

Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.  
Česká zemědělská univerzita v Praze  
OSEVA PRO s. r. o., odštěpný závod Výzkumný ústav olejnin Opava  
OSEVA vývoj a výzkum s. r. o.



**Detekce genů avirulence v izolátech *Leptosphaeria maculans***

**Certifikovaná metodika**

**Kolektiv autorů**

**2021**

## **Autorský kolektiv:**

Doc. Ing. Lenka Burketová, CSc.

Ing. Barbora Jindřichová, Ph.D.

Ing. Romana Pospíchalová

Ing. Daniel Stehlík

Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.

MSc. Anuoluwapo Olufadekemi Fajemisin

Ing. Marie Maňasová, Ph.D.

Ing. Jana Mazáková, Ph.D.

Prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc.

Doc. Ing. Miloslav Zouhar, Ph.D.

Česká zemědělská univerzita v Praze

Ing. Eva Plachká, Ph.D.

Ing. Andrea Rychlá

Mgr. Viktor Vrbovský, Dis.

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

OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.

Adresa umístění elektronické publikace: <http://www.agronavigator.cz/>

## Obsah

<b>1. Cíl metodiky .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Vlastní popis metodiky .....</b>	<b>3</b>
2.1. Úvod do problematiky.....	3
2.2. Metodická část.....	6
2.2.1. Sběr listů řepky infikovaných patogeny <i>Leptosphaeria</i> spp.....	6
2.2.2. Izolace patogena(ů) rodu <i>Leptosphaeria</i> .....	7
2.2.3. Determinace patogenů <i>L. maculans</i> a <i>L. biglobosa</i> .....	9
2.2.4. Příprava inokula pro identifikaci ras <i>L. maculans</i> .....	9
2.2.5. Inokulační test .....	9
2.2.6. PCR detekce přítomnosti genů avirulence v <i>L. maculans</i> .....	12
2.2.7. Přílohy .....	16
2.2.8. Obrazová příloha.....	18
<b>3. Srovnání „novosti postupů“ .....</b>	<b>21</b>
<b>4. Popis uplatnění metodiky .....</b>	<b>21</b>
<b>5. Ekonomické aspekty .....</b>	<b>21</b>
<b>6. Seznam použité související literatury .....</b>	<b>22</b>
<b>7. Seznam publikací, které předcházely metodice .....</b>	<b>24</b>
<b>8. Jména oponentů a názvy jejich organizací.....</b>	<b>25</b>
<b>9. Dedikace.....</b>	<b>25</b>

## 1. Cíl metodiky

Hlavním cílem této metodiky je popis metody identifikace ras patogena *Leptosphaeria maculans* na základě detekce genů avirulence (*AvrLm*) pomocí diferenční sady genotypů řepky olejky se známými geny rezistence (*Rlm*).

## 2. Vlastní popis metodiky

### 2.1. Úvod do problematiky

V současnosti patří řepka olejka (*Brassica napus* L.) a zejména její ozimá forma mezi ekonomicky nejvýnosnější rostlinné komodity pěstované v ČR a v celkové rozloze osevní plochy se tak po pšenici řadí na druhé místo (15 %) mezi plodinami (ČSÚ, 2021). Trend zvyšujících se ploch osetých řepkou a zvyšující se produkce řepky v hlavních regionech pěstování (Evropa, Kanada, Čína, Indie, Austrálie) lze pozorovat od 80. let 20. století. Souvisí se zavedením nových výnosnějších klasických i hybridních odrůd, a také odrůd s minimálním obsahem kyseliny erukové a nízkým obsahem glukosinolátů a koresponduje recipročně s rozvojem trhu s touto plodinou. V 90. letech však dochází ke stagnaci růstu výnosů díky tomu, že vysoké zastoupení řepky v osevním postupu s sebou přináší problémy spojené se zdravotním stavem této rostliny (Zheng et al., 2020).

