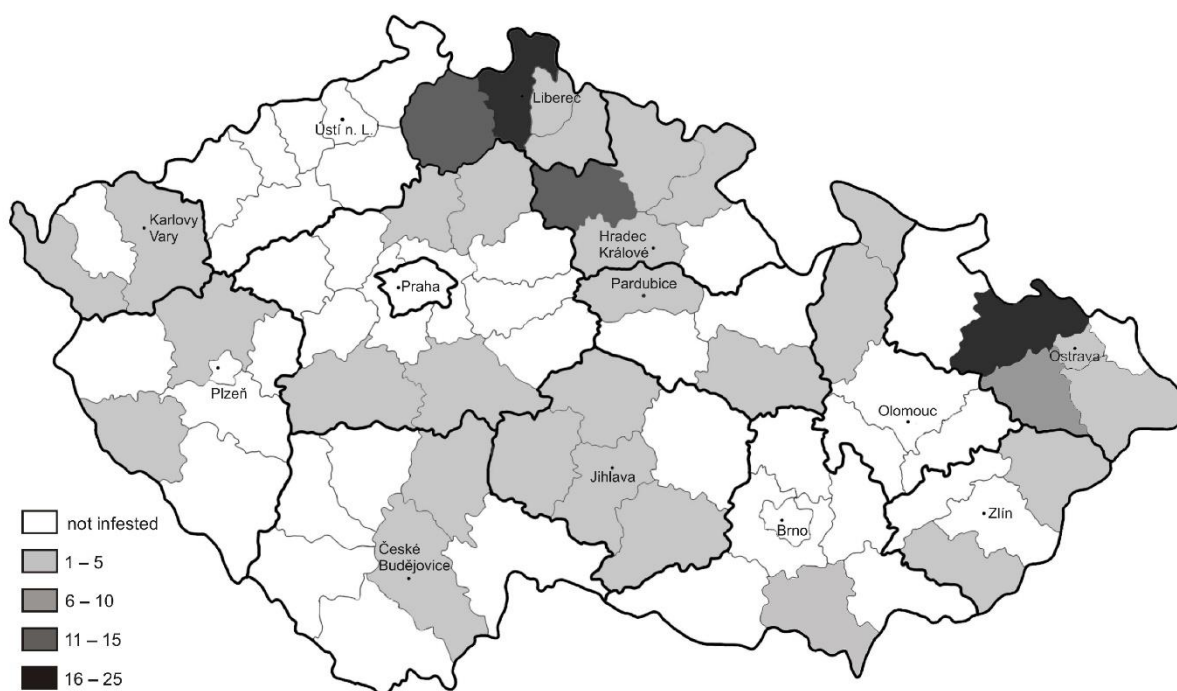
Plocha zeleniny v posledních 25 letech poklesla z 33 134 ha v roce 1989 na 12 615 ha v roce 2014 a dále na 10 237 ha v roce 2017 (Český statistický úřad). Plocha ozimé i jarní řepky naopak vzrostla z 102 376 ha v roce 1989 na 418 808 ha v roce 2013, který byl rekordní. V hospodářském roce 2016/2017 se odhadují plochy pro sklizen ozimé i jarní řepky na cca 394 262 ha (Český statistický úřad).

Výskyt nádorovitosti na ozimé řepce je vázán zejména právě na plochy, kde se dříve pěstovala brukvovitá zelenina, zejména zelí. Například v okrese Opava se nacházejí vyhlášené lokality jako Darkovice, Hlučín a Kravaře, kde se pěstuje známé Nošovické zelí pocházející z Nošovic (okres Frýdek-Místek) (Kopecký, Dušek, 2012). Podobná situace je i v Libereckém kraji, kde má v okrese Semily dlouhou tradici pěstování špičatého zelí, zvaného Vysocké (Kopecký, Dušek, 2012). V Jihočeském kraji se zelí pěstuje tradičně v okolí Veselí nad Lužnicí - Veselské zelí (Chytilová, Dušek, 2007), kde jsou také v současnosti nádorovitostí silně zamořena řepková pole.

Nicméně problém nádorovitosti na řepce nemůže být připisován pouze předchozímu pěstování zelí, protože tyto oblasti zdaleka nepokrývají dnešní rozlohu řepky u nás. *Plasmodiophora brassicae* se rozšířila i na pole, kde nebyla brukvovitá zelenina nikdy pěstována. Šíření je podporováno zejména krátkým osevním postupem a častým pěstování řepky - každé tři roky. Na druhou stranu v Jihomoravském kraji je známý problém s nádorovitostí na zelenině, ale v současné době je zde zaznamenáno pouze několik lokalit s výskytem nádorovitosti na řepce. Tato část republiky je významně teplejší a sušší a tyto podmínky mohou být pro patogena (stejně tak pro řepku) na rozsáhlých nezavlažovaných plochách limitující. Dalším faktorem může být zdejší alkalická půda, která je pravděpodobně pro patogena méně příznivá. Regionem s prozatím nulovou incidencí *Plasmodiophora*

brassicae je Ústecký kraj, který je další ze sušších oblastí ve srážkovém stínu Krušných hor. Půdy v tomto kraji mají také vyšší pH než v ostatních regionech. Před rokem 2011 se nádorovitost na ozimé řepce objevovala pravidelně na pozemcích na Opavsku a Šumpersku. Ve větší míře v dalších oblastech se onemocnění poprvé projevilo na podzim 2011. Patogen se v tomto roce vyskytoval na 23 pozemcích, v roce 2012 to bylo nově hlášeno dalších 55 pozemků, v roce 2013 přibýlo 15 pozemků a na podzim 2014 bylo 12 pozemků a v roce 2015 bylo hlášeno 25 lokalit. Celkově bylo do podzimu 2015 evidováno 131 zamořených lokalit a jedná se pouze o pozemky členů SPZO, u nečlenů není výskyt *Plasmodiophora brassicae* přesně stanoven. Nejvyšší počet zamořených lokalit je ze severních Čech, zejména z Libereckého kraje, kde je v současnosti napadeno 38 lokalit a ze severní Moravy - z Moravskoslezského kraje, kde je evidováno 41 napadených lokalit. Lokalitou je myšlen soubor zpravidla sousedních pozemků obvykle se stejnými půdními a hydrologickými charakteristikami.(Obr. 1)

Obrázek 1 Rozšíření patogena *Plasmodiophora brassicae* v půdách ČR. Údaje uvedeny v počtu lokalit.

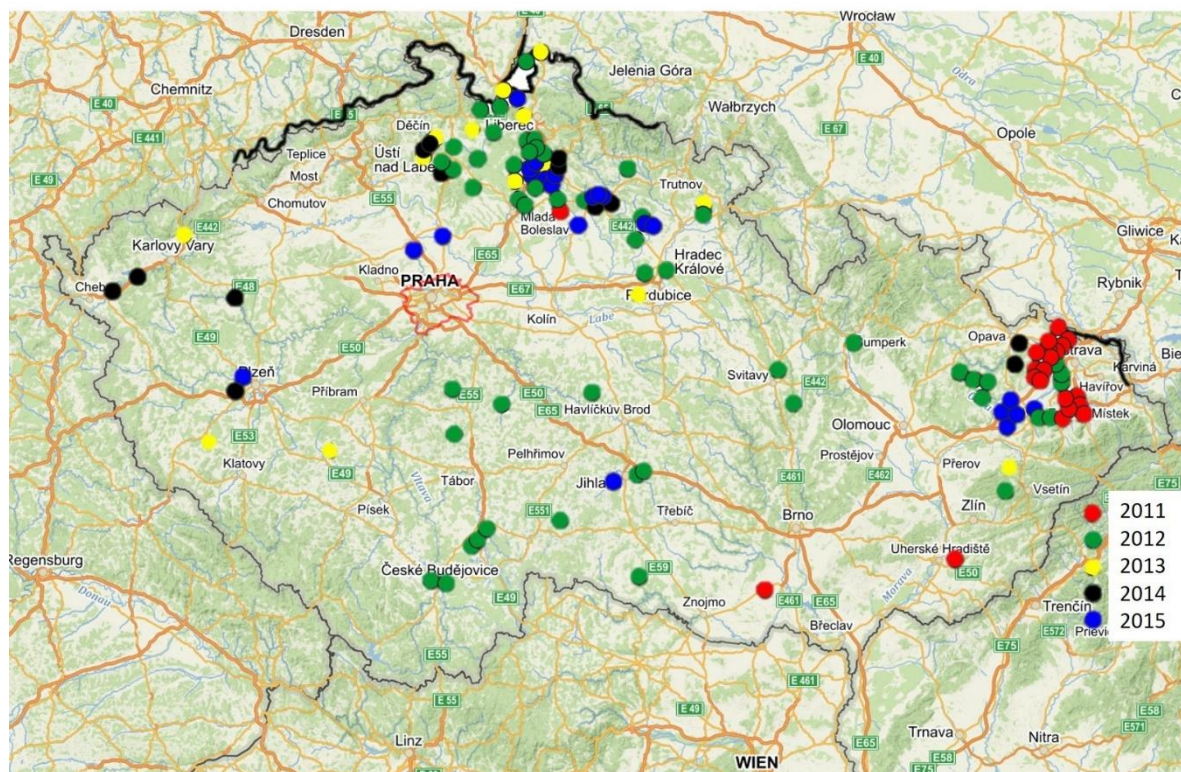


Velmi suchá sezóna 2015/2016 přinesla jen velmi málo nových výskytů nádorovitosti, což ovšem neznamená, že patogen z půdy vymizel. Jedna nová lokalita byla zjištěna v okrese Nový Jičín a také v blízkosti Karlových Varů. Nově byla přítomnost *Plasmodiophora brassicae* zaznamenána například ve vzorcích z kompostů. Je proto vhodné ověřit si vždy původ kompostu před aplikací na pole.

Na dlouhodobě zamořených lokalitách se ovšem již celkem pravidelně používají rezistentní odrůdy, což znemožňuje jednoduchou symptomatickou diagnostiku. Celkem lze odhadnout výskyt na více než 100 zemědělských podnicích v celé ČR. Je pravděpodobné, že

malá ohniska výskytu či jednotlivé rostliny nejsou zjištěny a rozšíření bude ještě významně větší (Obr. 2).

Obrázek 2 Rozšiřování patogena *Plasmodiophora brassicae* v letech 2011 - 2015



Hostitelské rostliny

Rostliny všech 330 rodů a 3700 druhů čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*) jsou možným hostitelem *Plasmodiophora brassicae*, mimo rody *Brassica*, *Raphanus* a *Arabidopsis* bylo prováděno pouze několik studií (Dixon, 2009a). Mezi běžně pěstované druhy brukvovitých rostlin jsou zahrnuty všechny známé odrůdy *Brassica oleraceae* L. (zelí, květák, kapusta, kedluben, brokolice, růžičková kapusta), *Brassica rapa* L. (pekingské zelí, čínské zelí, vodnice, řepice olejná – var. *oleifera*), *Brassica napus* L. (řepka, tuřín) a všechny plodiny odvozené od *Brassica carinata* A. Braun, *Brassica nigra* L. a *Brassica juncea* (L.) Czern a *Raphanus sativus* L. (ředkvička setá a ředkev – var. *major*). Zařazeny sem jsou také brukvovité plevely náchylné k infekci *Plasmodiophora brassicae*, například kokoška pastuší tobolka (*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik.), penízek rolní *Thlaspi arvense* L., řeřicha ladní (*Lepidium sativum*), ředkev ohnice (*Raphanus raphanistrum*), vesnovka obecná (*Cardia draba*), lnička drobnokvětá (*Camelina microcarpa*), trýzel cheirovité (*Erisimum*

cheiranthoides), hulevník (*Sisymbrium* ssp.) a jiné (Buczacki et Ockendon, 1979). Zajímavostí je, že křen selský (*Armoracia rusticana*) není k infekci náchylný (Rod, 1996).

Nehostitelské rostliny

Kořenové exsudáty některých rostlin stimulují klíčení spor *Plasmodiophora brassicae*. U těchto rostlin (*Papaveraceae*, *Poaceae* a *Rosaceae*) probíhá pouze primární cyklus infekce, sekundární cyklus není přítomen, tím pádem se netvoří trvalé spory (Colhoun, 1958; Karling, 1968). Primární zoosporangia a zoospory *Plasmodiophora brassicae* byly nalezeny na kořenech trav - medyněk vlnatý (*Holcus lanatus*), jílku vytrvalý (*Lolium perenne*), psineček výběžkatý (*Agrostis stolonifera*), srha říznačka (*Dactylis glomerata*) a také na kořenech vlčího máku (*Papaver rhoeas*), jetele plazivého (*Trifolium repens*), šťovíku (*Rumex* spp.), jahodníku (*Fragaria* spp.) (Dixon, 2009b; Rod, 1996). K tvorbě nádorů u těchto čeledí tedy nedochází, takže nemohou být zdrojem šíření nákazy. Naopak, donutí trvalé spory k vyklíčení, takže snižují koncentraci trvalých spor v půdě. Takové rostliny se nazývají „lapací“ a lze je potenciálně využít k redukci spor na zamořených pozemcích.

Konkrétní pokusy byly prováděny například s jíllem vytrvalým (*Lolium perenne*), ovsem setým (*Avena sativa*), ředkvi olejnou (*Raphanus sativus* var. *oilifera*) nebo pohankou tatarskou (*Fagopyrum tataricum*). Plodiny byly pěstovány na ploše zamořené patogenem po dobu tří let a díky tomu došlo k prokazatelnému snížení množství spor v půdě (Rod et Robak, 1994). Stejný pokus byl pak proveden s bylinkami - s mátou (*Mentha piperita*), tymiánem (*Thymus vulgaris*), kmínem (*Carum carvi*), saturejkou (*Satureja hortensis*), bazalkou (*Ocimum basilicum*), u kterých byl výsledek ještě lepší, máta a bazalka snížila za tři roky množství spor v půdě téměř o 50 % (Rod, 1994).

Symptomy napadení

Plasmodiophora brassicae napadá potenciálně všechny členy čeledi brukvovitých – tedy i řepku olejku. Patogen působí nádory a deformace na kořenech napadených rostlin, způsobuje hypertrofii - nadměrné zmnožení buněk a hyperplazii - nadměrné zvětšení buněk hostitele, které vede k tvorbě nádoru. Poškození začíná na postranních kořenech, silně napadené rostliny pak mají zcela deformovaný hlavní kořen (Obr. 3). Díky tomu dochází k přerušení cévních svazků a narušení transportu vody a minerálních látek. V důsledku toho pak rostlina vadne, objevuje se zakrslost a antokyanové zbarvení listů (Obr. 4). Celkově pak rostliny zakrňují v růstu a nevytvářejí konzumní orgány nebo dochází k předčasnému dozrávání generativních orgánů.

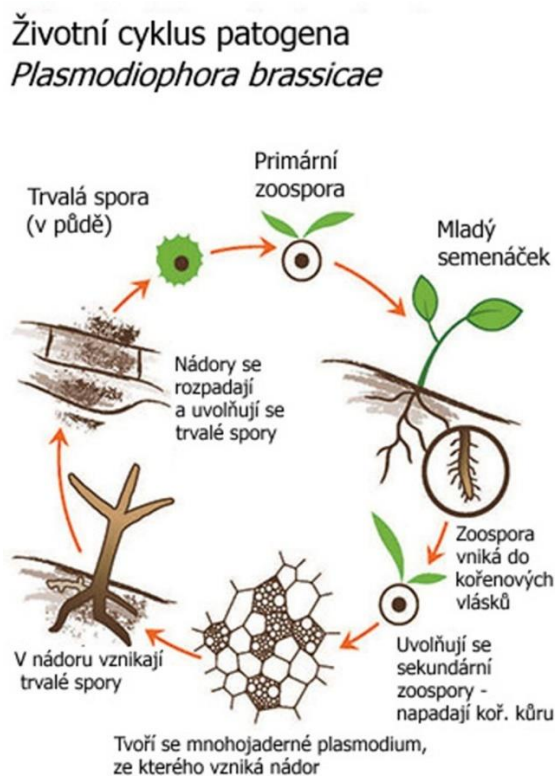
Zprvu bývají nádory velice nepatrné na postranních kořenech, dospělé nádory pak mohou dosahovat hmotnosti až 1 kg. Tvar nádorů se odvíjí od uspořádání dané kořenové soustavy. Barva povrchu napadených kořenů se různí v časovém horizontu. Nejprve mají nádory šedo – žluté zbarvení, na průřezu bílé, s postupným dřevnatěním. Starší nádory se stávají drsnějšími a jejich povrch tmavne a nakonec se celé nádory úplně rozkládají. Občas se dá nádorovitost kořenů brukvovitých zaměnit s hálkami způsobenými krytonoscem zelným (*Ceutorhynchus pleurostigma*) (Obr. 5).