Mezi tři celosvětově nejvýznamnější choroby řepky patří fomové černání stonků řepky, které je způsobeno houbami z rodu *Leptosphaeria* (*L. maculans* (Fuckel) Ces. & De Not., 1863; *L. biglobosa* Shoemaker & H. Brun, 2001), které se vyznačují podobnou bionomií. Primárním příznakem typickým pro nekrotrofní fázi patogenů jsou na listech světle béžově zbarvené skvrny, dosahující průměru až přes 1 centimetr, na nichž se vytvářejí konidiomata – pyknidy, viditelné jako černé tečky. Tyto skvrny vznikají především na podzim (ale i na jaře) díky askosporám, které fungují jako primárním inokulum uvolňující se z pseudoperithecií přežívajících na posklizňových zbytcích řepky. V pyknidách se v rámci nepohlavního rozmnožování formují konidie – pyknospory, které představují sekundární inokulum patogenů zapříčiňující sekundární infekce. V biotrofní asymptomatické fázi, která trvá od podzimu do jara, prorůstá mycelium hub nepozorovaně řápkem do báze rostliny. Následuje opět fáze nekrotrofní, kdy v průběhu pozdního jara až do období sklizně dochází k nekrotizaci pletiv kořenového krčku, kořene, báze i vyšších pater stonku, což podle míry zasažení může vést buď k nouzovému dozrávání, nebo až k lámání stonku a poléhání rostlin. Průměrné roční ztráty na výnosu jsou odhadovány v závislosti na povětrnostních podmínkách daného státu, intenzitě choroby, zvolené odrůdě a ochranných opatřeních na 5–50 %. Integrovaná ochrana řepky olejky proti původcům choroby je založena na agrotechnických postupech (orba, osevní postup a zdravé mořené osivo), aplikaci fungicidů především na podzim a pěstování odolných odrůd.

Genetická podstata rezistence řepky byla doposud popsána pouze v souvislosti s napadením druhem *L. maculans*. Z hlediska mechanismu založení je lépe prostudována tzv. kvalitativní, rasově

specifická rezistence řízená jednotlivými majorgeny rezistence (*R*), které chrání především mladé rostliny řepky, u nichž zamezují infekci listů, respektive pak i následnou kolonizaci stonků patogeny přes řapíky listů. Tato rezistence je založena na principu specifického rozpoznání efektoru produkovaného patogenem, jenž je kódován genem avirulence *Avr*, odpovídajícím receptorem hostitele, který je kódován genem rezistence *R*. U rodu *Brassica* bylo zatím popsáno a zmapováno 18 *R* genů: *Rlm1–11*, *RlmS*, *LepR1–4*, *BLMR1–2*. Jim odpovídající geny avirulence u *L. maculans* se označují jako *AvrLm*, *AvrRlm*, *AvrLep*. Problematika těchto interakcí je však mnohem složitější, a ne vždy lze využít výše zmíněného konceptu. Např. jeden *Avr* gen patogena se může vyznačovat duální specifitou pro více *R* genů rostliny, což znamená, že produkt tohoto genu může být rozpoznán receptory více *R* genů. Existuje i možnost, kdy dva *Avr* geny interagují s jedním *R* genem. *Avr* gen se může také vyznačovat epistází k jinému *Avr* genu (Tab. 1).

Tab. 1: Přehled *R* genů doposud identifikovaných u *Brassica* spp. a korespondujících *Avr* genů u *Leptosphaeria maculans*.

<i>R</i> geny	<i>Avr</i> geny
<i>Rlm1</i>	<i>AvrLm1–L3<sup>d</sup></i>
<i>Rlm2</i>	<i>AvrLm2</i>
<i>Rlm3</i>	<i>AvrLm3</i>
<i>Rlm4</i>	<i>AvrLm4–7<sup>de</sup></i>
<i>Rlm5</i>	<i>AvrLm5–9<sup>d</sup></i>
<i>Rlm6</i>	<i>AvrLm6</i>
<i>Rlm7</i>	<i>AvrLm4–7<sup>de</sup></i>
<i>Rlm8</i>	<i>AvrLm8</i>
<i>Rlm9</i>	<i>AvrLm5–9<sup>d</sup></i>
<i>Rlm10</i>	<i>AvrLm10A/AvrLm10B<sup>i</sup></i>
<i>Rlm11</i>	<i>AvrLm11</i>
<i>Rlms</i>	<i>AvrLms</i>
<i>LepR1</i>	<i>AvrLepR1</i>
<i>LepR2</i>	<i>AvrLepR2</i>
<i>LepR3</i>	<i>AvrLm1–L3<sup>d</sup></i>
<i>LepR4</i>	<i>AvrLepR4</i>
<i>BLMR1</i>	?
<i>BLMR2</i>	?

<sup>d</sup> geny s duální specifitou

<sup>e</sup> gen *AvrLm7* je epistatický ke genu *AvrLm3* a genu *AvrLm9*

<sup>i</sup> interakce dvou sousedících genů

? prozatím neidentifikovány

I když je kvalitativní rezistence vysoce účinná a snadněji využitelná ve šlechtitelském procesu, její účinek může být překonán nově vyvíjejícími se virulentními rasami *L. maculans*, neboť v populacích patogena dochází ke změnám genetické variability díky genetickým mutacím a rekombinacím vznikajícím v průběhu pohlavní reprodukce patogena. Příčinou je selekční tlak na populace patogena, který je způsoben rozsáhlým a opakovaným pěstováním odrůdy s konkrétním *R* genem, jako tomu bylo např. ve Francii, kdy se v populaci patogena vyselektovala virulentní rasa, která překonala účinek genu *Rlm1* (Rouxel et al., 2003) nebo v Austrálii v případě genu *LepR3* (Li et al., 2003). Oproti tomu rasově nespecifická, kvantitativní rezistence je vzhledem ke svému polygennímu a QTL založení obtížněji překonávána patogenem, neboť je účinná vůči širokému spektru ras, což ji činí trvanlivější. Je ovšem obtížněji geneticky mapována a její ověření a vyhodnocení je také komplikovanější i díky jejímu ovlivnění podmínkami vnějšího prostředí. Jelikož se její účinek projevuje na stoncích, lze její efekt vyhodnotit až na dospělých rostlinách. Vyhodnocení kvalitativní rezistence je časově méně náročné, neboť testování lze provádět v laboratorních podmínkách na děložních listech diferenační sady genotypů řepky olejky, které jsou inokulovány izoláty *L. maculans*. Na základě inkompatibilní či kompatibilní interakce lze pak stanovit, které geny avirulence izolát patogena nese.

Z hlediska dosažení dlouhodobého až trvalého účinku *R* genů je vhodné, ale mnohem náročnější kombinovat v procesu šlechtění oba typy rezistence, neboť i účinek tzv. pyramidizace více *R* genů v jednom genotypu může být v závislosti na výskytu různých ras v populaci patogena *L. maculans* překonán.

Jak již bylo uvedeno výše, přestože majorgeny rezistence (*Rlm*) zajišťují rostlinám řepky velmi efektivní obranu, trvanlivost tohoto typu rezistence závisí na selekci virulentních ras patogena, které mohou jejich rozpoznání rostlinami eliminovat často nepatrnými změnami genomu prostřednictvím mutací. V zemích s vysokým rozsahem pěstitelských ploch řepky, jako je Francie, Německo, Austrálie, Kanada, se proto pravidelně provádí výzkum zaměřený na zastoupení ras *L. maculans* nesoucích geny avirulence (Cross et al., 2014; Kutcher et al., 2010; Rashid et al., 2021; Sprague et al., 2006; Stachowiak et al., 2006; Van de Wouw et al., 2018; Winter & Koopmann, 2016; Zou et al., 2018) a na základě jejich frekvence v populacích *L. maculans* jsou pěstitelům řepky dávána doporučení pěstovat takové odrůdy, které minimalizují riziko vzniku nových ras a překonání majorgenů rezistence v odrůdách řepky.

## 2.2. Metodická část

### 2.2.1. Sběr listů řepky infikovaných patogeny *Leptosphaeria* spp.

Sběr pletiv řepky olejky s příznaky napadení původci fomového černání stonků řepky a jejich zpracování a uchovávání provádíme tak, abychom minimalizovali riziko kontaminace vzorku jinými mikroorganismy před samotnou izolací patogena(ů).

Počet odebraných vzorků volíme podle velikosti plochy oseté řepkou, odrůdového zastoupení a incidence choroby v porostu. Z rostlin odebíráme celé listy s typickými béžovo šedými skvrnami, na nichž jsou zřetelné pyknidy (Obr. 1).



Obr. 1: List řepky olejky s příznaky napadení původci fomového černání stonků řepky (*Leptosphaeria* spp.).

Listy oddělíme od rostliny nůžkami nebo vylomením a poté je jednotlivě uložíme do připravených popsaných papírových obalů (sáčky, obálky). Popis obalů se vzorky by měl obsahovat následující údaje:

- a. název lokality a její souřadnice GPS
- b. datum sběru
- c. specifikaci genotypu řepky olejky: název odrůdy nebo označení novošlechtění
- d. fungicidní ošetření, pokud bylo provedeno

Porost plodiny by měl být v čase sběru vzorků nejlépe suchý. Pokud jsme nuceni provádět sběr za méně vhodných podmínek (déšť, rosa) a vzorky listů jsou vlhké či mokré, je vhodné uložit jednotlivé papírové obaly se vzorky ještě do igelitových (mikrotenových) sáčků a co nejdříve je dopravit na pracoviště a zpracovat. Při déletrvajících odběrech je vhodné používat k dočasnému uskladnění vzorků autochladničku nebo chladicí box s vychlazenými vložkami.