Životní cyklus

Životní cyklus *Plasmodiophora brassicae* je rozdělen do tří částí - na primární a sekundární fázi infekce a přežívání spor v půdě (Ayers, 1944; Ingram et Tommerup, 1972). Trvalé haploidní spory o velikosti 2 – 3 μm se do půdy dostávají z rozpadajících se nádorů. Nejvíce trvalých spor se v půdě vyskytuje do hloubky 15 cm, maximálně do 40 cm (Dixon, 2009b; Kim et al., 2000). Vitalita spor je zachována po dlouhou dobu, počet živých spor klesá po 4,6 roku na polovinu (Dixon, 2009b). Různí autoři uvádí různé hodnoty přežívání spor, někteří uvádí dokonce dobu delší než deset let, např. 15-20 let (Rod, 1996), nebo až 20 let (Wallenhammar, 1996). Klíčení trvalých spor je pravděpodobně aktivováno kořenovými exsudáty různých rostlin, nejen brukvovitých, kyselou půdní reakcí, dokonce i půdními mikroorganismy. Během klíčení dochází k uvolnění dvoubičíkatých pohyblivých zoospor, které vyhledávají kořenové vlásky, v nichž dochází k primární infekci. Zoospory ke svému pohybu potřebují vodní film. Období, kdy jsou zoospory volně v půdě, je nejcitlivější část životního cyklu. V kořenových vláscích dochází k proměně zoospor v haploidní primární plasmodium. Plasmodia se dělí a vznikají paraplasmodia, ze kterých vznikají sporangia obsahující 4-8 jednojaderných spor. V místě dotyku se stěnou hostitele se vytvoří otvor, jímž se sekundární zoospory uvolní do půdy). Tím je završena primární fáze cyklu, která podle Dixona (2009b) trvá 5-7 dní.

V půdě dochází k plazmogamii zoospor a nastává sekundární fáze infekce. Dvoujaderné sekundární zoospory znovu pronikají do hostitele – tentokrát do kořenové kůry. Zde opět vzniká paraplasmodium, nyní však dvoujaderné, později mnohojaderné. Paraplasmodium způsobuje nádorovitost kořenů. Po karyogamii a meiózi se paraplasmodium mění v haploidní tlustostěnné trvalé spory, které vyplňují buňky hypertrofovaných pletiv. Po uhynutí rostliny se nádory rozpadají a trvalé spory se uvolňují do půdy (Obr. 6).

Obrázek 6 Životní cyklus patogena *Plasmodiophora brassicae*



K tvorbě nádorů nedochází u rezistentních odrůd řepky, kde nedochází k tvorbě zralého sekundárního plasmodia a netvoří se trvalé spory.

Primární cyklus může probíhat i u rostlin z jiných čeledí, například *Papaveraceae*, *Poaceae* a *Rosaceae*.

Patotypy *Plasmodiophora brassicae*

Fytopatologická terminologie je v této oblasti dost komplikovaná. Termín patotyp se u *Plasmodiophora brassicae* používá místo označení rasa (Crute et al., 1980; Voorrips, 1995). Termín populace se pak používá k označení kolekce spor získané ze zamořené půdy nebo z infikovaného materiálu, použitého k inokulaci diferenčních rostlin (Buczacki et al., 1975). Diferenční rostlinou se míní rostlinný druh se specifickou reakcí na napadení *Plasmodiophora brassicae* používaný k identifikaci patotypů (Buczacki et al., 1975). Označení rasa se u *Plasmodiophora brassicae* nedá využít, protože označuje geneticky jednotnou populaci, což je u *Plasmodiophora brassicae* téměř vyloučené (Parlevliet, 1985). Populace *Plasmodiophora brassicae* jsou tedy směsí několika patotypů patogena (Diederichsen et al., 2009). Více patotypů může dokonce obsahovat i jeden nádor (Jones, 1982b; Fähling et al., 2003). Patotypy rozlišujeme jednak molekulárně a pak také biologicky, pomocí klasifikačních systémů.

Klasifikační (determinační) systém pro určení patotypů obsahuje diagnostické rostliny, které mají různou reakci na infekci různými patotypy *Plasmodiophora brassicae*.

Determinace patotypů *Plasmodiophora brassicae*

Hodnocení vizuálního napadení rostlin - nádorů na kořenech (ID Index of Disease)

U odebraných kořenů byla stanovována míra poškození na základě stupnice napadení (Kuginuki et al. 1999), kde odpovídá 0 – bez napadení, 1 – nádor na postranních kořenech, 2 – nádor na postranním a hlavním kořeni, 3 – velký nádor, hlavní kořen deformován. (Obr. 7)

Pomocí této stupnice byl vypočítán index napadení (ID -) a to pomocí vzorce:

$$ID (\%) = \frac{\sum (nx_0 + nx_1 + nx_2 + nx_3)}{Nx3} \times 100\%$$
, kde n je počet rostlin v jednotlivých stupních stupnice napadení a N je celkový počet rostlin (Strelkov et al., 2006).

Rozšíření patotypů *Plasmodiophora brassicae* v České republice

K určení patotypů *Plasmodiophora brassicae* ve vybraných izolátech z ČR byly použity tři klasifikační systémy – Williamsův (1966), ECD (Buczacki et al., 1975) a Somé et al. (1996). Zároveň byly použity dvě hranice reakce diagnostických rostlin – 25 % ID (index of disease) a 50 % ID, podle kterých se odpověď jedince stanovila jako náchylná nebo rezistentní. Při hranici 25 %, kterou použil ve své práci Somé et al. (1996), bylo v izolátech identifikováno pět patotypů podle Williamse (1966) – 1, 2, 4, 6 a 7, přičemž poslední patotyp převládá skoro v polovině izolátů. Determinace izolátů podle stejných klasifikačních parametrů probíhala současně i v Polsku a zde v izolátech převládá také patotyp 7. Společnými patotypy pro obě země byly patotypy 4, 6 a 7. Hranice 50 % ID (s 95 % konfidenčním intervalem), kterou použil LeBoldus et al. (2012), v českých izolátech identifikovala šest patotypů a opět převládá patotyp 7 (43% případů), následovaný patotypem 6 (29 %). V polských izolátech bylo při této hranici nalezeno 8 patotypů a převahu měly patotypy 7 a 6 (oba 25 % případů). Pět patotypů měly obě země společných. Souhrnně, pomocí Williamsova systému (1966) a při použití obou hranic ID, bylo v obou zemích identifikováno celkem devět patotypů s převládajícím patotypem 7, následovaným patotypy 6 a 4. Tyto výsledky se liší například od zjištění v Kanadě, kde na zdejší jarní řepce (canola) převládá patotyp 3 (Cao et al., 2009), který se v českých a polských izolátech vyskytoval vzácně. Další v Kanadě běžné patotypy 2, 4 a 6 (Cao et al., 2009) byly nalezeny i v českých a polských izolátech. Patotyp 6 byl v Kanadě zaznamenán pouze na brukvovité zelenině. V českých a polských izolátech zatím nebylo potvrzeno takové obligátní spojení a je pravděpodobné, že patotypy zjištěné na řepce jsou stejné i pro brukvovitou zeleninu už vzhledem k historii polí, kde se nejdříve pěstovala zelenina a nyní řepka. Toto tvrzení podporuje i fakt, že nejčastějším patotypem pozorovaným na brukvovité zelenině byl v bývalém Československu patotyp 7 (Rod, 1994).

Klasifikace podle Somého et al. (1996) přinesla v českých izolátech vyšší patotypovou variabilitu než v izolátech polských. Pomocí 25% hranice ID bylo identifikováno pět patotypů - P₁-P₅ a při hranici 50 % byl patotyp P₂ překvalifikován na P₃. V obou zemích pak převládá právě patotyp P₃ (67 % případů), následovaný P₁ (27 %) nehledě na zvolenou hranici ID, což je opět odlišné od situace v Kanadě, kde převládá patotyp P₂ (Cao et al. 2009). Podle předběžného testování převládají v Německu také patotypy P₃ a P₁, kde P₁ se vyskytuje zejména na severu

země a P₃ naopak na jihu (Lueders et al., 2011). Podobné rozmístění bylo zaznamenáno i v České republice a v Polsku.

Velmi heterogenní směs patotypů byla identifikována pomocí ECD setu. Při hranici 25 % ID bylo v České republice zjištěno deset různých patotypů a devět patotypů v Polsku, přičemž společný pro obě země byl pouze patotyp (16/14/31). Na základě hranice 50 % ID s 95% konfidenčním intervalem bylo rozlišeno celkem 15 patotypů. V České republice bylo zjištěno osm patotypů, s převládajícími patotypy 16/14/15, 16/14/13, 16/14/31 a 16/2/14. V obou zemích převažoval patotyp 16/14/15 (23 % případů). V Kanadě převládá na řepce podle ECD klasifikace patotyp 16/15/12, který nebyl nalezen v žádném z testovaných izolátů v Evropě. Oproti klasifikaci celých populací by bylo možné identifikovat daleko vyšší diverzitu patotypů pomocí jednosporových izolátů, jak bylo ukázáno ve studii Somého et al. (1996). Stejně zjištění přinesla studie Xue et al. (2008), kde k determinaci patotypů používali také monosporové izoláty, což naznačuje, že vzácné patotypy mohou být maskovány ve směsné mateřské populaci. Heterogenita a rozdílnost v patotypové skladbě v oblastech pěstování řepky ve východní Evropě a Kanadě by se tedy měla odrážet v managementu nádorovitosti v dané oblasti a zdroje rezistence by měly reflektovat patotypové složení konkrétního území, stejně jako by se měl volit vhodný osevní postup bránící degradaci rezistence a selekci nových virulentních patotypů. Vysoká heterogenita patotypů zjištěných v obou zemích naznačuje, že management nádorovitosti nebude snadný, a kromě správného osevního postupu, by se měl klást důraz i na snižování množství inokula pomocí preventivních opatření. Klasifikace patotypů je závislá na použité hranici mezi náchylnou a rezistentní reakcí diagnostických druhů, což může znesnadňovat možnost porovnání výsledků mezi jednotlivými diagnostickými laboratořemi, pokud nebude uplatňován jednotný systém. Na základě kombinačních tabulek jednotlivých diagnostických systémů byl podle napadení diagnostických rostlin určen druh patotypu *Plasmodiophora brassicae* v jednotlivých izolátech. Byly použity hranice 25 % a 50% pro rezistentní / náchylnou reakci diagnostických rostlin (Tab.1, 2).

Tabulka 1 Patotypy *Plasmodiophora brassicae* identifikované různými klasifikačními systémy v České republice (hranice 25 %).

Patotypy <i>Plasmodiophora brassicae</i> identifikované v České republice				
Izolát	Lokalita	Williams	Somé	ECD
1	Modlibohov	7	P3	16/14/31
2	Holany	7	P2	16/15/15
3	Bílý Kostel	2	P2	16/15/15
4	Horka u Bakova	7	P3	16/14/31
5	Třebnouševy	7	P2	16/15/31
6	Miletín	2	P2	16/15/31
7	Kbelnice	6	P3	16/14/14
8	Žirovnice	1	P5	16/22/30
9	Horusice	4	P5	16/22/31
10	Hrdějovice Ves	7	P2	16/15/15
11	Pohledy	1	P1	16/31/12
12	Kozmice	4	P1	16/31/15
13	Klokočov	7	P2	16/3/15
14	Hrádek n. Nisou	6	P4	16/14/14

Tabulka 2 Patotypy *Plasmodiophora brassicae* identifikované různými klasifikačními systémy v České republice (hranice 50 %).

Patotypy <i>Plasmodiophora brassicae</i> identifikované v České republice				
Izolát	Lokalita	Williams	Somé	ECD
1	Modlibohov	7	P3	16/14/31
2	Holany	7	P3	16/14/15
3	Bílý Kostel	2	P3	16/14/13
4	Horka u Bakova	7	P3	16/14/15
5	Třebnouševy	7	P3	16/14/31
6	Miletín	2	P3	16/14/15
7	Kbelnice	6	P3	16/2/14
8	Žirovnice	3	P3	16/2/14
9	Horusice	5	P4	16/18/15
10	Hrdějovice Ves	6	P3	16/14/12
12	Pohledy	9	P1	16/31/8
13	Kozmice	7	P3	16/14/15
14	Klokočov	7	P3	16/2/15
15	Hrádek n. Nisou	6	P4	16/10/4
16	Terezín	7	P3	16/14/13
17	Ředice	2	P3	16/14/13

PODMÍNKY PRO VZNIK INFEKCE NA BRUKVOVITÝCH ROSTLINÁCH

Výskyt symptomů závisí na specifických teplotních a vláhových podmínkách především v době setí a vzcházení. Infekci podporují vyšší teploty a vyšší půdní vlhkost (Gossen et al., 2012). Na mnoha polích v ČR se může zatím vyskytovat pouze malé množství spor, jejichž distribuce je nerovnoměrná. Jakmile dojde k namnožení inokula a jeho rozšíření pomocí zemědělské techniky, je zde, v součinnosti s optimálními teplotními a vláhovými podmínkami, prostor pro vznik celoplošné infekce. Je důležité si uvědomit, že jednou zamořený pozemek je v praxi infekční velmi dlouhou dobu. Každá infikovaná rostlina má potenciál navrátit do půdy až 8×10^8 klidových spor. Při příznivých podmínkách stačí k infikování rostliny 1 spora.

Spory Plasmodiophora brassicae

Koncentrace spor pro infekci není až tak důležitá, jako součinnost ostatních podmínek podporujících klíčení a životnost zoospor. Infekční tlak je modifikován prostředím a je důležitá souhra faktorů jako je pH, vlhkost, teplota, velikost, nutriční stav a věk spor, stejně jako interakce mezi hostitelem a patogenem. Velmi nízká koncentrace spor ve vhodném prostředí může způsobit úspěšnou infekci a následnou kolonizaci. Zásadní je také přítomnost zoospor v přímé blízkosti vhodných kořenových vlásků, protože jejich pohyblivost je v rozmezí okolo 10 - 20 mm. Uvádí se, že nejvíce spor (97 %) je přítomno ve svrchní vrstvě půdního horizontu v hloubce 0 - 5 cm, tedy v rhizosféře, pouze malé množství spor bylo nalezeno pod hranicí 40 cm (Kim et al., 2000).

Roli hraje i vzájemný antagonismus mezi zoosporami, protože se dohromady vyskytují vždy zoospory více patotypů a ty pravděpodobně mohou soupeřit o místo v kořenových vláscích

Pokud jsou spory v půdě v podmínkách, které jim nevyhovují, potom se jejich životaschopnost rapidně snižuje a klíčení se zpomaluje nebo úplně zastavuje.

Podíl klíčících spor se zvyšuje s množstvím vyloučených kořenových exsudátů hostitelských rostlin, pokud je dosaženo součinnosti všech potřebných faktorů – půdní vlhkosti, teploty, pH, intenzity světla a dalších jako je například velikost spor, jejich stáří a stupeň výživy. Organické a anorganické půdní změny, které stimulují půdní mikroflóru, mají významný vliv na přežití *Plasmodiophora brassicae*. Například některé bakterie rodu *Bacillus* spp. a rodu *Pseudomonas* spp. se významně podílejí na růstu populace patogena. Naopak biotického potlačení choroby u čínské zeli (*B. rapa*) se dá docílit například půdní houbou *Heteroconium chaetospora*.

Při nevhodných podmínkách prostředí je pro nákazu patogenem potřebná vyšší koncentrace spor. Rod (1996) uvádí 50 kusů vitálních spor v 1 gramu zeminy. Za ideálních podmínek pak uvádí 1 vitální sporu na 10 g zeminy. Dále ještě zmiňuje, že klíčivost trvalých spor je ovlivněna stářím nádoru, ze kterého se uvolňují, čím starší nádor, tím je klíčivá schopnost větší.

Vlhkost půdy

Jedním z nejdůležitějších faktorů je půdní vlhkost, která ovlivňuje šíření zoospor. Patogenu se nejvíce daří v nízkých polohách, na špatně odvodněných půdách a k nejintenzivnějšímu šíření dochází po deštivém období. Minimální půdní vlhkost pro rozvoj spor je 45 % plné vodní kapacity. Minimální půdní vlhkost pro infekci je 50 % plné vodní kapacity a ideální vlhkost pro infekci v rozmezí 70 – 90 %. Vyšší vlhkost je pro patogen škodlivá, protože vyžaduje aerobní podmínky. Wellman (1930) zjistil, že 18 hodinové vystavení sazenic zelí sporám v mokré, zamořené půdě bylo dostatečně dlouhým časovým obdobím pro infekci rostlin. Z toho vyplývá, že silný déšť nebo několik přeháněk během dne, při jinak suchém období, stačí pro šíření zoospor v půdě, když vlhkost půdy v kořenové zóně přesáhne 50 % plné vodní kapacity. Podle našich pozorování v posledních letech, infekce probíhá při dostatečném ovlhčení i za méně příznivých podmínek (např. nižší teplota).

Voda vyplňující větší půdní póry je velmi důležitá pro rozptylování zoospor a ovlivňuje procesy narušování a pronikání zárodků choroby ke kořenovým vláskům.

Teplota

Teplota má především významný vliv na kolonizaci kořenového vlásku a růst zoosporangii během druhého týdne po infekci. Role teploty není tedy blokační, jako je to např. u pH, ale spíše regulační. Ideální teplota pro vývoj choroby je v rozpětí mezi 18 – 24 °C. K infekci kořenů nedochází, pokud je teplota půdy nižší než 12 °C a zároveň vyšší než 27 °C. Někdy se uvádí širší rozpětí teplot vhodných pro infekci v rozmezí od 9 °C do 30 °C.