Po převozu vzorků na pracoviště vzorky vyjmeme z obalu a případně nůžkami provedeme redukci pletiva listu řepky dle rozsahu napadené plochy. Listy odebrané ze suchého porostu necháme volně zavadnout na popsaném papírovém obalu či filtračním papíru a následující den je jednotlivě umístíme do přeloženého filtračního papíru, vrátíme do obalu a okamžitě zajistíme jejich předání či odeslání na místo určení. V případě sběru vlhkých či mokrých listů se tento proces prodlouží o jeden den, protože listy musejí před zavadnutím nejdříve volně oschnout. Nežádoucí vlhkost můžeme také jemně odsát filtračním papírem nebo buničitou vatou. Na pracovišti, kde bude prováděna izolace patogena(ů) z těchto vzorků, můžeme tyto vzorky krátkodobě (1–3 dny) uchovat při teplotě 4 °C. V optimálním případě je vhodné tyto vzorky ihned použít k izolaci patogena(ů). Vzorky listů s příznaky napadení původci fomového černání je rovněž možné před samotnou izolací patogena(ů) uchovávat v usušeném stavu. Listy po usušení skladujeme v papírovém obalu v laboratorních podmínkách. Doporučená doba pro zpracování je 6 měsíců, nejdéle však 12 měsíců od data odběru.

Upozornění: Listy řepky nebo jejich části nikdy nenecháváme zavadnout na teplém topném tělese, neboť by došlo k zvlnění pletiva. S takto zvlněným pletivem se následně špatně manipuluje a může dojít k jeho rozpadu při přípravě vzorků k odeslání i u samotné izolace patogena(ů). K nežádoucímu zvlnění volně položených listů může dojít i vlivem rychlého zavadnutí, respektive usušením listů v místnosti s vyšší teplotou. Jestliže tedy nedisponujeme vhodnými podmínkami pro sušení či zavadnutí listů, vzorky přikryjeme nejlépe filtračním papírem a následně mírně zatížíme.

### **2.2.2. Izolace patogena(ů) rodu *Leptosphaeria***

Získání čisté kultury patogena je základním předpokladem pro následnou realizaci a vyhodnocení testů zkoumajících interakce mezi patogenem a hostitelem. Jako výchozí materiál pro izolaci původců fomového černání stonků řepky je optimální použít skvrny s pyknidami pocházející z listů řepky čerstvě odebraných z infikovaného porostu. Tyto listy lze také krátce uchovat při teplotě 4 °C, ale jen do té doby, aby nedošlo ke kontaminaci skvrn saprofytními organismy, která znesnadňuje izolaci původců choroby. V případě velkého množství infikovaných vzorků, kdy není možné časově a organizačně zvládnout celý proces izolace patogena v krátkém časovém úseku, je nutné infikované listy řepky nebo části listů se skvrnami usušit v laboratorních podmínkách (viz výše).

Následující část metodiky je věnována postupu získání monopyknidiálních izolátů, které jsou běžně použitelné pro identifikaci ras *L. maculans*, a také získání monosporických izolátů, u nichž je tento proces oproti monopyknidiálním izolacím časově i materiálově náročnější.

#### Monopyknidiální izoláty

Skvrny s pyknidami vystříháme z listů nůžkami či vyřízneme korkovrtem velikostně odpovídajícím průměru skvrny. Skvrny povrchově sterilizujeme ponořením do 20% Sava po dobu 3 min, poté je

tříkrát opláchneme sterilní ddH<sub>2</sub>O a osušíme na sterilním filtračním papíru. Zrání pyknid (diferenciaci pyknospor) podpoříme vložením skvrn do vlhké komůrky. Jako vlhká komůrka poslouží skleněná, ethanolem desinfikovaná Petriho miska obsahující 3 vrstvy navlhčeného sterilního filtračního papíru. Zpravidla do 2 dnů, kdy Petriho misky ponecháme ve tmě při teplotě 20 °C, pyknidy dozrají. Poté je jednotlivě pomocí sterilní jehly za použití stereomikroskopu přemístíme do Petriho misek na bramboro-dextrózový agar (PDA, HiMedia, Čaderský-Envitek, spol. s r.o.). Zda jsou pyknidy opravdu zralé, lze prověřit mikroskopicky pozorováním pyknospor uvolňujících se z pyknidy. Většinou však postačí pozorovat pyknidy přímo ve vlhké komůrce pomocí stereomikroskopu, kdy lze vidět růžový cirus uvolňujících se pyknospor z ostiolu pyknidy. V tomto případě pak není nutné odebrat jehlou celou pyknidu, ale postačí na špičce jehly zachytit pyknospory a ty přenést na agar. Pyknidy by měly být inkubovány ve vlhké komůrce maximálně po dobu 3 dnů, poté dojde k masivnímu uvolňování pyknospor a vzájemné kontaminaci sousedících pyknid a zvyšuje se tak riziko získání směsného izolátu, což může vést k nepřesné interpretaci dat získaných při následném testování. I v rámci jedné skvrny se totiž mohou vyskytovat pyknidy vzniklé po infekci několika askosporami různého původu. Rovněž dochází i k porůstání skvrn mikroorganismy, které přežily povrchovou sterilizaci, což opět komplikuje izolaci patogena. Petriho misky s pyknidami fixujeme po obvodu termoplastickou krycí fólií Parafilm M a vzorky kultivujeme ve tmě při teplotě cca 20 °C. Po nárůstu mycelia izoláty dále přeočkujeme a namnožíme v množství dostatečném pro další analýzy.

### Monosporové izoláty

Způsob získávání zralých pyknid se shoduje s výše uvedeným postupem. Pyknidy jednotlivě umístíme sterilní jehlou do sterilní 0,5 ml mikrozkušavky obsahující 50 µl sterilní ddH<sub>2</sub>O a rozmáčkne je pomocí sterilní 200 µl pipetovací špičky. Pyknospory řádně promícháme pomocí vortexu, jejich přítomnost v suspenzi potvrdíme mikroskopicky a jejich koncentraci spočítáme pomocí Bürkerovy komůrky. Následně koncentraci pyknospor v suspenzi upravíme cca na 1000 pyknospor/ml. Obvykle pipetujeme 20 µl suspenze pyknospor do sterilní 2 ml mikrozkušavky obsahující 1000 µl sterilní ddH<sub>2</sub>O. Z řádně promíchané suspenze pipetou odebereme 100 µl (cca 100 pyknospor) a toto množství rovnoměrně rozetřeme na PDA pomocí skleněné hokejky nebo skleněné tyčinky s lopatkou. Petriho misky po obvodu fixujeme termoplastickou krycí fólií Parafilm M a vzorky kultivujeme ve tmě při teplotě cca 20 °C. Po 2 a více dnech inkubace lze pozorovat pomocí stereomikroskopu hyfy vyrůstající z jednotlivých pyknospor. Špičkou sterilní jehly vyřízneme vybranou hyfu z agaru a umístíme ji do nové Petriho misky obsahující PDA. Petriho misky opět fixujeme po obvodu termoplastickou krycí fólií Parafilm M a vzorky kultivujeme ve tmě při teplotě cca 20 °C. Po nárůstu mycelia izoláty dále přeočkujeme a namnožíme v množství dostatečném pro další analýzy.

### 2.2.3. Determinace patogenů *L. maculans* a *L. biglobosa*

Pro identifikaci rasového spektra u souboru izolátů *Leptosphaeria* spp. je nutné znát příslušnost testovaného izolátu k danému druhu patogena. Z tohoto důvodu lze izoláty determinovat pomocí PCR – polymerázové řetězové reakce (Mahuku et al., 1996) a multiplex PCR (Liu et al., 2006). Jako výchozí materiál použijeme mycelium izolátů, ze kterého DNA izolujeme pomocí kitu Gene Elute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Merck). Další postup je uveden v certifikované metodice (Ryšánek et al., 2016).

### 2.2.4. Příprava inokula pro identifikaci ras *L. maculans*

Čerstvě narostlé mycelium izolátů *L. maculans* spolu s agarem rozmačkáme přímo v Petriho misce pomocí sterilní skleněné či plastové hokejky nebo sterilním mikroskopickým podložním sklíčkem. Homogenizovaný obsah poté rovnoměrně rozmístíme do dvou Petriho misek na povrch 20% V8 agaru (na 1 litr použijeme 200 ml V8 zeleninového džusu Campbell Soup Company, 3 g CaCO<sub>3</sub> a 16 g agaru). Petriho misky po obvodu zafixujeme papírovou prodyšnou páskou 3M Micropore™ a umístíme do termostatu za definovaných podmínek – teplota 20 °C, vlhkost 90 %, 16 h světlo (studené světlo, 18600 lm) a 8 h tma. Tyto podmínky zajistí tvorbu a zrání pyknid na povrchu média. Zralé pyknidy v Petriho misce zalijeme sterilní ddH<sub>2</sub>O, rozmělníme pomocí sterilního mikroskopického podložního sklíčka, aby došlo k uvolnění jejich obsahu. Získanou suspenzi obsahující pyknospory, zbytky pyknid a mycelia poté filtrujeme přes tři vrstvy sterilní gázy do sterilních plastových centrifugačních 50 ml zkumavek. Suspenzi pyknospor řádně promícháme a pomocí Bürkerovy komůrky spočítáme koncentraci pyknospor. Následně koncentraci pyknospor upravíme na  $1 \times 10^7$ /ml. Pyknospory uchováváme ve sterilních 0,2 ml mikrozkušavkách při teplotě – 18 °C a dlouhodobě ve sterilních 2 ml mikrozkušavkách ve sterilním 25% glycerolu při teplotě – 80 °C.