Pro praktické využití je důležité, že setí řepky do chladnější půdy pozdržuje průběh infekce a vývoj nádorů a tím redukuje negativní vliv choroby na výnos při sklizni.

Půdní reakce (pH)

Významné je během celého životního cyklu také pH půdy, které v alkalických hodnotách prokazatelně redukuje klíčivost spor a infekčnost zoospor. Půdy s kyselou reakcí naopak podporují průběh klíčení a infekce *Plasmodiophora brassicae*.

Optimální pH půdy pro infekci se pohybuje za normálních podmínek u lehkých půd v rozmezí 5,5 – 6, u středních půd 6 – 6,5 a u těžkých půd se pH pohybuje kolem hodnoty 7. Na našem území byla nádorovitost zjištěna na pozemcích s půdní reakcí v rozmezí pH 4,7 - 7,4.

Aplikací vápna a zvýšením pH lze snížit dlouhověkost, životaschopnost spor a tím výskyt nádorovitosti. Vliv půdní reakce je patrný, pokud je koncentrace vitálních spor v půdě nízká. Jinak nemá půdní reakce takový vliv a hlavní roli hraje obsah vápenatých iontů v půdě.

Délka dne

Přestože se jedná o půdní organismus, intenzita a délka osvětlení mají vliv na infekci *Plasmodiophora brassicae*. Intenzita a délka osvětlení má velký význam pro vzájemný vztah mezi koncentrací spor v půdě a počtem infikovaných rostlin. (Intenzita a délka osvětlení je totiž úzce spjata s fotosyntézou, která je hnacím mechanismem pro aktivaci a růst patogena v kořenové soustavě. Nízká intenzita osvětlení potlačuje růst kořenů a zároveň i růst nádorů. U pekinského zelí bylo zjištěno, že se nádory na kořenech nevytvářejí, když délka dne nepřekračuje 11,5 hodiny. Za ideální podmínky pro rozvoj choroby je považována délka dne 13 – 16 hodin v prvních 11 dnech po infekci a intenzita světla by měla být za vhodných podmínek 600 Wh na m⁻² a den⁻¹ (Rod, 1996). Délka dne v období nejčastějšího setí a vzcházení řepky v ČR mezi 15.8. a 1.9. se postupně zkracuje ze 14 hodin 30 minut na 13 hodin 30 min.

Pro vznik infekce je toto období tedy ideální. Délka dne pod 11,5 hodiny nastává až začátkem října.

Struktura půdy

Složení a zrnitost půdy je také jedním z faktorů ovlivňujících projev napadení patogenem. Zvýšené riziko napadení rostlin patogenem je na půdách utužených těžkou zemědělskou technikou. Nejvíce je půda utužována na souvratích a dochází zde k zamokření, což vede ke snadnějšímu šíření spor *Plasmodiophora brassicae*. Za půdy podporující rozvoj patogena jsou rovněž pokládány lehké půdy, půdy s vyšším obsahem humusu a jílovité půdy, stejně také půdy s vyšší vodní kapacitou jako jsou různé usazeniny a kaly. Nejvíce napadených rostlin a následných ztrát v našich podmínkách bylo zjištěno na extrémních půdních druzích – jílovitých a písčitých, které měly nižší obsah humusu (1 – 3 %).

Minerální látky

Bor (B)

Existuje významný vztah mezi infekcí hostitelských rostlin *Plasmodiophora brassicae* a koncentrací boru a vápníku v půdě. Pokud chybí bor v půdě, je potlačena funkce vápenatých iontů při regulaci tvorby nádorů na kořenech rostlin a v důsledku toho se aplikace vápna na postižená území májí účinkem. Bor tedy působí v součinnosti s vápníkem a ovlivňuje u patogena hlavně zoospory. V prostředí se zvýšenou hladinou boru jsou inhibiční účinky vápna čitelné v obou fázích – fázi infekce kořenových vlásků i kortikální infekce. Ve fázi infekce kořenových vlásků dochází vlivem toxicity obou prvků k zabránění pronikání zoospor do kořenových vlásků. Ve fázi kořenové (kortikální) infekce bor zpomaluje procesy rozvoje *Plasmodiophora brassicae*, konkrétně zpomaluje dozrávání sporangií patogena. Bor také ovlivňuje imunitní systém rostliny, symptomy napadení *Plasmodiophora brassicae* jsou v půdě s vyšším obsahem boru slabší.

Zvyšováním obsahu boru v půdě lze omezit schopnost zoospor pronikat ke kořenovému systému a usazovat se zde. Aplikace by ovšem měla proběhnout před zasetím řepky.

Dusík (N)

Vysoká koncentrace dusíku má v půdě za následek potlačení příznaků choroby a nízká koncentrace dusíku naopak napomáhá k silnějšímu projevu a rozvoji choroby. Přidáním dusíku se stimuluje přesun volných aminokyselin v buňkách, což vede složitým biochemickým procesem až k redukci funkce RNA-polymerázy patogena, která zodpovídá za syntézu RNA, potřebných k patogennímu působení *Plasmodiophora brassicae* na rostliny.

Vztahy mezi umělým hnojivem – dusíkaté vápno a nádorovitostí brukvovitých, byly zkoumány více než 70 let. Dodání dusíkatého vápna do zamořené půdy je zajištěna redukce rozvoje patogena. Rozklad dusíkatého vápna v půdě je víceetapový. Nejprve vlivem půdní vlhkosti vzniká kyanamid, který je toxický pro rostliny, ale i pro *Plasmodiophora brassicae*. Dalšími produkty jsou amoniak a močovina, které jsou dále nitrifikovány a amonizovány (Vaněk a kol., 2007). Produkty degradace dusíkatého vápna snižují životnost spor *Plasmodiophora brassicae*, zároveň mění makrobiotickou rovnováhu a podporují růst mikrobiálních antagonistů *Plasmodiophora brassicae*. Aplikace dusíkatého vápna má větší význam v případě ochrany zeleniny, tedy na menších plochách, aplikace na velké plochy oseté ozimou řepkou je ekonomicky náročná.

ZPŮSOBY ŠÍŘENÍ *PLASMODIOPHORA BRASSICAE*

Mikroskopické trvalé spory (3 - 4 μm) se dokážou šířit na velké vzdálenosti mnoha různými způsoby. Za jeden z hlavních způsobů se považuje přenos zamořenou zeminou. V zemědělské praxi je časté šíření spor na zemědělském náčiní, na kolech traktorů, obuvi, rozšiřování zvířaty v chlévském hnoji, závlahovou vodou a samozřejmě na kořenech hostitelských rostlin, na hlízách brambor, brukvovitými plevely nebo sadbou s kontaminovanou zeminou.

V posledních letech bylo prokázáno šíření spor v průmyslových kompostech. V současné platné legislativě není zakotvena povinnost sledovat obsah spor v průmyslových kompostech ani v dalších hmotách, které se rozváží na pole (např. kaly z cukrovarů nebo lihovarů).

Šíření na krátké vzdálenosti aktivním pohybem v rhizosféře je možný pomocí primárních i sekundárních zoospor, které dokážou uplavat maximálně 25 - 75 mm. Patogen se může šířit i větrem při tzv. větrných erozích, kdy je půda se spory odnášena na obrovské vzdálenosti. Je možné šíření spor i na krátké vzdálenosti drobnými půdními živočichy, mezi které se řadí žížaly, háďátka aj.

Přímé šíření osivem není možné, patogen do semen neproniká. Možné však může být nepřímé šíření. Krátce před sklizní nebo v průběhu sklizně mohou být zaneseny spory na semena zvířeným prachem větrem nebo stroji.

METODY DETEKCE *PLASMODIOPHORA BRASSICAE*

Symptomatická detekce napadených rostlin, zvláště několik měsíců po infekci je jednoduchá. Mnohem důležitější je však detekovat výskyt spor v půdě před zasetím hostitelských rostlin – řepky olejky.

Plasmodiophora brassicae je obligátní parazit, který nelze kultivovat, což jeho detekci znesnadňuje. Obvykle se používají laboratorní metody detekce biologické/symptomatické, mikroskopické, serologické nebo molekulární. V současné době je možno k tomu využít v laboratořích s příslušným vybavením kvalitativní i kvantitativní molekulární metody, které jsou rychlé a přesné.

Biologická metoda (bioesej)

Použití náchylných rostlin k ověření přítomnosti *Plasmodiophora brassicae* ve vzorku půdy je jednou z nejspolehlivějších metod.

V zemině podezřelé z přítomnosti *Plasmodiophora brassicae* jsou po dobu 5 - 6 týdnů pěstovány náchylné rostliny za kontrolovaných podmínek. Po 5 – 6 týdnech je možné vizuální vyšetření přítomnosti symptomů na kořenech rostlin. Jako náchylná rostlina je nejčastěji používáno pekingské zelí cv. Granaat, který je univerzální hostitel všech patotypů *Plasmodiophora brassicae*. Tato metoda je časově náročná a pracná a je použitelná, pokud inokulum dosáhne koncentrace 1000 spor v 1 g půdy. Limitující může být i náročnost na prostory ve skleníku. Výsledek biologického testu přinese pouze informaci o přítomnosti patogena v zemině, nikoli však o jeho množství.

Mikroskopické metody

Další diagnostické metody zahrnují mikroskopické vyšetření kořenových vlásků a kořenů na přítomnost projevů infekce *Plasmodiophora brassicae*. Mikroskopicky lze také vyšetřovat půdu, kde je možné pomocí fluorescenčního barvení detekovat přítomnost trvalých spor *Plasmodiophora brassicae* (Takahashi et Yamaguchi, 1988). Autoři vyvinuli protokol na přípravu mikroskopického preparátu obarveného dvěma barvivý, která dokážou detekovat i životaschopnost spor. První barvivo - Calcoflor White M2R, se váže na chitin v buněčných stěnách v nepoškozených sporách. Druhé barvivo – ethidium bromid, prostoupí poškozené a neživotaschopné spory. Živé spory pak fluoreskují modře a neživé spory červeně. Potvrzena byla i korelace mezi intenzitou modrého záření a mírou napadení (ID – disease index) (Takahashi et Yamaguchi, 1989). Tato metoda je opět časově náročná a vyžaduje zkušeného laboranta.(Obr. 8).

Barvení může být prováděno i u spor izolovaných z nádorů nebo celých pletiv podezřelých na infekci *Plasmodiophora brassicae*. Používá se mnoho různých chemikálií, které se váží opět na chitin v buněčných stěnách spor. Pro vitální barvení lze použít Evansovu modř (Rennie et al., 2011) nebo orcein (Rod, 1996), kterým lze obarvit živé spory. Neživé spory absorbují barvivo dovnitř, zatímco u vitálních spor se zbarví jen buněčné stěny.

Sérologické metody

Vyvinuty byly i serologické metody pro detekci *Plasmodiophora brassicae*, založené na polyklonálních antisérech. Testy dosáhly citlivosti 100 spor v 1 gramu půdy (Wakeham et White, 1996).

Metody založené na polyklonálním antiséru ovšem poskytují výsledky, které mohou být ovlivněné variabilitou ve specifičnosti a citlivosti antiséra. Vhodné by tedy bylo vyvinout test založený na monoklonálním antiséru, které by mělo lepší specifičnost a zároveň je lépe dostupné.

Molekulární metody

PCR (polymerázová řetězová reakce)

Vyvinuto bylo několik protokolů s primery, které pocházejí z ITS regionů (úseky ribozomální DNA) v genomu patogena (Cao et al., 2007; Chee et al., 1998; Faggian et al., 1999; Wallenhammar et Ardwidsson, 2001) a jeden primerový pár, který je založen na amplifikaci isopentyltransferazy (Ito et al., 1999). Primery a podmínky PCR reakce jsou vyvinuty tak, aby specificky amplifikovaly (množily) pouze DNA úsek patogena (Hwang et al., 2012). PCR metoda poskytuje rychlé a spolehlivé výsledky zda je patogen přítomen či nepřítomen v různých druzích vzorků (Hwang et al., 2012). PCR protokol vyvinutý Cao et al. (2007) se běžně používá ke komerčním účelům pro detekci *Plasmodiophora brassicae* z rostlinného materiálu či ze zeminy (Hwang et al., 2012). Jedná se o první jednokrokový PCR protokol pro detekci *Plasmodiophora brassicae*, který dokáže identifikovat 100 fg a méně DNA patogena ve vzorku, což odpovídá 1000 sporům v 1 gramu půdy nebo rostlinám s 11% mírou napadení (ID – index of disease) (Hwang et al., 2012). Běžný PCR test poskytuje pouze informaci o přítomnosti či nepřítomnosti patogena ve vzorku (Hwang et al., 2012)

qPCR (kvantitativní polymerázová řetězová reakce, také real – time PCR)

Naopak poměrně nová technologie qPCR informaci o množství DNA patogena ve vzorku poskytuje (Hwang et al., 2012). Vyvinuto bylo opět několik protokolů (Sundelin et al., 2010; Rennie et al., 2011, Wallenhammar et al., 2012). Metoda qPCR je založená na detekci fluorescenčního signálu při amplifikaci daných úseků DNA patogena. Protokol Rennie et al. (2011) je vytvořen na základě detekce signálu barviva SYBR green. Množství DNA je podle množství použitého vzorku přepočítáno na spory. Metoda dokáže detekovat 1000 a více spor v 1 gramu půdy s přesností na tisíce (Rennie et al., 2011).

Obě metody byly použity pro detekci a kvantifikaci *Plasmodiophora brassicae* v půdních vzorcích v laboratoři KOR ČZU Praha. Výsledky obou technik byly u většiny vzorků konzistentní. Vyskytlo se ovšem i několik případů, kdy byl vzorek testovaný pomocí konvenční PCR negativní, ale po otestování qPCR vykazoval kvantifikovatelné množství DNA patogena. Metoda qPCR je tedy senzitivnější, a tím pádem i spolehlivější. Podobné výsledky měla i Wallenhammar et al. (2012), jejíž metoda dosahovala detekčního limitu 500 spor/g půdy. Konkrétní výsledky qPCR analýz ukazují, že nejvyšší koncentrace spor v testovaných vzorcích byla 4×10^6 spor/g půdy, naproti tomu nejnižší hodnota koncentrace byla $3,75 \times 10^4$ spor/g půdy (ve vzorku). V mnoha případech byly výsledky ze dvou nezávislých měření rozdílnými

způsoby podobné nebo byly alespoň ve stejném řádu. Kvantitativní PCR je také vhodná k mapování koncentrace spor na pozemcích a vytvoření mapy koncentrace spor. V neprospěch používání qPCR při běžné detekci stojí její vyšší cena a další s ní spojené výdaje. Pořízení cykleru se schopností detekce fluorescenčního signálu je vyšší než cena cykleru pro konvenční PCR. Cena za samotnou analýzu vzorků je také vyšší, pohybuje se okolo 180 Kč za reakci (včetně izolace DNA) při qPCR na rozdíl od 130 Kč za vzorek z konvenční PCR. Každý vzorek v qPCR je analyzován nejméně v dupletu, lépe v tripletu. Komplikovaná a časově náročná je také příprava standardní křivky. Vzorek křivky musí být nejdříve kvantifikován pomocí Bürkerovy komůrky, posléze upraven centrifugací v glukóze a následně je z něj izolována DNA. Nicméně i přes tuto náročnost je používání qPCR v diagnostických laboratořích v současnosti již standardem. (Obr. 9)

OCHRANA PROTI ŠÍŘENÍ A INFEKCI ROSTLIN PATOGENEM

PLASMODIOPHORA BRASSICAE

Ochrana proti nádorovitosti se dá rozdělit na dvě části, první je prevence šíření spor mezi pozemky a druhou je samotná ochrana rostlin proti *Plasmodiophora brassicae*.

Prevence šíření Plasmodiophora brassicae

Sanitace

Bohaté zkušenosti s nádorovitostí mají i pěstitelé řepky v Kanadě, kde choroba propukla již v roce 2003 a v současné době postihuje tisíce hektarů půdy (Hwang et al., 2014a). Kanadští odborníci vyvinuli metodiku čištění a dezinfekce zemědělské techniky pro prevenci šíření spor mezi jednotlivými pozemky (Howard et al., 2010).

V Kanadě byl sestaven certifikovaný manuál pro prevenci šíření spor *Plasmodiophora brassicae*. Všechny doporučené metody byly laboratorně otestovány a prověřeny jako účinné při boji s nádorovitostí. Zemědělské stroje, například pluh, mohou přenášet až desítky kilogramů zeminy se spory *Plasmodiophora brassicae*. Proto je čištění povrchů přístrojů, nářadí a vozidel nezbytné stejně jako například kontrola při převozu rostlinného materiálu, osiv či vody).

Čištěné stroje jsou ještě na poli umístěny na speciální rošty, které zadržují odtékající vodu a chemikálie použité k čištění. Samotné čištění přístrojů zahrnuje tři navazující kroky:

a) hrubé čištění oškrábáním a očištěním kartáči nebo odstranění zeminy pomocí proudy vzduchu, následuje

b) jemné čištění prostřednictvím podtlakového mytí vodou, nebo mytí pomocí kartáčů

c) dezinfekce, která je aplikována na čištěné povrchy po dobu 20 minut. K dezinfekci se využívá deset nejúčinnějších testovaných látek, mezi kterými jsou chlornan sodný, peroxid vodíku, kyselina octová či hydrogenperoxosíran draselný.