### 2.2.5. Inokulační test

Pro detekci genů avirulence (*AvrLm*) přítomných v izolátech *L. maculans* je používán inokulační test, který je prováděn na semenáčcích řepky. Izoláty jsou testovány na souboru diferenciačních odrůd/genotypů řepky se známými geny rezistence (*Rlm*). Tyto diferenciační genotypy pocházejí z INRA, Institut de Génétique Environnement et Protection des Plantes (Tab. 2).

Tab. 2: Přehled diferenciačních genotypů řepky olejky se známými geny rezistence (*Rlm*).

Genotyp řepky olejky	<i>Rlm</i> gen
MT29	<i>Rlm1</i>
Bristol	<i>Rlm2, Rlm9</i>
02.22.2.1	<i>Rlm3</i>
Jet Neuf	<i>Rlm4</i>
01.23.2.1	<i>Rlm7</i>
Goéland	<i>Rlm9</i>
Westar	nenese žádný <i>Rlm</i> gen

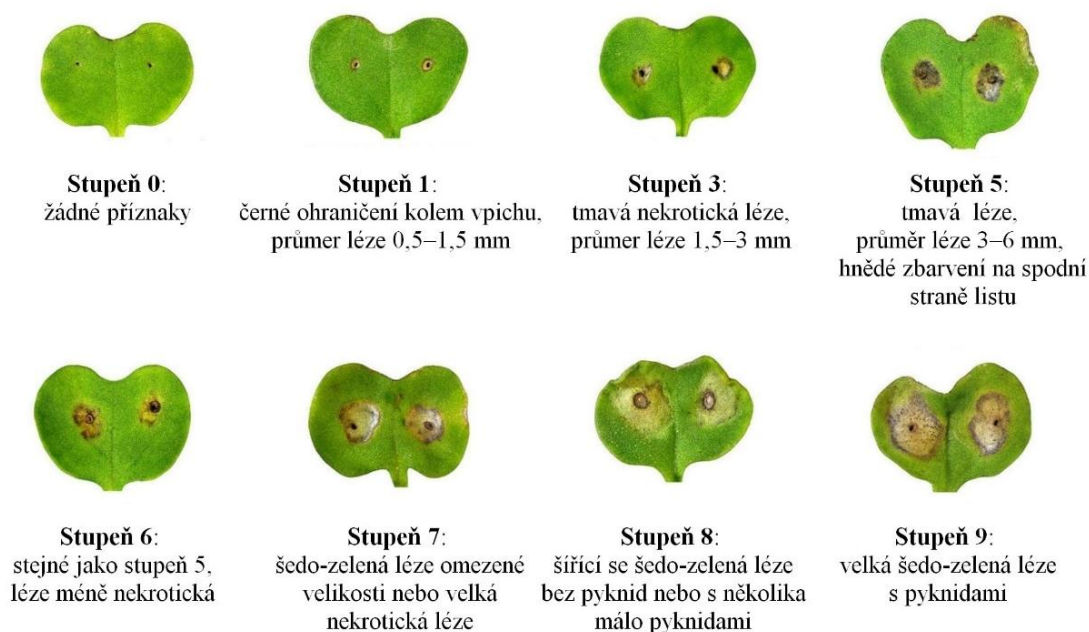
Odrůda Westar je používána jako kontrola inokulace. Pokud se vytvoří na děložních lístcích této odrůdy inkompatibilní reakce, je potřeba takový izolát *L. maculans* testovat na celém diferenciačním souboru znovu.