Nejdůležitější a nejkritičtější krok při čištění je hrubé a jemné čištění, které má za úkol odstranit 99 % všech nečistot a potenciálně také spor. Dezinfekce je pak jen pojistný krok. Doba čištění se liší podle velikosti stroje, například čištění rotačních bran zabere 2 hodiny, čištění secího stroje až 5 hodin. Čištění se týká i dalších vozidel, které zajíždějí na pole (např. agronomové, elektrikáři) nebo samotných zemědělců, kteří by měli používat speciální obuv či jednorázové návleky. K zavlečení patogena na další pozemek stačí totiž velmi malé množství spor (Obr. 10, 11).

Bylo testováno i čištění pomocí tepla, které se ovšem neukázalo jako účinné, protože spory byly životaschopné i po třech hodinách při teplotě nad 100 °C (Howard et al., 2010).

Je otázkou, zda se preventivní metody čištění uplatní i v České republice, protože je to procedura extrémně časově náročná a během pěstební sezóny i těžko organizačně zvládnutelná.

Čištění by měly provádět všechny podniky se zamořenými plochami v dané oblasti. Jakmile jeden podnik stroje nevyčistí, a projede s nimi po společné komunikaci, hrozí riziko, že si kontaminovanou zeminu nabalí na stoje i ostatní pěstitelé, kteří je vyčistili.

Spory se mohou šířit i na botách. V Kanadě je běžné, že pěstitelé vstupují na zamořené pozemky v jednorázových návlecích, které jsou po opuštění infekčního prostředí zlikvidovány (Obr. 12).

Důsledné používání preventivních opatření se bude také odvíjet od toho, v jaké míře na našem území infekce nádorovitostí propukne a jaké množství ploch zasáhne. V Kanadě v provincii Alberta se infekce během 10 let rozšířila z 12 polí na 1064 polí (r. 2013) (Strelkov, 2008).

Termín výsevu

Infekce *Plasmodiophora brassicae* je podporována vysokou půdní vlhkostí a teplotou okolo 25 °C. Jednou z možností prevence infekce je posunutí termínu výsevu. Nízké teploty půdy prokazatelně inhibují vývoj patogena. Starší rostliny vykazují v chladné půdě menší náchylnost k infekci, a pokud infekce proběhne, nemá tak velký vliv na výnos. Kanadské pokusy s posunutím termínu výsevu jarní řepky směrem k časným výsevům prokazují snížení míry napadení a zvýšení výnosů, s tím, že se ovšem snížila i klíčivost (Hwang et al., 2011a). Gossen et al. (2012) uvádí snížení míry napadení o 10 – 50 % a zvýšení výnosů až o 30 – 58%. Podobných výsledků bylo dosaženo i na zelenině (Gossen et al., 2009). Předchozí výzkum také prokázal, že mladší rostliny brukvovitých jsou náchylnější k infekci, než rostliny starší. Pětidenní rostlinky byly náchylnější k infekci než rostlinky ve stáří 10 – 25 dní. Menší náchylnost k infekci u starších rostlin zřejmě souvisí se ztlušťováním buněčné stěny a tvorbou další obranných struktur. Posunutí termínu výsevu není ovšem jediným zásahem v ochraně proti *Plasmodiophora brassicae* a je nutné ho spojit s dalšími zásahy (Hwang et al., 2014b).

V našich podmínkách je posunutí termínu výsevu ozimé řepky až do období nižších teplot půdy prakticky nemožné. O intenzitě napadení rostlin spíše rozhoduje množství srážek v období po zasetí, než teplota. Pro rozvoj infekce je ideální teplé počasí v období setí, které doprovází opakované bouřkové lijáky. Tyto prudké deště často rozbahňují půdu zejména na utužených částech pozemků a vytváří tak ideální podmínky pro infekci kořínků čerstvě vzešlých rostlin.

Chladné a vlhké počasí koncem srpna, kdy naprší pouze pár milimetrů srážek denně obvykle dobré podmínky pro infekci nepřipraví.

Při dlouhém suchém období po zasetí, bez ohledu na teploty, k infekci prakticky nedochází i na pozemcích s velkým množstvím spor.

Ochrana proti Plasmodiophora brassicae

Vliv osevního postupu

Peng et al. (2014) prováděli v letech 2011-2012 několik pokusů na vliv osevního postupu na infekci *Plasmodiophora brassicae* u jarní řepky. Na zamořeném poli testovali náchylnou odrůdu, odrůdu středně náchylnou a rezistentní odrůdu v rozestupu 0, 1, 2, 3 a 4 let mezi osetím řepkou. Delší rozestupy obecně redukovaly koncentraci inokula v půdě. Po dvouletém rozestupu se snížila koncentrace trvalých spor až o 90 % v porovnání s jednoletým rozestupem nebo kontinuálním pěstováním řepky na stejné ploše. Ačkoliv delší rozestup nesnížil míru poškození (ID – index of disease) u náchylných a středně náchylných odrůd v porovnání s kontinuálním pěstováním, došlo ke zmírnění negativního dopadu choroby na vývoj rostlin. Výnos na plochách s delším rozestupem byl vyšší v porovnání s plochami kontinuálně pěstované řepky. Tří a víceletý rozestup vykazoval vyšší výnos náchylných a středně náchylných odrůd vůči těm v kratších rozestupech. U rezistentních odrůd zvýšil dvouletý rozestup výnos až o 25 % v porovnání s kontinuálním pěstováním (ačkoliv měly stejný ID a další parametry hodnocení).

Zmíněné výsledky podporují předchozí. Metabolickou náročnost při infekci rezistentních odrůd lze doložit pokusem Deora et al. (2013), kteří zkoumali semenáčky

4 rezistentních odrůd během infekce *Plasmodiophora brassicae*. Semenáčky inokulované vysokou dávkou inokula vykazovaly pomalejší vývoj a méně biomasy než semenáčky kontrolní, neinokulované. Energie vydaná do imunitní reakce pak schází při růstu a tvorbě výnosu.

Proto je nutné zachovávat nejméně tříleté rozestupy v setí i rezistentních odrůd řepky nejen z důvodu ochrany rezistence, ale také pro snížení vlivu infekčního tlaku na výnos a minimalizace výnosových ztrát na zamořených polích.

Lapací rostliny

Dalším z možných doplňujících managementových opatření v ochraně proti *Plasmodiophora brassicae* je použití „lapacích“ rostliny (anglicky „bait crop“ – návnadové rostliny), které indukují klíčení trvalých spor při absenci hostitele. Kromě nehostitelských rostlin, (viz kapitola Nehostitelské rostliny), lze k vylapávání použít i samotnou řepku. Skleníkové pokusy s výdrolom náchylných odrůd prokázaly snížení množství spor (Ahmed et al., 2010). Výdrol v infikované půdě se nechal vzejít a proběhla primární fáze infekce patogenem, než mohla proběhnout sekundární fáze - vznik nádorů a trvalých spor, byl výdrol zničen, buď chemicky nebo mechanicky nebo kombinací obou metod. Tento postup fungoval dobře při skleníkových pokusech, ovšem na zamořeném pozemku přinesl různé výsledky. Pokud byl pozemek zamořen mírně (koncentrace spor v půdě nebyla vysoká), dokázal výdrol množství spor v půdě zmenšit, pokud ovšem koncentrace přesáhla určité množství (1×10^6 spor/g půdy), nebyla vylapávací funkce výdrolu účinná, zřejmě z důvodu omezené kapacity kořenů.

Rezistentní odrůdy

V současnosti je jedinou reálnou a účinnou ochranou proti *Plasmodiophora brassicae* používání rezistentních odrůd ozimé řepky v kombinaci se správným osevním postupem.

Mechanismus rezistence je založen na potlačení vývoje patogena v hostiteli, než na zabránění samotné infekci. Termín rezistence je celosvětově používán, protože zabránění infekci probíhá na základě genů rezistence a ne tolerance. Dochází zde také k proniknutí patogena do kořenových vlásků rezistentního hostitele (primární cyklus infekce). Sekundární infekce kořenové kůry rezistentní rostliny také probíhá, ale vzniklé sekundární plasmodium nedozrává pouze s malým množstvím jader a netvoří se trvalé spory. Během rezistentní odpovědi dochází k malému potlačení primární infekce a k výraznému potlačení infekce sekundární, kde také dochází k mnohem menšímu porušení buněčných stěn a není zastaveno druhotné tloustnutí stonku. Imunitní reakce hostitele zahrnuje aktivaci metabolických cest pro syntézu fytoalexinů, fenolických látek, ligninu a dalších látek zabraňujících invazi patogena. Obecně jsou zdroje rezistence proti *Plasmodiophora brassicae* limitované (Hirai, 2006). V první dekádě nového tisíciletí byly na trh uvedeny odrůdy Mendel a Tosca. Jedná se o heterozygotní hybridní odrůdy s jedním genem patotypově specifické rezistence. Rezistence těchto odrůd byla rychle prolomena ve Velké Británii, kde byly pěstovány pod velkým infekčním tlakem (Diederichsen et al., 2003). V Kanadě byly tyto odrůdy testovány a infikovány místními patotypy. Odrůda Mendel vykazovala rezistenci vůči patotypům 2, 3, 5, 6 a 8 (Williamsův systém) (Rahman et al. 2014). Odrůda Tosca byla náchylná k patotypu 3 a rezistentní k patotypu 2 (Peng et al., 2013). Tyto výsledky ukazují, že rezistence je poměrně variabilní a některé geny rezistence mohou být neúčinné v určitých regionech s výskytem specifického patotypu. Na základě využití genů z těchto odrůd byly v Kanadě v roce 2009 zavedeny rezistentní odrůdy jarní řepky (Peng et al., 2014). V roce 2016 byla v Kanadě na trh

uvedena další odrůda, která nese gen rezistence z odrůdy Mendel a k tomu další mechanismus rezistence založený patrně na více genech rezistence s menším účinkem. Molekulární původ tohoto druhého mechanismu není zatím známý, nová odrůda vznikla šlechtěním a negativní selekcí, takže molekulární původ zdroje rezistence se bude teprve hledat (Fredua, Agyeman et Rahman, 2016).

Aktuálně jsou na evropském trhu k dispozici odrůdy řepky s rezistencí odvozenou od první rezistentní odrůdy Mendel. Očekává se, že na trh se v dalších letech dostanou odrůdy se širším spektrem rezistence. Ovšem ani tyto odrůdy se neobejdou bez patřičných agrotechnických opatření a správného managementu rezistence.

Rezistence odrůdy Mendel je v současné době v Německu na několika místech prolomena a probíhá testování izolátů *Plasmodiophora brassicae* odebraných z těchto lokalit za účelem zjištění genetické variability a výzkumu mechanismu prolomení rezistence (Diederichsen et al., 2014).

Od roku 2013 byla ověřována rezistence komerčně nabízených rezistentních odrůd ozimé řepky v podmínkách České republiky. Tyto odrůdy nebyly registrovány v České republice a byly pěstovány na základě zapsání ve Společném katalogu odrůd druhů zemědělských rostlin pěstovaných v Evropské unii. Teprve od sezóny 2015 – 16 je zařazen do státních odrůdových zkoušek jeden materiál s deklarovanou rezistencí proti patogenu *Plasmodiophora brassicae* (Obr. 13, 14,15).

Rezistence byla zkoušena ve skleníkových i polních poloprovozních pokusech.

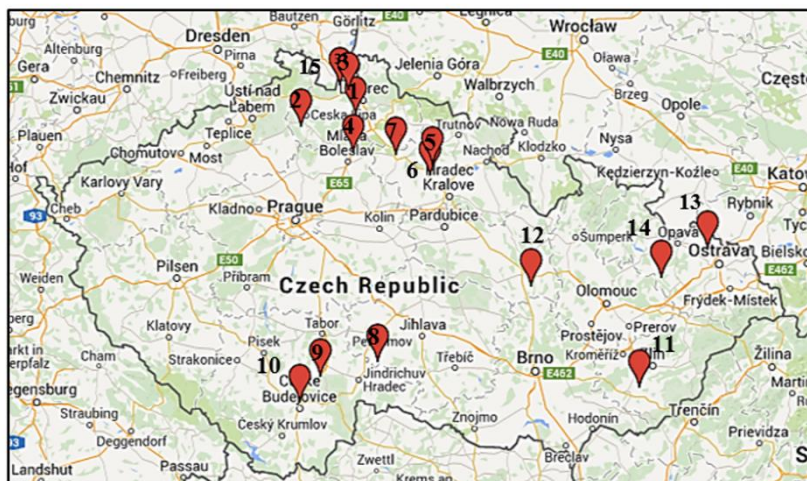
Skleníkové pokusy

Skleníkové pokusy s odrůdami řepky s deklarovanou rezistencí k nádorovitosti probíhaly na Katedře ochrany rostlin ČZU v Praze v letech 2013 až 2015.

Na podzim v letech 2012 a 2013 byly agronomy Svazu pěstitelů a zpracovatelů olejnin odebrány vzorky zeminy z polí se silně napadenými porosty (Obr. 16), a to vždy ze stejných míst. V rámci České republiky se jednalo o lokality z území, kde byl zaznamenán silný výskyt nádorovitosti v předchozích letech. V roce 2014 nebyly některé vzorky dodány (lok. 8, 10 a 11) a u vzorku z lokality 1 neproběhla úspěšná infekce kontroly, proto byla z pokusů vyřazena. V roce 2014 byl přidán vzorek z lokality 15 – Hrádek nad Nisou. V roce 2015 byly testovány vzorky zamořené zeminy z nových lokalit dodaných samotnými farmáři.

Obrázek 16 Lokality odběrů vzorků z napadených polí

Č.	Jméno lokality
1	Modlibohov
2	Holany
3	Bílý Kostel n. N.
4	Horka u Bakova
5	Třebnouševs
6	Miletín
7	Kbelnice
8	Žirovnice
9	Horusice
10	Hrdějovice Ves
11	Velké Bílovice
12	Pohledy
13	Kozmice
14	Klokočov
15	Hrádek n. Nisou



Použité odrůdy

Ve skleníkových pokusech byly použity odrůdy s deklarovanou rezistencí Mendel její pokračovatel Mendelson (obě odrůdy - šlechtitel NPZ H.G. Lembke, Rapool - distributor pro ČR), CWH 241 (distributor Monsanto), Mentor (distributor Rapool), SY Alister (šlechtitel a distributor Syngenta), PT 235 (šlechtitel a distributor Pioneer). Všechny odrůdy jsou u nás distribuovány na základě registru Evropské Unie. Jako kontrola byla v roce 2013 použita anonymní náchylná odrůda ozimé řepky, v roce 2014 bylo ještě jako kontrola přidáno pekingské zelí cv. Granaat, které je silně náchylné k napadení *Plasmdiphora brassicae*.

Průběh pokusu

Na jaře 2013 a 2014 byly jednotlivé odrůdy vysety do květináčů naplněných zeminou z jednotlivých lokalit. Bylo vyseto 30 rostlin na jeden půdní vzorek a jednu odrůdu, a to vždy po 4 rostlinách v jednom květináči, celkem tedy 2940 rostlin v roce 2013 a 2640 rostlin v roce 2014. V roce 2015 bylo testováno méně lokalit, počet rostlin byl tedy celkově nižší - 1530 rostlin. Květináče byly umístěny v technickém izolátoru, byly pravidelně zalévány a přihnojovány. Teplota v izolátoru se pohybovala v rozmezí vhodném pro infekci a růst nádorů (20 - 22°C). Po dvou měsících byly pokusy ukončeny a byla vyhodnocena míra napadení jednotlivých odrůd.

Hodnocení pokusu

Míra napadení byla určována na základě stupnice napadení (Kuginuki et al. 1999), kde odpovídá 0 – bez napadení, 1 – nádor na postranních kořenech, 2 – nádor na postranním a hlavním kořeni, 3 – velký nádor, hlavní kořen deformován. Pomocí této stupnice byl vypočítán

index napadení (ID - Index of Disease) a to pomocí vzorce: $ID (\%) = \frac{\sum (nx_0 + nx_1 + nx_2 + nx_3)}{N \times 3} \times 100\%$, kde **n** je počet rostlin v jednotlivých stupních stupnice napadení a **N** je celkový počet rostlin (Strelkov et al., 2006).