Pro přípravu semenáčků rostlin a jejich následnou inokulaci lze využít modifikovaný protokol dle Šašek et al. (2012). Rostliny řepky pěstujeme za definovaných podmínek (optimálně: světlo/tma, 14/10 h, 22/20 °C, intenzita světla 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) tak, aby byly výsledky reprodukovatelné a nedošlo k ovlivnění symptomů např. příliš vysokou teplotou, při které by mohla být potlačena hypersenzitivní reakce rostlin. Rostliny je možné pěstovat v zahradnickém substrátu nebo v hydroponické kultuře (perlit, živný roztok podle Steinera; Steiner, 1984) v sadbovačích o velikosti 6 × 6 cm. Před inokulací je nutné rostliny fixovat pomocí špejle a drátku, aby nedocházelo k jejich poléhání.

Pro inokulační test používáme děložní listy 10 dní starých rostlin. Každou polovinu děložního listu propíchneme sterilním špendlíkem či jehlou a na místo vpichu pipetuje 10  $\mu\text{l}$  konidiální suspenze o koncentraci  $10^7$  pyknospor/ml. Na každé rostlině tak lze testovat 4 izoláty *L. maculans* (Obr. 4–8, obrazová příloha). Pro zajištění reprodukovatelných výsledků je nutné každý izolát testovat nejméně na 10 rostlinách. Inokulované rostliny zakryjeme černou PE fólií pro zvýšení vzdušné vlhkosti a zabránění průniku světla. Po 48 h fólii z rostlin sejmem a rostliny dále pěstujeme za výše uvedených podmínek. Po 4 dnech od inokulace odstraníme z rostlin tvořící se pravé listy, abychom zabránili senescenci děložních listů. Symptomy způsobené *L. maculans* na děložních listech v podobě lézí a nekrotizace hodnotíme přibližně po 14 dnech od inokulace pomocí škály (Obr. 2). Rychlost rozvoje symptomů závisí na kultivačních podmínkách i ročním období, takže je potřeba tvorbu symptomů kontinuálně sledovat a hodnotit symptomy v optimálním okamžiku na celé testované skupině rostlin najednou.

Pomocí škály hodnotíme velikost a barvu nekrotických lézí popsanych a vyobrazených na Obr. 2. Pro určení přítomnosti genů avirulence se používá průměr získaný pomocí škály. Pokud je výsledná hodnota v rozmezí 1–3 (odpovídá inkompatibilní reakci), pak je v izolátu přítomen příslušný gen

avirulence (*AvrLm*). Pokud je výsledná hodnota vyšší než 3 (odpovídá kompatibilní reakci), v izolátu není přítomen gen avirulence, který by odpovídal genu rezistence (*Rlm*) v konkrétním genotypu řepky.



Obr. 2: Škála s příznaky infekce způsobené *Leptosphaeria maculans* pro hodnocení napadení děložních listů u diferenciační sady genotypů řepky olejky. Převzato a upraveno podle Koch et al. (1991).

Rasy testovaných izolátů *L. maculans* označujeme podle genů *AvrLm* v nich identifikovaných (Tab. 3). Např. jsou-li u izolátu přítomné geny *AvrLm7* a *AvrLm9* a ostatní geny avirulence přítomné nejsou, tento izolát označíme jako rasu *AvrLm7-9*. Tato rasa je tedy avirulentní ke korespondujícím genům rezistence *Rlm7* a *Rlm9* a virulentní ke genům rezistence *Rlm1*, *Rlm2*, *Rlm3* a *Rlm4*.

Tab. 3: Geny avirulence detekované v izolátech *Leptosphaeria maculans* na základě inkompatibilní interakce s příslušným diferenciačním genotypem řepky olejky.

Gen avirulence	Genotyp	Interakce hostitel – patogen	Přítomnost genu avirulence
<i>AvrLm1</i>	MT29	inkompatibilní	+
<i>AvrLm2</i>	Bristol Goéland*	inkompatibilní kompatibilní*	+
<i>AvrLm3</i>	02.22.2.1	inkompatibilní	+
<i>AvrLm4</i>	Jet Neuf	inkompatibilní	+
<i>AvrLm7</i>	01.23.2.1	inkompatibilní	+
<i>AvrLm9</i>	Bristol Goéland	inkompatibilní inkompatibilní	+

\*Genotyp Bristol nese geny rezistence *Rlm2* a *Rlm9*. Pokud izolát *L. maculans* nese pouze gen *AvrLm2*, interakce s genotypem Goéland musí být kompatibilní.

### 2.2.6. PCR detekce přítomnosti genů avirulence v *L. maculans*

Pro ověření přítomnosti genů avirulence v polním izolátu *L. maculans* je možné také provést detekci genu metodou PCR. Zde je ale potřeba zdůraznit, že tato metoda nemůže nahradit testování izolátů na souboru diferenčních genotypů. Důvodem je častý vznik mutací v genomu patogena, které nemusejí být pomocí PCR zjištěny.