V roce **2013** nejlepších výsledků (Tab. 3) ve skleníkovém pokusu dosáhla odrůda Mentor, která dosáhla celkového nejnižšího průměrného ID ve všech vzorcích – 4 % a v 6 půdních vzorcích nevykazovala napadení. Odrůda SY Alister měla druhý nejnižší průměr ID – 5 %, bez napadení bylo dokonce 9 vzorků. Následují odrůdy Mendel s průměrným ID 8 %, PT235 – 10 %, Mendelson – 11 % a poslední odrůda CWH 241 s průměrným ID 32 %. U této odrůdy byly při vyhodnocování zaznamenány jak zcela napadené kořeny, tak kořeny zcela zdravé, což vede k otázce o procesu šlechtění a možnému vyštěpení rezistentní a nerezistentní nehybridní jedinci (heterozygoti). Nejnižší celkový průměrný index napadení měl vzorek z lokality 11 – Velké Bílovice na jižní Moravě, což zřejmě značí nízký infekční tlak patogena a menší množství spor v půdě či méně infekčním spektrem patotypů. Na rozdíl od toho lokalita 9 - Horusice v jižních Čechách vykazovala vysokou míru infekce téměř u všech odrůd, což může být dáno buď vyšším množstvím spor v půdě (infekčním tlakem) nebo kombinací infekčnějších patotypů než u ostatních lokalit. Na jednom poli se často vyskytuje více patotypů a jejich složení hraje významnou roli při infekci rezistentních odrůd (Obr. 17).

Tabulka 3 Skleníkový pokus - ID (%) jednotlivé odrůdy na daných lokalitách, rok 2013

Pat. – patotyp podle Williamse (1966)

2013 Lokalita	Pat.	K	Mendelson	Mendel	CWH241	Mentor	SY Alister	PT235	Ø
1. Modlibohov	7	58	10	6	5	4	0	0	12
2. Holany	7	83	12	0	33	0	0	3	19
3. Bílý Kostel/N.	2	100	3	11	7	3	17	4	21
4. Horka u Bakova	7	75	19	14	18	0	0	0	18
5. Třebnouševs	7	100	3	14	71	0	13	13	31
6. Miletín	2	100	23	0	41	9	19	17	30
7. Kbelnice	6	97	0	2	21	2	0	10	19
8. Žirovnice	3	95	27	13	42	6	0	9	27
9. Horusice	5	94	21	24	80	10	4	12	35
10. Hrdějovice Ves	6	97	6	1	41	0	0	12	22
11. Velké Bílovice	x	9	2	1	5	0	0	0	2
12. Pohledy	9	69	0	0	13	10	10	0	15
13. Klokočov	7	91	20	12	33	6	0	32	28
15. Kozmice	7	77	5	8	40	0	0	24	22
Ø	7	82	11	8	32	4	5	10	

V roce **2014** se výsledky více méně opakují (Tab. 4). Odrůdy SY Alister a Mentor dosáhly shodného výsledku – 1 % průměrné ID přes všechny vzorky. Následuje odrůda PT235 s ID – 2 %, odrůda Mendel – ID 3 % a odrůda Mendelson – ID 4 %. Odrůda CWH 214 opět dosáhla nejvyššího ID - 28 %. Lokalita 4 – Horka u Bakova vykazovala 0 % ID u všech testovaných odrůd, kontroly byly velmi mírně napadeny (8 resp. 4 % ID). Vzorek z lokality 6 – Miletín naopak dosáhl nejvyššího průměrného ID přes testované odrůdy – 31 %. Celkově bylo napadení odrůd v jednotlivých vzorcích nižší, což by se dalo interpretovat zřejmě meziročním poklesem inokula v jednotlivých vzorcích. Dalším z možných vysvětlení je, že v roce 2012 byly vzorky zeminy odebírány po ozimé řepce náchylné k *Plasmodiophora brassicae*, tudíž bylo množství inokula v půdě vyšší než při odběrech v roce 2013, kdy byla na polích jiná plodina, která není náchylná k nádorovitosti. Odrůda CWH 241 opět dosahovala vysoké míry infekce (Tab. 4).

Tabulka 4 Skleníkový pokus 2014 - ID (%) pro jednotlivé odrůdy testované ve vzorcích zeminy z daných lokalit. Průměrné ID přes jednotlivá pole a jednotlivé odrůdy.

Lokalita	Pat	Kon. řepka	Kon. zelí	Mendelson	Mendel	CWH2 41	Mentor	SY Alister	PT235	Ø
2. Holany	7	100	88	0	0	36	0	0	11	29
3. Bílý Kostel	2	95	100	6	0	33	5	0	0	30
4. Horka u B.	7	8	4	0	0	0	0	0	0	1
5. Třebnouševy	7	94	78	11	9	27	4	0	0	28
6. Miletín	2	89	100	6	6	43	0	0	0	31
7. Kbelnice	6	90	91	7	0	11	0	3	2	26
9. Horusice	5	98	81	0	0	14	0	0	0	24
12. Pohledy	9	97	100	0	6	30	0	0	3	30
13. Klokočov	7	32	33	0	3	44	0	0	0	14
14. Kozmice	7	95	92	4	5	30	0	0	0	28
15. Hrádek n. N.	6	100	92	6	3	33	0	3	4	30
Ø		82	78	4	3	28	1	1	2	

V roce **2015** byly testovány vzorky zeminy z lokalit dodaných samotnými farmáři (Tab. 5). První dva vzorky pocházely z Plzeňského kraje. Vzorek z Města Touškov vykazoval vysoký index napadení na rezistentních odrůdách Mentor (54 %) a Andromeda (56 %) která nebyla v předchozích letech testována. To by mohl být signál pro specifické složení patotypů (ras) patogena pocházející z této lokality, protože odrůda Mentor vykazovala na ostatních testovaných lokalitách vždy spolehlivou rezistentní odpověď. Kontrola, která je vždy silně napadena, vykazuje u druhého vzorku nižší ID než některé rezistentní odrůdy. Třetí vzorek testovaný v roce 2015 pocházel z Vysočiny a výsledky se podobaly těm, získaným v předchozích letech testování. Vzorek z Velkých Bílovic vykazoval přijatelnou míru infekce na rozdíl od předchozích let, kdy musel být z testování vyřazen, protože infekce nebyla dostatečná ani na kontrolní náchylné odrůdě. Poměrně vysokých ID na rozdíl od předchozího roku dosáhly odrůdy Mendelson, Mendel a PT 235. Odrůda CWH 241 dosáhla dokonce

rekordního ID 100 % resp. 90 % na lokalitě Fulnek a Pěčín. Rezistence této odrůdy je diskutabilní a zřejmě se jedná o vyštěpení nehybridních jedinců (heterozygotů) nebo jinou chybu ve šlechtitelském procesu. Tato odrůda byla po prvním roce polních pokusů stáhnuta z pokusů na žádost distributora.

Tabulka 5 Skleníkový pokus 2015, ID % pro jednotlivé vzorky zeminy a odrůdy. Průměrné ID % pro jednotlivé vzorky a jednotlivé odrůdy.

Lokalita	K	Mendelson	Mendel	CWH 241	Mentor	SY Alister	PT 235	Andromeda	Ø
16. Kůstí	32	3	1	58	17	3	6	17	17
17. Město Touškov	42	20	19	63	54	8	26	56	36
18. Rantířov	97	12	17	54	3	6	7	X	25
19. Velké Bílovice	66	9	0	50	6	0	2	X	19
20. Svijanský Újezd	76	16	4	70	7	7	16	X	28
21. Pěnčín	86	12	24	90	9	0	17	X	34
22. Fulnek	100	33	46	100	51	23	83	X	62
Ø	71	15	16	69	21	7	22	36	

Poloprovozní polní pokusy

Ve spolupráci Katedry ochrany rostlin ČZU, SPZO a Agro Chomutice (hospodářství Hrádek nad Nisou) proběhly v sezónách 2013/2014 a 2014/2015 poloprovozní pokusy s odrůdami ozimé řepky rezistentními k *Plasmodiophora brassicae*. Pokusy probíhaly na pozemcích zamořených nádorovitostí.

Použité odrůdy

Do pokusu v sezóně 2013/2014 byly zařazeny odrůdy SY Alister (spol. Syngenta), Andromeda (Limagrain), CWH 241 (Monsanto), Mendel, Mendelson, Mentor (Rapool) a PT235 (Pioneer). V sezóně 2014/2015 byly přidány odrůdy DK Platinum a PT 242, nebyla použita odrůda CWH 241. Jako kontrola infekce byla vždy použita náchylná odrůda řepky. Parcely s kontrolní odrůdou byly rovnoměrně rozmístěny v rámci celého zkušebního pozemku.

Parcely byly pravidelně kontrolovány v průběhu podzimu jednou za dva týdny, v zimě pak proběhla jedna kontrola. Poslední kontrola proběhla na jaře před začátkem vegetace. Během kontrol byly náhodným výběrem metodou jednoho řádku odebírány kořeny, vždy 30 rostlin na odrůdu a parcelu.

Hodnocení pokusů

U odebraných kořenů byla stanovována míra poškození na základě stupnice poškození (Kuginuki et al. 1999), kde odpovídá 0 – bez napadení, 1 – nádor na postranních kořenech, 2 – nádor na postranním a hlavním kořeni, 3 – velký nádor, hlavní kořen deformován. Pomocí této stupnice byl vypočítán index napadení (ID - Index of Disease) a to pomocí vzorce:

$$ID(\%) = \frac{\sum(nx_0 + nx_1 + nx_2 + nx_3)}{Nx3} \times 100\%$$
 kde **n** je počet rostlin v jednotlivých třídách stupnice a **N** je celkový počet rostlin (Strelkov et al., 2006).

Pro zjištění počtu přezimujících rostlin byly na podzim na každé parcele vytyčeny tři plochy o rozloze 1m², kde byl odečten počet rostlin. Další odečet byl prováděn brzy z jara a byla vypočtena průměrná mortalita rostlin na parcele.

V průběhu podzimu byly dvakrát na hodnocených rostlinách změřeny kořenové krčky, výsledky pro jednotlivé odrůdy byly zprůměrovány.

Pokusy byly sklizeny 29. 7. 2014 a 3. 8. 2015. Byla změřena přesná plocha parcel a vypočítán průměrný výnos na t/ha.

Pozorování během vegetace

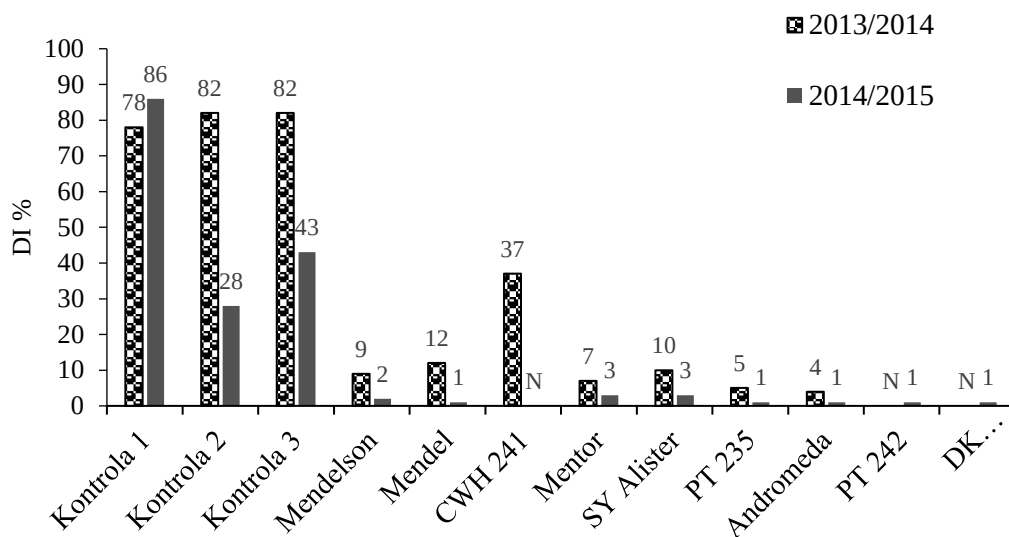
V sezoně 2013/2014 všechny tři náchylné kontroly vykazují vysoké napadení kořenů (K1 – 78, K2 – 82 a K3 – 83%) (Tab.6, Graf.1), což dokládá rovnoměrné zamoření celého pozemku. Rozdíly v míře napadení rezistentních odrůd se pohybují jen v jednotkách procent a všechny odrůdy vykazují vysokou míru rezistence na daném pozemku. Žádná odrůda nedosáhla 0 % poškození, což se u odrůd rezistentních k *Plasmodiophora brassicae* nedá ani předpokládat, vzhledem k podstatě rezistence. Odrůdy Andromeda a PT235 dosáhly nejnižšího indexu napadení 4 % rep. 5 %, následovala odrůda Mentor - 7 %, odrůda Mendelson – 9 %, odrůda SY Alister – 10 % a odrůda Mendel – 12 %. Slabší výsledek odrůdy Mendel je zřejmě způsoben tím, že se jedná o nejstarší rezistentní odrůdu, která byla vyšlechtěna už v roce 2000, proto je možné, že se u ní projevuje prolomení rezistence. Jako poslední se v pokusech umístila odrůda CWH 241, která dosáhla 37 % indexu napadení.

V sezoně 2014/2015 vykazovaly všechny rezistentní odrůdy po celý průběh pokusu podobný stupeň napadení (Graf. 1). Žádná z odrůd nepřesáhla kritickou hodnotu 25%, která je považována za hranici mezi rezistentní a nerezistentní odrůdou. Míra napadení kontrolních, náchylných odrůd byla nejvyšší na parcele s Kontrolou 1 (celkově 86%). Míru napadení tedy lze dávat do souvislosti nejen s množstvím spor v půdě, ale i s její kvalitou. Okraj pole s parcelami, na které jsou Kontrola 3 je pravděpodobně více zhutněn díky přejezdům zemědělské techniky, prostupnost vody je zde horší a ovlhčení je vyšší, což je jeden z důležitých parametrů pro rozvoj nádorovitosti. (Obr. 18, 19).

Tloušťka kořenových krčků (měřená jen ve druhé sezoně) rezistentních odrůd se pohybovala v průměrném či nadprůměrném rozmezí. Nejnižších hodnot dosahovala odrůda SY Alister (11 a 12 mm), nejvyšších odrůda Mendelson (13,0 a 13,6 mm). Tloušťka krčků Kontroly 1 byla nejmenší ze všech odrůd u obou měření – 7,7 a 6,6 mm. Průměrná tloušťka krčků rezistentních odrůd byla 12,0 mm a průměr kontrol byl 10,0 mm.

Graf 1 – Index napadení rezistentních odrůd a kontrol v sezónách 2013/2014 a 2014/2015.

N - odrůda nebyla zařazena do pokusu.



Tabulka 6 Výsledky kontrol napadení v sezóně 2013/2014 (DI %)

Odrůda	Datum kontroly					Průměr
	15. X. 2013	1. XI. 2013	15. XI. 2013	17. XII. 2013	3. IV. 2014	
SY Alister	11	11	18	2	3	9
CWH 241	46	41	56	45	12	40
K1	72	77	89	86	68	78
Andromeda	7	6	2	4	6	5
Mentor	11	7	13	2	7	8
K2	61	78	93	95	73	80
Mendelson	4	12	7	6	4	7
Mendel	9	6	9	37	10	14
PT235	3	8	9	0	6	5
K3	78	85	64	100	86	83
Průměr	30	33	36	38	27	

Německé úřady pro registraci odrůd uznávají jako odrůdy rezistentní k *Plasmodiophora brassicae* ty, které dosáhly maximálně 25% indexu napadení. Podle toho kritéria mohou být všechny zkoušené odrůdy považovány za rezistentní mimo již vyřazené CWH 241.

Průměrná mortalita rostlin (Tab. 7) na jednotlivých parcelách odpovídá míře napadení kořenů. U kontrolních parcel K1-K3 byla průměrná mortalita 6,3 respektive 7 rostlin na parcelu. U odrůdy CWH 241 uhynuly přes zimu 2 rostliny, u odrůdy Mendelson 1 rostlina a u odrůdy Mendel 2 rostliny. U ostatních odrůd byla zaznamenána nulová mortalita rostlin.

Tabulka 7 Mortalita rostlin během zimy 2013 -2014 na ploše 1 m²

	SY Alister	K1	CWH 241	Mentor	Andromeda	K2	Mendel- son	Mendel	PT235	K3
N rostlin podzim	43	37	43	38	48	32	32	38	43	37
N rostlin jaro	42	31	41	38	48	29	31	37	43	30
mortalita	0	6	2	0	0	3	1	2	0	7

Počet přezimujících rostlin v sezóně 2014/2015 byl u jednotlivých odrůd různý, v závislosti na jejich výsevu. Nejvyšší počet rostlin na 1m² byl na podzim u odrůdy PT 242 (46 rostlin), nejnižší počet rostlin byl u Kontroly 3 (23 rostlin). Největšího vyzimování rostlin došlo u odrůdy PT 242 (16 rostlin) a u Kontroly 2 (také 16 rostl.), nejmenší úbytek byl u odrůdy SY Alister (2 rostliny).

Výnos

V sezóně 2013/2014 se výnosově nejlépe umístila odrůda SY Alister, která dosáhla výnosu 6,78 t/ha, následovala odrůda Andromeda s 5,97 t/ha, dále pak odrůda Mentor, PT235 (4,96 t/ha), CWH 241 (4,55 t/ha), Mendel (3,94 t/ha) a Mendelson (3,79 t/ha) (Tab 8). Průměrný výnos rezistentních odrůd byl 5,03%. Průměrný výnos kontrolních odrůd byl 3,79 t/ha. Celkový průměrný výnos pokusu byl 4,34 t/ha. Odrůdy Mendel a Mendelson dosáhly slabších výsledků v porovnání s ostatními rezistentními odrůdami, podobných výsledků dosáhly i v německých registračních pokusech, kde se pohybovaly vždy cca 10% pod průměrným výnosem dalších zkoušených odrůd.

V sezóně 2014/2015 by nejvyšší výnos rezistentních odrůd byl u odrůdy PT 242 (5,03 t/ha), následovala odrůda Mentor (4,97 t/ha) a odrůda DK Platinum (4,83 t/ha), výkony dalších odrůd jsou vyrovnané. Nejnižší výnos byl zaznamenán u odrůdy SY Alister (4,27 t/ha) (Tab. 8.). Průměrný výnos rezistentních odrůd byl 4,6 t/ha. Průměrný výnos kontrolních odrůd byl 4,12 t/ha. Nejnižšího výnosu dosáhla Kontrola 1 (3,51 t/ha) a nejvyššího Kontrola 3 (4,44 t/ha). Celkový průměrný výnos pokusu byl 4,44 t/ha.

Vyšší výnos v první sezóně pokusů je pravděpodobně způsoben efektem menších parcel, na kterých by pokus založen a také pro řepku příznivějším průběhem vegetační sezóny, která byl v České republice rekordní.

Pokles výnosu napadených odrůd na parcele s Kontrolou není sice v pokusných letech o tolik nižší, jak by se mohlo očekávat, podle rozdílu ve stupni napadení kořenů nádory mezi náchylnými a rezistentními odrůdami. Je třeba si však uvědomit, že v obou pokusných letech byly na pokusné lokalitě extrémně mírné zimy, kdy půda vůbec nepromrzla. Tím nemohly být k mrazu vysoce citlivé nádory poškozené a řepka přežila zimu. Při normálním průběhu zimního

počasí většina napadených rostlin odumírá v důsledku zmrznutí a následnému rozpadu kořenového systému. Škody jsou potom podstatně vyšší a mohou se blížit 100 % - zaorání porostu na jaře.

Rovněž v obou pokusných ročnících nebylo po celou dobu jarní vegetace na pokusném pozemku výrazné sucho, kterému by rostliny na Kontrolách s malým, nádorovitostí poškozeným, kořenovým systémem nemohly účinně vzdorovat.

Tabulka 8– Výnos a sklizňová plocha pokusů v obou sezónách.

*Výpočet výnosu při 8% vlhkosti

Odrůda	2013/ 2014		2014/2015	
	t/ha*	Sklizňová plocha	t/ha*	Sklizňová plocha
SY Alister	6,10	550	4,27	1169
Mentor	4,77	545	4,97	1086
K1	3,52	497	3,51	1161
Mendelson	3,44	548	4,37	1146
Mendel	3,56	697	4,34	1130
K2	4,35	559	4,42	1110
PT 242	x	x	5,03	1090
PT 235	4,53	766	4,37	1070
DK Platinium	x	x	4,83	1051
Andormeda	5,46	549	4,65	1039
CWH 241	4,18	558	x	x
K3	3,50	750	4,44	1027

Pokusy v sezoně 2015 – 2016

V sezoně 2015/2016 byl založen pokus ve Valdicích u Jičína. Velikost pozemku 8,5 ha umožnila založit polní poloprovozní pokus se třemi opakováními. Do pokusu byly zařazeny odrůdy rezistentní k *Plasmodiophora brassicae*: SY Alister (spol. Syngenta), Andromeda (Limagrain), DK Platinium, CWH 319 (Monsanto), Mentor, NPZ (Rapool) a PT 242 (Pioneer). Jako kontrola infekce použita náchylná hybridní odrůda řepky.

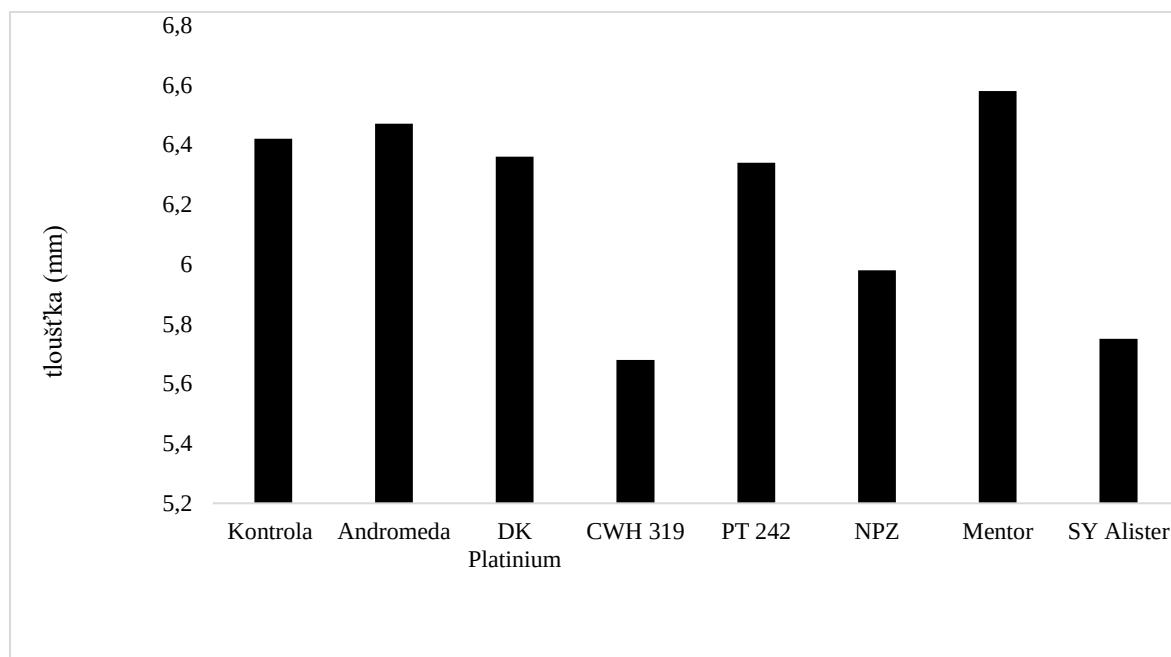
Pokus byl zaset za velkého sucha, po 10 dnech přišly výrazné srážky. Rostliny velmi dobře vzcházely, ovšem vlivem dalšího velmi dlouhého suchého období nedošlo k plošné infekci kořenů patogenem *Plasmodiophora brassicae*.

Projevy nádorovitosti byly tedy slabé a neovlivnily vývoj rostlin, přezimování a výnosy.

Uváděné výsledky však poskytují cenné údaje o vlastnostech zkoušených odrůd, protože tyto odrůdy dosud nebyly zařazeny do žádných odrůdových pokusů v České republice.

Ideální hodnota tloušťky kořenového krčku je okolo 10 mm. Vzhledem k podzimnímu suchu byla ovšem celkově malá. Rozdíl mezi odrůdami nebyly velké. Nejnižších hodnot dosahovala odrůda SY Alister (5,75 mm), nejvyšších odrůda Andromeda a Mentor (6,47 a 6,58 mm) (Graf 2).

Graf 2 Tloušťka kořenových krčků v sezoně 2015-2016



Rostliny byly na podzim vlivem sucha poměrně slabé a přezimování bylo relativně nízké (Tab.9).

Tabulka 9 Přezimující rostliny v sezoně 2015 - 2016

	Rostlin/m ² podzim:	Rostlin/m ² jaro	Mortalita	Přezimování (%)
Kontrola	69,8	40,5	29,3	58,0
Andromeda	69,8	45,7	24,1	65,4
DK Platinum	69,1	46,0	23,1	66,6
CWH319	73,6	45,0	28,6	61,2
PT 242	66,2	42,7	23,6	64,4
NPZ	68,0	45,7	22,3	67,2
Mentor	61,1	41,7	19,4	68,2
SY Alister	67,8	40,0	27,8	59,0

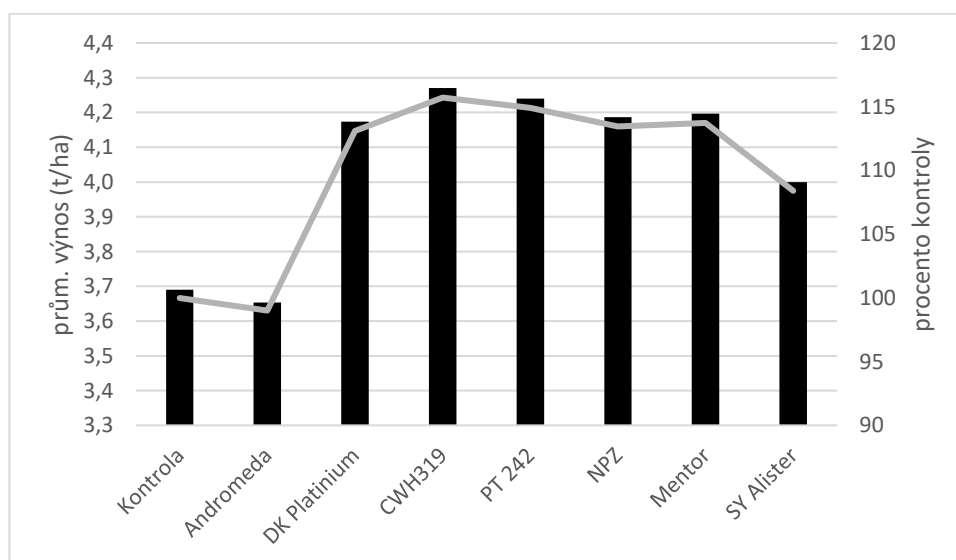
Sklizňová plocha jednotlivých parcel se pohybovala mezi 1132 m² až 1190 m². Rozdíly mezi velikostmi parcel jsou tedy minimální. Výsledky vyjadřují odpovídajícím způsobem výnosový potenciál jednotlivých odrůd. Velký rozdíl proti kontrole byl způsoben, že jako náchylná kontrola byla použita již starší, ale stále obchodovaná hybridní odrůda. Nejnížší výnos

přinesla odrůda Andromeda s průměrnými 3,65 t/ha (99 % na kontrolu) a nejvyšší odrůda CWH 319 se 4,27 t/ha (116% na kontrolu). Všechny další odrůdy poskytly 4 až 4,24 t/ha, tedy 108 – 115% na kontrolní odrůdu (Tab. 10, Graf. 3)

Tabulka 10 Výnos rezistentních odrůd a kontroly. Počítáno při 8 % vlhkosti

Odrůda	Průměrný výnos t/ha (3 opakování)	Procento kontroly	Max. (t/ha)	Min. (t/ha)	Rozdíl (% mezi opakováním)
Kontrola	3,69	100,0	3,78	3,56	6,18
Andromeda	3,65	99,0	3,85	3,49	10,32
DK Platinum	4,17	113,1	4,22	4,14	1,93
CWH 319	4,27	115,7	4,30	4,22	1,90
PT 242	4,24	114,9	4,31	4,14	4,11
NPZ	4,19	113,5	4,26	4,11	3,65
Mentor	4,20	113,7	4,26	4,11	3,65
SY Alister	4,00	108,4	4,10	3,80	7,89

Graf 3 Průměrný výnos rezistentních odrůd a procento kontroly dosažené jednotlivými odrůdami sezona 2015 - 2016



Všechny zkoušené rezistentní odrůdy ozimé řepky, které jsou dostupné na trhu, prokazují ve všech oblastech České republiky vysokou míru rezistence a jsou vhodné k pěstování na zamořených pozemcích zmíněným patogenem.

Fyzikální metody ochrany

Propařování zeminy se v praxi provádí zejména v zelinářské produkci. Metoda je náročná jak časově, tak finančně a její využití v ochraně proti *Plasmodiophora brassicae* je omezené, protože často dochází k rekontaminaci. Nedochází totiž k usmrcení veškerých spor, protože pokusy Howarda et al. (2010) prokázaly, že spory si zachovávají vitalitu i po projití autoklávem (vysoký tlak, teplota 120° C, 20 min.) Půdní solarizace je metoda objevená v Izraeli a používaná v oblastech s velkou intenzitou slunečního záření, protože je založená na jeho využití. Během procesu solarizace je půda zakryta po dobu 3-4 týdnů transparentní folií, pod kterou dochází ke zvýšení teploty. Účinným prvkem je nejen vzniklá vysoká teplota, ale také další fyzikálně-chemické změny a následné biologické procesy, díky nimž dochází k redukci patogena v půdě (Chytilová a Dušek, 2007).

Moření osiva

Spory ulpělé na osivu mohou být jedním z mechanismů transportu *Plasmodiophora brassicae* na dlouhé vzdálenosti. Potvrzují to i další studie, které prokázaly přítomnost spor na osivu řepky, jarní pšenice a hlízách brambor. Skleníkové i polní pokusy s fungicidním mořením osiva řepky probíhaly opět v západní Kanadě (Hwang et al., 2011c). Testovány byly fungicidy Dynasty100FS (azoxystrobin), Helix Xtra (thiamethoxam, difenconazole, metalaxyl, fludioxonil), Prosper FX (clothianidin, carbathiin, trifloxystrobin, metalaxyl), Vitavax RS (carbathiin a thiram) a Nebiji (flusulfamide), které ve skleníkových podmínkách redukovaly infekci semenáčků, v polních podmínkách ale neměly žádný účinek (Hwang et al., 2011c). Neúčinnost byla zřejmě způsobena nedostatečným množstvím přípravku, který nedokázal eliminovat vliv velkého množství spor v okolí semenáčků. Naproti tomu pokusy Roda a Havla (1992) prokázaly, že fungicidní moření může oddálit infekci *Plasmodiophora brassicae* a tím snížit míru napadení rostlin a projev symptomů. Ovšem na velmi zamořených lokalitách moření nemělo dostatečný účinek, aby zabránilo silným projevům infekce. Čištění osiva a zabránění jeho kontaminaci spory obsaženými v prachu by měla být jedna z hlavních posklizňových praktik při sklizni na zamořených polích.

Chemická ochrana

Chemické přípravky pro likvidaci patogena v půdě se dají rozdělit na půdní fumiganty a půdní fungicidy. Jejich aplikace je v polním měřítku technicky a ekonomicky náročnější.

Nejčastěji používaným půdním fumigantem je dithiocarbamat (metham sodium; sodium N-methyldithiocarbamate), který je obsažen například v přípravku Vapam (používaný v USA a v Kanadě). Metam sodium se při kontaktu s půdou mění na methyl isothiocyant - v plynné podobě, difunduje půdou a má jak fungicidní, tak nematocidní účinky (Smelt et Leistra, 1974). Fumigace se provádí zejména na vjezdech na pole nebo na nově zamořených oddělených plochách, aby se zabránilo dalšímu šíření (Howard et al., 2010; Hwang et al., 2014b). Aplikace Vapamu (42% metam sodium) v dávce 0,4-1,6 ml na 1 l půdy snížila 12 – 16 x primární a sekundární infekci a tvorbu nádorů na rostlinách řepky (Hwang et al., 2014b). Vedlejším účinkem aplikace bylo i zlepšení zdravotního stavu rostlin. Účinnost Vapamu ovlivňuje půdní vlhkost, která by se ideálně měla pohybovat nad 10 % půdní kapacity (Hwang et al., 2014b). Nevýhodou látky metam sodium je možnost lokálního znečištění ovzduší (Saeed et al., 2000). Proto se doporučuje používat všechna opatření pro minimalizaci evaporace do ovzduší (použití plachet na zakrytí pozemku apod.) (Hwang et al., 2014b).

V České republice je registrován k ochraně proti hád'átkům, patogenním houbám a plevelům půdní fumigant Basamid (účinná látka dazomet 97 %), který se aplikuje ve formě granulí (20-60 g/m²). Po aplikaci je doporučená zálivka a přikrytí fólií.

Půdní fungicidy

Použití půdních fungicidů je opět pracné a finančně náročné a také environmentálně nešetrné.

Peng et al. (2014) zkoušeli předset'ovou aplikaci syntetických fungicidů s účinnými látkami pentachloronitrobenzene (PCNB, přípravek Terraclor 75% ú. l.), fluazinam a cyazofamid (přípravek Ranman). Všechny přípravky vykazovaly účinnost proti *Plasmodiophora brassicae*. Zároveň ovšem studie podotýká, že v místech vysoké koncentrace spor nefungoval žádný přípravek. Vzhledem k vysokému množství reziduí těchto přípravků v půdě a jejich vlivu na lidské zdraví, stejně jako k ekonomické nákladnosti je použití těchto přípravků ve velkém měřítku (celá pole) jen těžko možné (Rod, 1996) uvádí ještě další látky používané k ochraně před *Plasmodiophora brassicae* (rtuťnaté fungicidy, benzimidazoly, dichlorfluanid a další), které jsou ovšem velmi toxické pro životní prostředí.

Testovány byly i přípravky s biofungicidní složkou (Serenade s *Bacillus subtilis* a Prestope s *Gliocladium catenulatum*), které mají antibiózní účinek a podporují imunitní odpověď napadené rostliny (Peng et al., 2014). Přípravky byly aplikovány zálivkou po setí a měly až 85 – 100% účinnost, ovšem pouze v půdách s nízkou koncentrací spor *Plasmodiophora brassicae* (Peng et al., 2014).

Určitá účinnost proti *Plasmodiophora brassicae* byla zjištěna i u herbicidů s účinnou látkou trifluralin (Treflan a Synfloran), který se v brukvovitých plodinách běžně používá (Rod, 1996).

Další možností na pomezí prevence a ochrany je vápnění zamořených polí, aby se zvýšilo pH půdy, a to buď normálním vápnem, nebo dusíkatým vápnem (viz kapitola Půdní reakce - pH).

PREVENTIVNÍ OPATŘENÍ K ZABRÁNĚNÍ ŠÍŘENÍ PATOGENA *PLASMODIOPHORA BRASSICAE* V PRAXI

Spory patogena *Plasmodiophora brassicae* způsobující na řepce nádorovitost kořenů brukvovitých se pravděpodobně v malém množství vyskytují na mnoha pozemcích v České republice, kde se pěstuje ozimá řepka nebo další brukvovité plodiny.

Přítomnost spor v půdě však neznamená automaticky vyvolání infekce na rostlinách. Pro infekci *Plasmodiophora brassicae* je třeba vhodných klimatických podmínek (vlhko, teplo) v době setí a počátku vegetace na podzim. Ne vždy ovšem (i při dodržení těchto podmínek) dojde k masové infekci a projevu symptomů. Nádorovitosti nahrává kromě klimatu i zhutnění půdy a špatná prostupnost vody půdním profilem, proto bývá infekce horší v zamokřených místech s utuženou půdou. Podpurným faktorem je i kyselé pH.

Pěstitel obvykle zjistí napadení kořenů náhodně během jarní vegetace v ohniscích na několika rostlinách řepky. Nejčastější výskyt je na utužených půdách na souvratích v místě, kde se dlouho drží voda. Velmi často to bývá v blízkosti vjezdu na pole, protože spory se zanesou na pozemek na znečištěné polní mechanizaci.

I při malém výskytu je nutné si uvědomit, že životnost spor v půdě je v našich podmínkách velmi dlouhá (uvádí se až 20 let, poločas rozpadu spor je 4,6 let) a proto je důležité zahájit preventivní opatření k zabránění zvyšování počtu spor v půdě.

Po zjištění výskytu je vhodné odebrat 100 g vzorku půdy z pole v půdním profilu do hloubky 15 cm. Vzorky se odebírají zejména z míst utužených a vlhkých. Při laboratorní determinaci spor patogena v půdě je zjištěna závažnost napadení pozemku a může se zvážit rozsah prováděných opatření.

Prvním jednoduchým opatřením je nechat vyklíčit výdrol řepky a do 12 dnů po vzejití ho zaorat. Klíčící rostlinky mohou při slabém výskytu spor v půdě významně snížit životaschopnost spor. Jestliže se však výdrol nechá růst delší dobu naopak přispívá k namnožení spor v půdě, proto je nutné k tomuto způsobu ošetření přistupovat velmi svědomitě!

Na pozemku by se nejméně čtyři roky neměla pěstovat žádná ozimá řepka ani jiné brukvovité plodiny.

Během čtyř let je důležité používat dalších podpurná opatření, jako je podrývání a prokypřování půdy, hubení brukvovitých plevelů, které mohou být zásobárnou infekce a zvýšení pH pravidelným vápněním a hnojením bórem.

Po čtyřech letech zařadit na pozemek rezistentní odrůdu ozimé řepky. Na území ČR se vyskytují různé patotypy *Plasmodiophora brassicae*, proto je důležité věnovat pozornost výběru rezistentních odrůd řepky. Deklarovaná rezistence těchto odrůd ze zahraničí by měla být v České republice ověřena, nejlépe přímo v regionu, kde se bude pěstovat. Všechny testované odrůdy uvedené v této metodice, lze doporučit pro pěstování na zamořených pozemcích v celé České republice.

Při pěstování rezistentních odrůd řepky na zamořených pozemcích je nutné dodržování osevního postupu – nesít rezistentní odrůdy častěji než jedenkrát za 3 roky, aby se snížilo nebezpečí prolomení rezistence.

Rovněž se nedoporučuje setí rezistentních odrůd na pozemky, kde nebyl prokázán symptomatically nebo laboratorně výskyt patogena, aby nebyly odrůdy vystavovány zbytečnému selekčnímu tlaku.

Každý pěstitel by měl zvážit opatření podle místních podmínek snižující přenos půdy obsahující spory z infekčního pozemku na další pozemky zemědělskou technikou, ale i třeba na obuvi.

V případě zjištění výskytu nádorů na kořenech v podzimním období není nutné porost ihned zaorávat. Stupeň poškození porostu a výnos bude záviset na mnoha faktorech v průběhu další vegetace, zejména průběhu teplot v zimě a množství vláhy v jarním období. V některých letech při určitém průběhu počasí i přes velkou deformaci kořenového systému je vývoj porostu relativně příznivý a ztráty na výnosech nejsou velké (Obr. 20, 21).

Podzimní zaorávka nesníží ani výskyt spor v půdě pro následující období. Vytvořené nádory sice po zaorávce odumřou, ale stejně se rozpadnou a zvýší tak množství spor v půdě. O zaorávce porostů je nutno rozhodnout až na jaře podle přezimování porostu (Obr. 22, 23, 24).

V zamořených oblastech doporučujeme věnovat pozornost distribuci kompostů, hnoje nebo kalů z cukrovarů či lihovarů. Často obsahují spory *Plasmodiophora brassicae* a výrobce není povinen jejich obsah sledovat. Takto zamořené substráty mohou zanést spory na pole plošně a vyvolat silnou infekci rostlin.

PŘÍLOHA – METODIKA PROVEDENÍ DETEKCE SPOR PATOGENA *PLASMODIOPHORA BRASSICAE* METODAMI PCR A qPCR

Izolace DNA

Vzorky zeminy byly odebírané z jednotlivých lokalit pečlivě promíchat, přesít na síť (oka 2 mm) a vysušit při pokojové teplotě a použít k izolaci DNA. Zeminu homogenizovat na jemnozem v třecí misce. I izolaci celkové DNA použít 500 mg resp. 250 mg zeminy, podle výtěžnosti kitu. Lze použít kity EUrex Soil® (EurX Ltd., Gdansk, Poland) nebo NucleoSpin® Soil (Macherey-Nagel Ltd., Germany). Při práci s kity vždy pracovat podle doporučení výrobce. Koncentraci a čistotu DNA stanovit spektroskopicky při absorbancích 260 a 280 nm pomocí přístroje NanoDrop™.

PCR analýza

Detekce patogena *Plasmodiophora brassicae* z půdních vzorků pomocí analýzy PCR při použití specifických primerů TC2F (5'-AAACAACGAGTCAGCTTGAATGCTAGTGTG-3') a TC2R (5'-CTTTAGTTGTGTTTCGGCTAGGATGGTTCG-3') (Cao et al., 2007). PCR reakci provádět v termocykléru (např. Biorad) v objemu 25 µl a složení master mixu - 18.05 µl dd (double distilled) vody, 0.2 µl (1U) DreamTaq™ DNA Polymerázy (Fermentas), 2 µl MgCl₂ (2 mM), 2.5 µl 10× DreamTaq™ Buffer (Fermentas), 0.5 µl forwardového a reverseho primeru (10 µM), 0.25 µl dNTPs (0.2 mM) a 1 µl celkové DNA získané z půdních vzorků. Pozitivní kontrola obsahuje všechny komponenty reakce a 10 ng DNA *Plasmodiophora brassicae*, negativní kontrola naopak obsahuje všechny komponenty reakce a 1 µl dd vody. Obě kontroly používat v každé provedené PCR reakci. Parametry PCR programu obsahují kroky denaturace DNA při 94 °C po dobu 2 min; 35 cyklů při 94 °C po dobu 45 s, annealing při 65 °C po dobu 45 s a prodlužovací krok při 72 °C po dobu 45 s, konečná extenza při 72 °C po dobu 7 min. Amplifikované produkty (10 µl reakční směsi na jamku) lze separovat pomocí 1 % agarózového gelu a obsahující ethidium bromid (0,5 µg/ml) a vizualizovat pomocí UV světla.

Kvantitativní PCR analýza (qPCR)

Kvantitativní PCR (qPCR) lze provádět s použitím vzorků DNA zředěné ddH₂O (1/10 v/v), aby se zabránilo inhibici reakce. Použít lze primery DC1F (5'-CCTAGCGCTGCATCCCATAT-3') a DC1R (5'-CGGCTAGGATTCGAAAA-3') (Rennie et al. 2011). Protokol pro qPCR pochází z publikace Rennie et al. (2011). Krátce – amplifikace lze provádět na přístroji Bio-Rad CFX Connect Real-Time PCR Detection System. Reakční směs o objemu 10 µl obsahuje 2.5 µl templatové DNA, 2.5 µl směsi primerů (3.2 mM DR1F and DR1R), a 5 µl SYBR Select Master mix (Life Technologies). Master mix obsahuje SYBR Green (Molecular Probes) jako detekční barvivo (fluorofor), které je fotolabilní, při práci je proto nutné postupovat rychle. Program reakce lze sestavit podle: 1 cyklus – 95 °C - 2 min (denaturační krok), následně 35 cyklů – 95 °C na 15 s a 1 cyklus – 60 °C na 60 s.

Standardní křivku pro kvantifikaci spor *Plasmodiophora brassicae* lze sestavit z DNA spor o známé koncentraci. Spory možno izolovat podle Castlebury et al. (1994) s modifikacemi podle Cao et al. (2007). Krátce – 100 g kořenů s nádory rozmixovat v 500 ml destilované vody a přefiltrovat přes 450 µm ocelové síto nebo 6 vrstev gázy. Trvalé spory oddělit pomocí centrifugace v sacharózovém roztoku (50%), spočítat v Bürkerově komůrce (úprava dle

Neubauera) a koncentraci upravit na 10^8 spor/ml. Z této suspenze centrifugací vytvořit peletu spor, ze které lze izolována DNA, kterou je možno sériově naředit a použít na tvorbu standardní křivky. Standardní křivka se připraví podle protokolu Rennie et al., (2011) a obsahuje 5 bodů, ředění provádět v intervalu 10^7 - 10^2 .

Ekonomické zhodnocení omezení pěstování řepky v důsledku zamoření půdy patogenem *Plasmodiophora brassicae* a náklady na jejich omezení

V České republice je zdokumentováno asi 100 zemědělských podniků, které se intenzivně zabývají pěstováním řepky a mají část svých pozemků zamořených patogenem *Plasmodiophora brassicae*. V České republice je průměrná výměra řepky v podniku, kde ji intenzivně pěstují okolo 350 ha. Celkem tedy 35 000 ha. Ze cca 400 000 ha řepky je tedy pěstováno na zamořených pozemcích každoročně cca 10 % řepky. Vzhledem k tomu, že se obvykle pěstuje řepka na stejném pozemku každý třetí rok je v současné době možno odhadnout, že potenciálně ohrožených pozemků výskytem patogena *Plasmodiophora brassicae* v různé intenzitě může být přes 100 000 ha zemědělské půdy. Tato rozloha je v blízké budoucnosti několika let reálná, protože prakticky neexistují cílená opatření zabráňující přenos spor zemědělskou technikou, zvěří, erozí či lidmi na nové pozemky.

Na uvedené ploše 35000 ha je možno v průměrném roce vypěstovat více než 105 000 t řepky a utržit za ní při letošních nižších cenách 1 miliardu Kč. Snížení produkce řepky v důsledku příznaků na kořenech je značně rozdílné a kolísá od 10 % až do 100 % při zaorání porostů. V průměru můžeme počítat se snížením výnosu o 40 % a finanční ztráty mohou dosáhnout okolo 400 milionů korun. Uvedenou situaci je možno řešit pěstováním jiných nehostitelských rostlin *Plasmodiophora brassicae* na uvedených pozemcích např. pšenice. V průměru let 2014 – 2016 byla průměrná výkupní cena pšenice v celé ČR 3900 Kč/t a výnos 6,5 t/ha. Na uvedené ploše by se tedy sklídilo zrna za cca 887 milionů korun. Náhrada řepky by byla nejen ekonomicky nevýhodná (- 120 milionů korun), ale zhoršila by se i úrodnost půdy vzhledem k dobré předplodinové hodnotě řepky a jejímu zlepšujícímu se vlivu na půdu.

Náklady na doporučené možnosti ochrany snižující škody a zabráňující šíření patogena na nové pozemky:

- 1) Vápnění půdy a zvyšování pH – cena na hektar suroviny a aplikace cca 2000 Kč/ha – celkem tedy na 35000 ha 70 milionů korun. Tuto částku lze rozpočítat i do dalších plodin.
- 2) Hubit výdrol řepky – jedno zpracování půdy navíc 700 Kč/ha – celkem tedy 24,5 milionu Kč.
- 3) Pěstovat doporučené rezistentní odrůdy řepky. Cena osiva asi o 500 Kč/VJ vyšší než u běžných hybridů – zvýšení nákladů na osivo 17,5 milionů korun.
- 4) Mechanické čištění strojů při přejezdu ze zamořených pozemků na pozemky nezamořené tlakovou vodou – velmi rozdílné náklady, nelze uvést paušální částku – odhadem 3 – 4 miliony.

Doporučená ochranná opatření celkem vyjdou na zamořených pozemcích v jednom roce na 115 milionů korun tj. na 28 % vypočítaných ztrát z výnosu řepky. Některá opatření navíc zvýší půdní úrodnost i pro další plodiny (vápnění) a sníží rychlost šíření patogena.

Odkazy na publikované vědecké práce

Zahraniční recenzované:

- Řičařová, V., Kazda, J., Sandhu, K. S., Ryšánek, P. 2016. Clubroot caused by *Plasmodiophora brassicae* Wor.: A Review of Emerging Serious Disease of Oilseed Rape in the Czech Republic. Plant Protection Science. 52 (2), 71-86.
- Řičařová, V., Kaczmarek, J., Strelkov, S., Kazda, J., Lueders, W., Ryšánek, P., Manolii, V., Jedryczka M. 2016. Pathotypes of *Plasmodiophora brassicae* causing damage to oilseed rape in the Czech Republic and Poland. European Journal of Plant Pathology. 559–572.
- Řičařová, V., Kazda, J., Baranyk, P., Ryšánek, P. 2016. Clubroot – an emerging disease faced by Czech oilseed rape growers. Scientia Agriculturae Bohemica, 3:105-112.
- Řičařová, V., Kazda, J., Baranyk, P., Ryšánek, P. 2016. Greenhouse and field experiments with winter oilseed rape cultivars resistant to *Plasmodiophora brassicae* Wor., Crop Protection, 92 ,60 - 6
- Kazda, J., Herda, G., Spitzer, T., Řičařová, V., Przybysz, A., Gawronska, H., 2014: Effect of nitrophenolates on pod damage caused by the brassicapod midge on the photosynthetic apparatus and yield of winter oilseed rape. Journal of Pest Science.
- Řičařová, V., Sandhu, K. S., Kazda J., Zouhar, M., Prokinová, E., Grimová, L., Ryšánek, P. 2013. Studies of Clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on oilseed rape in the Czech Republic. IOBC-WPRS Bulletin, 96, 2013

Česky psané recenzované:

- Řičařová, V., Kazda, J. 2015. Polní pokusy s odrůdami Field trials with oil seed rape cultivars resistant to *Plasmodiophora brassicae* (Wor.) - pathogen causing clubroot. Conference: International Conference on Prosperous Oil Crops. Location: Czech Republic Date: Dec 10-11, 2015. Prosperující Olejníky 2015. 77-81.
- Řičařová, V., Kazda, J., Baranyk, P. 2015. Skleníkové pokusy s odrůdami ozimé řepky deklarovanými jako rezistentní k nádorovitosti kořenů brukvovitých (*Plasmodiophora brassicae* Wor.). Rostlinolékař 26, 25-27
- Ryšánek, P., Mazáková, J., Řičařová, V., Singh, K. S., Zouhar, M. 2015. Molekulární metody detekce a identifikace vybraných patogenů řepky. Uplatněná certifikovaná metodika QJ1310227. Číslo osvědčení UKZUZ 01704/2016
- Ryšánek, P., Mazáková, J., Řičařová, V. 2015. Laboratorní diagnostika hlavních patogenů řepky. Rostlinolékař. 26 (6), 35 -37

Kazda, J., Prokinová, E., Grimová, L., Řičařová, V. 2013. Využití odrůd rezistentních k nádorovitosti kořenů brukvovitých (původce *Plasmodiophora brassicae*) při pěstování řepky na zamořených pozemcích. Rostlinolékař, 24 (1), 26-30.

PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- Ahmed, H. U., Hwang, S. F., Strelkov, S. E., Gossen, B. D., Peng, G., Howard, R. J., Turnbull, G. 2010. Assessment of bait crops to reduce inoculum of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) of canola. Canadian Journal of Plant Science. 91:545–551.
- Aist, J. R. 1977. *Plasmodiophora brassicae* – the organism and life cycle – what we think we know, what we know, and we need to find out. Proc. Woronin + 100 Conference, Madison, p. 11 – 15.
- Ayers, G. W. 1944. Studies on the life history of the club root organism, *Plasmodiophora brassicae*. Canadian. Journal of Research. 23: 143–149.
- Buczacki, S. T, Toxopeus, H., Mattusch, P., Johnston, T. D., Dixon, G. R., Hobolth, L. A. 1975. Study of physiologic specialization in *Plasmodiophora brassicae*: Proposals for attempted rationalization through an international approach. Trans Br Mycol Soc 65: 295–303.
- Buczacki, S. T. and Ockendon, J. G. 1979. Preliminary observations on variation insusceptibility to clubroot among collections of some wild crucifers. Annals of Applied Biology 92: 113–118.
- Cao T, Manolii VP, Hwang SF, Howard RJ, Strelkov SE. 2009. Virulence and spread of *Plasmodiophora brassicae* [clubroot] in Alberta, Canada. Canadian Journal of Plant Pathology. 31:321–329.
- Cao, T., Tewari, J. P. and Strelkov, S. E. 2007. Molecular detection of *Plasmodiophora brassicae*, causal agent of clubroot of crucifers, in plant and soil. Plant Disease. 91: 80–87.
- Clarkson, J. D. S., Brokenshire, T. 1984. Incidence of Clubroot in England, Wales and Scotland. British Crop Protection Conference – Pest and Diseases, p. 723 – 728.
- Colhoun, J. 1958. Clubroot disease of crucifers caused by *Plasmodiophora brassicae* Woron. A monograph. Phytopathological, Paper No 3. Commonwealth Mycological Institute, Surrey, UK.
- Crute, I. R., Gray, A. R., Crisp, P., Buczacki, S. T. 1980. Variation in *Plasmodiophora brassicae* and resistance to clubroot disease in Brassicas and allied crops – a critical review. Plant Breeding Abstract 50: 91–104.
- Daebler, F., Amelung, D., Pluschkell, H. J., Ledge, G. 1980. Auftreten und Bedeutung pilzlicher Krankheiten am Winterraps im Norden der DDR. Nachrichtenblatt für den Pflanzenschutz in der DDR 34, p. 17 – 20.
- Deora, A., Gossen, B. D., McDonald, M. R. 2013. Cytology of infection, development and expression of resistance to *Plasmodiophora brassicae* in canola. Annals of Applied Biology. ISSN 0003-4746.

- Diederichsen, E., Frauen, M., Linders, E. G. A., Hatakeyama, K., Hirari, M. 2009. Status and perspectives of clubroot resistance breeding in crucifer crops. *Journal of Plant Growth Regulation*. 28: 265–81.
- Diederichsen, E., Deppe, U., Sacristán, M. D. 2003. Characterization of clubroot resistance in recent winter oilseed rape material. In: *Proceedings of the 11th International Rapeseed Congress*, 2003 Jul 6; Copenhagen 68–70.
- Diederichsen, E., Frauen, M., Ludwig-Müller, J. 2014. Clubroot disease management challenges from a German perspective, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 36:sup1, 85-98, DOI: 10.1080/07060661.2013.861871
- Dixon, G. R. 2009a. The Occurrence and economic impact of *Plasmodiophora brassicae* and clubroot disease. *Journal of Plant Growth Regulation*. 28: 194–202.
- Dixon, G. R. 2009b. *Plasmodiophora brassicae* in its environment. *Journal of Plant Growth Regulation*. 28, 212–228.
- Faggian, R., Bulman, S. R., Lawrie, A. C., Porter, I. J. 1999. Specific polymerase chain reaction primers for the detection of *Plasmodiophora brassicae* in soil and water. *Phytopathology*. 89: 392–397.
- Fähling, M., Graf, H., Siemens, J. 2003. Pathotype separation of *Plasmodiophora brassicae* by the host plant. *Journal of Phytopathology*. 151(7–8): 425–430.
- Fredua-Agyeman, R., & Rahman, H. (2016). Mapping of the clubroot disease resistance in spring *Brassica napus* canola introgressed from European winter canola cv. 'Mendel'. *Euphytica*, 211(2), 201-213.
- Gossen, B. D., McDonald, M. R., Hwang, S. F., Kalpana, K. C. 2009. Manipulating seeding date to minimize clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) damage in canola and vegetable Brassicas. *Phytopathology*. 99:S45.
- Gossen, B. D., Adhikari, K. K. C., McDonald, M. R. 2012. Effects of temperature on infection and subsequent development of clubroot under controlled conditions. *Plant Pathology*, 61: 593–599.
- Hirai M. 2006. Genetic analysis of clubroot resistance in brassica crops. *Breed Science*. 56:223–229.
- Howard, R. J., Strelkov, S. E., Harding, M. W. 2010. Clubroot of cruciferous crops – new perspectives on an old disease. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 32: 43–57.

- Hwang, S. F., Ahmed, H. U., Strelkov, S. E., Gossen, B. D., Turnbull, G. D., Peng, G., Howard, R. J. 2011a. Seedling age and inoculum density affect clubroot severity and seed yield in canola. *Canadian Journal of Plant Science*. 91: 183–190.
- Hwang, S. F., Strelkov, S. E. 2014a Clubroot in the Canadian canola crop: 10 years into the outbreak. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 03; 36(sup1):27-36.
- Hwang, S. F., Howard, R. J., Strelkov, S. E., Gossen, B. D., Peng G. 2014b Management of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on canola (*Brassica napus*) in western Canada, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 36: sup1, 49-65.
- Hwang, S. F., Strelkov, S. E., Feng, J., Gossen, B. D., Howard, R. J. 2012. *Plasmodiophora brassicae*: a review of an emerging pathogen of the Canadian canola (*Brassica napus*) crop. *Molecular Plant Pathology* 13(2): 105–113.
- Hwang, S. F., Strelkov, S. E., Gossen, B. D., Turnbull, G. D., Ahmed, H. U., Manolii, V., Howard, R. J. 2011c. Soil treatments and amendments for amelioration of clubroot of canola. *Canadian Journal of Plant Science*. 91: 999–1010.
- Chee, H. Y., Kim, W. G., Cho, W. D., Jee, H. J. and Choi, Y. C. 1998. Detection of *Plasmodiophora brassicae* by using polymerase chain reaction. *Korea Journal of Plant Pathology*. 14: 589–593.
- Chytilová V., Dušek K. 2007. Metodika testování odolnosti brukvovitých plodin k nádorovitosti. Metodika pro praxi. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha.
- Ingram, D. S. and Tommerup, I. C. 1972. The life history of *Plasmodiophora brassicae* Woron. *Proceedings of the Royal Society. London, Ser. B*. 180: 103–112.
- Ito, S., Ichinose, H., Yanagi, C., Tanaka, S., Kameya-Iwaki, M. and Kishi, F. 1999. Identification of an in planta-induced mRNA of *Plasmodiophora brassicae*. *Journal of Phytopathology*. 147: 79–82.
- Jedryczka, M., Kasprzyk, I., Korbas, M., Jajor, E., Kaczmarek, J. 2014. Infestation of Polish agricultural soils by *Plasmodiophora brassicae* along the Polish- Ukrainian border. *Journal of Plant Protection Research*. 54 (3): 238 – 241
- Jones, D. R., Ingram, D. S., Dixon, G. R 1982b. Factors affecting tests for differential pathogenicity in populations of *Plasmodiophora brassicae*. *Plant Pathology*. 31: 229–238
- Karling, J. S. 1968. The *Plasmodiophorales*, 2nd edition. Hafner, New York Publishing Company.
- Kim, C. H., Cho, W. D., Kim, H. M. 2000. Distribution of *Plasmodiophora brassicae* causing clubroot disease of Chinese cabbage in soil. *Plant Dis Res* 6(1): 27–32.

- Kopecký P, Dušek K. 2012: Screening the *Brassicas* Czech national collection for sources of Clubroot resistance. *Acta Horticulturae*, 960, 147-150 DOI: 10.17660/ActaHortic.2012.960.20
- Kuginuki, Y., Yoshikawa, H., Hirai, M. 1999. Variation in virulence of *Plasmodiophora brassicae* in Japan tested with clubroot- resistant cultivars of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *European Journal of Plant Pathology*. 105: 327-332.
- LeBoldus, J. M., Manolii, V. P., Turkington, T. K., Strelkov, S. E. 2012. Adaptation to Brassica host genotypes by a single-spore isolate and population of *Plasmodiophora brassicae* (clubroot). *Plant Disease*. 96: 833-838.
- Lueders, W., Abel, S., Friedt, W., Kopahnke, D., & Ordon, F (2011). Auftreten von *Plasmodiophora brassicae* als Erreger der Kohlhernie im Winterrapsanbau in Europa sowie Identifizierung, Charakterisierung und molekulare Kartierung neuer Kohlhernieresistenzgene aus genetischen Ressourcen. *Julius-Kühn-Archiv*, 430: 40–43
- Parlevliet, J. E. 1985 Race and pathotype concepts in parasitic fungi. *OEPP Bulletin* 15:145–150.
- Peng, G., Lahlali, R., Hwang, S. f., Pageau, D., Hynes, R. K., McDonald, M. R., Gossen, B. D., Strelkov, S. E. 2014. Crop rotation, cultivar resistance, and fungicides/ biofungicides for managing clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on canola. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 36, S1: 99-112, <http://dx.doi.org/10.1080/07060661.2013.860398>
- Peng, G., Pageau, D., Strelkov, S. E., Lahlali, R., Hwang, S. F., Hynes, R. K. 2013. Assessment of crop rotation, cultivar resistance and *Bacillus subtilis* biofungicide for control of clubroot on canola. *Acta Horticulturae*. 1005:591–598.
- Rahman, H., Peng, G., Yu, F., Falk, K. C., Kulkarni, M., Selvaraj, G. 2014. Genetics and breeding for clubroot resistance in Canadian spring canola (*Brassica napus* L.). *Canadian Journal of Plant Pathology*. 36(S1):122–134.
- Rennie, D. C., Manolii, V. P., Cao, T., Hwang, S. F., Howard, R. J., Strelkov, S. E. 2011. Direct evidence of surface infestation of seeds and tubers by *Plasmodiophora brassicae* and quantification of spore load. *Plant Pathology*. 60: 811–819.
- Robak, J. 1991. Zmienność Patotypów *Plasmodiophora brassicae* Wor. Występujących w Polsce i ich Patogeniczność w stosunku do odmian i linii hodowlanych *Brassica oleraceae*. Instytut Warzywnictwa, Skierniewice. Praca habilitacyjna. 59 ss.
- Rod, J. 1994. The effect of some herbs on soil infestation with clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Wor.), *Ochrana rostlin* 30 (4): 261-265
- Rod, J. 1996. Zprávy - původce nádorovitosti brukvovitých plodin. Brno: ÚKZUZ, 37 květen, roč. 1996, zvláštní číslo, s. 45

- Rod, J., Havel, J. 1992. Assessment of Oilseed Rape Resistance to Clubroot (*Plasmodiophora brassicae*). Tests of Agrochemicals and Cultivars. 13: 106 – 107.
- Rod, J., Robak, J. 1994. The effect of some crops on inactivation of clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Wor.) in soil. Ochrana rostlin. 30. (4): 267 – 272
- Rouxel, F., Sanson, M. T., Renard, M., Soum, B. 1983. Observations et premiers resultats de travaux sur la hernie dans les cultures de colza oleagineux (*B. Napus L*) en France. Pathotypes de *Plasmodiophora brassicae* et sensibilite varietales. 6th International Rapeseed Conference, Paris, France, p. 975 – 985
- Saeed, I. A. M., Rouse, D. I., Harkin, J. M. 2000. Methyl isothiocyanate volatilization from fields treated with metam-sodium. Pest Manag Sci. 56:813–817.
- Somé, A., Manzanares, M.J., Laurens, F., Baron, F., Thomas, G., Ouxel, F.R. 1996. Variation for virulence of *Brassica napus* L., amongst *Plasmodiophora brassicae* collections from France and derived single-spore isolates, Plant Pathology. 45: p. 432-439.
- Strelkov, S. E, Manolii, V. P., Jurke, C., Rennie, D. C., Orchard, D., Hwang, S. F, Laflamme, P. 2012. The occurrence of clubroot on canola in Alberta in 2011. Canadian Plant Disease Survey. 92: 122.
- Strelkov, S. E., Hwang, S. F, Howard, R. J., Hartman, M. 2008. Final Report Project Number: 2004-21 Evaluation of clubroot control with rotation, fungicides and soil amendments (Characterization of the clubroot disease problem on canola)
- Strelkov, S. E., Manolii, V. P., Cao, T., Xue, S., Hwang S. F. 2007. Pathotype Classification of *Plasmodiophora brassicae* and its Occurrence in *Brassica napus* in Alberta, Canada J. Phytopathology. 155: 706–712.
- Strelkov, S.E., Tewari, J.P., Smith-Degenhardt, E. 2006. Characterization of *Plasmodiophora brassicae* populations from Alberta, Canada. Canadian Journal of Plant Pathology 28: 467-474
- Sundelin, T., Christensen, C. B., Larsen, J., Møller, K., Lübeck, M., Bødker, L. and Jensen, B. 2010. In planta quantification of *Plasmodiophora brassicae* using signature fatty acids and real time PCR. Plant Dis. 94: 432–438.
- Takahashi, K. and Yamaguchi, T. 1988. A method for assessing the pathogenic ability of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* by fluorescence microscopy. Annals of Phytopathological Society Japan. 54: 466–475.
- Takahashi, K., Yamaguchi, T. 1989. Assessment of pathogenicity of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* in soil by fluorescence microscopy. Annals of Phytopathological Society Japan 55: 621–628.
- Vaněk, V., Balík, J., Pavlíková, D., Tlustoš, P. 2007. Výživa polních a zahradních plodin. Praha: Profi Press, Praha. 167s. ISBN 978-80-86726-25-0.

- Voorrips, R. E. 1995. *Plasmodiophora brassicae*: aspects of pathogenesis and resistance in *Brassica oleracea*. Euphytica 83: 139– 146.
- Wakeham, A. J., White, J. G. 1996. Serological detection in soil of *Plasmodiophora brassicae* resting spores. Physiological and Molecular Plant Pathology. 48: 289–303.
- Wallenhammar, A. C. 1996. Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels. Plant Pathology. 45: 710–719.
- Wallenhammar, A. C., Almquist, C., Söderström, M., Jonsson, A. 2012. In-field distribution of *Plasmodiophora brassicae* measured using quantitative real-time PCR. Plant Pathology. 61: 16–28.
- Wallenhammar, A. C., Almquist, C., Schwelm, A., Roos, J., Marzec-Schmidt, K., Jonsson, A., Dixelius. C. 2014. Clubroot, a persistent threat to Swedish oilseed rape production. Canadian Journal of. Plant Pathology. 36. (S1): 135 – 141
- Wallenhammar, A. C., Arwidsson, O. 2001. Detection of *Plasmodiophora brassicae* by PCR in naturally infested soils. European Journal of Plant Pathology. 107: 313–321.
- Wellman, F. L. 1930. Clubroot of crucifers. U. S. Dept. Agric. Tech. Bull no 181
- Williams, P. H. 1966: A system for the determination of races of *Plasmodiophora brassicae* that infect cabbage and rutabaga. Phytopathology. 56: 624–626.
- Xue, S., Cao, T., Howard, R. J., Hwang, S. F., & Strelkov, S. E.(2008). Isolation and variation in virulence of single-sporeisolates of *Plasmodiophora brassicae*from Canada. PlantDisease, 92: 456–462.

POPIS OBRÁZKŮ NA OBÁLCE

Obr.3	Typické příznaky na kořenech
Obr.4	Silně poškozený porost patogenem <i>Plasmodiophora brassicae</i> na kořenech
Obr.5	Ukázka možné záměny s larvou krytonosce zelného
Obr.7	Stupnice poškození kořenů (od leva stupeň 0, 1, 2, 3)
Obr.8	Snímek spor v elektronovém mikroskopu
Obr.9	Cykler používaný při metodě qPCR
Obr.10	Čištění strojů v Kanadě při odjezdu ze zamořeného pozemku
Obr.11	Čištění strojů v Kanadě při odjezdu ze zamořeného pozemku
Obr.12	Jednorázové návleky na botách používané v Kanadě při vstupu na zamořené pozemky.
Obr.13	Kořen rezistentní odrůdy Mendelson při polních pokusech lokalita Hrádek
Obr.14	Kořen rezistentní odrůdy Mendel při polních pokusech lokalita Hrádek
Obr.15	Kořen náchylné odrůdy při polních pokusech lokalita Hrádek
Obr.17	Ukázka poškození kořenů při testech patotypů ve skleníku
Obr.18	Rozdíl v poškození porostu náchylné odrůdy (vpravo) a rezistentní odrůdy
Obr.19	Rozdíl v poškození porostu náchylné odrůdy (uprostřed) a rezistentní (vpravo)
Obr.20	Porost citlivé odrůdy s napadenými kořeny při příznivém průběhu počasí
Obr.21	Rostlina s deformovaným kořenovým systémem z porostu na obr.21
Obr.22	Ukázka porostu, který během zimy odumřel v důsledku napadení <i>Plasmodiophora brassicae</i>
Obr.23	Detailní pohled na rostliny z porostu na obr.22
Obr.24	Ukázka porostu, který během zimy odumřel v důsledku napadení <i>Plasmodiophora brassicae</i>