#### Izolace genomové DNA

Nejprve je potřeba izolovat genomovou DNA (gDNA) izolátu *L. maculans*. Ta je získána z mycelia izolátu kultivovaného na V8 agaru po dobu 7–10 dní, během nichž by mycelium mělo pokrýt zhruba 3/4 povrchu agaru v Petriho misce. Mycelium je poté zpracováno v několika krocích dle protokolu Feng et al. (2010). Veškeré kroky jsou prováděny při laboratorní teplotě, přičemž jsou použity 1,5 či 2 ml plastové mikrokumavky.

1. Nejprve připravíme roztoky potřebné pro izolaci gDNA: lyzační pufr (100mM Tris-HCl pH 8; 50mM EDTA pH 8 a 1% SDS); 3M octanu draselný pH 5,5; isopropanol; 96% ethanol a MiliQ nebo redestilovaná voda.
2. Z povrchu agaru porostlého myceliem izolátu opatrně odebereme sterilním skalpelem mycelium a umístíme jej do homogenizační mikrokumavky obsahující 1 g keramických kuliček.
3. Do každé zkumavky přidáme 650  $\mu$ l lyzačního pufru (pufr může být zakalený díky srážení SDS, proto je nutné ho před přidáním do mikrokumavek zahřát na 55–60 °C).
4. Mikrokumavky se směsí vortexujeme po dobu alespoň 10 s a poté inkubujeme při pokojové teplotě 2 min, aby došlo k lýzi buněčných membrán mycelia. Poté znovu vortexujeme 10 s.
5. Mikrokumavky s obsahem centrifugujeme při 13000 RPM po dobu 3 min.
6. Supernatant (zhruba 500  $\mu$ l) odebereme a přemístíme do nové mikrokumavky. Do mikrokumavky přidáme 100  $\mu$ l 3M octanu draselného a směs promícháme opakovaným obrácením mikrokumavky (5  $\times$ ).
7. Mikrokumavky s obsahem centrifugujeme při 13000 RPM po dobu 3 min.
8. Supernatant (zhruba 500  $\mu$ l) odebereme a přemístíme do nové mikrokumavky tak, abychom nenarušili bílou peletu na dně mikrokumavky, ze které je vzorek odebírán. Do mikrokumavky přidáme 500  $\mu$ l isopropanolu a směs promícháme opakovaným obrácením mikrokumavky (5  $\times$ ).
9. Mikrokumavky s obsahem centrifugujeme při 13000 RPM po dobu 3 min.
10. Z mikrokumavek vylijeme supernatant. Na dně každé mikrokumavky by měla zůstat velice drobná peleta gDNA.
11. Peletu opatrně promyjeme přidáním 750  $\mu$ l ethanolu.
12. Mikrokumavky s obsahem centrifugujeme při 13000 RPM po dobu 3 min.

13. Ethanol z mikroskopavek vylijeme a otevřené mikroskopavky ponecháme zhruba 20 min dnem vzhůru na papírovém kapesníčku, aby peleta gDNA byla vysušena od zbytků ethanolu.

14. K peletě gDNA přidáme 50  $\mu$ l MiliQ nebo redestilované vody a poté vortexujeme do jejího rozpuštění.

U získané gDNA je před provedením PCR nutné změřit její koncentraci. Nejnižší možná koncentrace vhodná pro amplifikaci je 20 ng/ $\mu$ l. Pokud je koncentrace vyšší než optimální koncentrace 100 ng/ $\mu$ l, je nutné naředit vzorek na tuto koncentraci.

#### PCR – polymerázová řetězová reakce

Cílem této metody je získat amplifikací dostatečný počet molekul specifického úseku DNA, který chceme detekovat. Amplifikace tohoto specifického úseku je umožněna jeho koncovým ohraničením dvojicí primerů (forward a reverse primery), nasedajících komplementárně na templátové vlákno a vymezujících tak oblast syntézy komplementárního vlákna DNA polymerázou. Tyto krátké oligonukleotidy a DNA polymeráza jsou spolu s dalšími látkami součástí reakční směsi pro PCR (Tab. 4). U firem vyrábějících látky pro molekulárně-biologické analýzy lze pořídit různé typy tohoto enzymu, proto je nutné upravit koncentraci látek v reakční směsi dle doporučení výrobce. V Tab. 4 je uvedena reakční směs pro PCR obsahující DreamTaq polymerázu (K1081, ThermoFisher Scientific), respektive tzv. DreamTaq green PCR Master Mix, jehož součástí jsou i další důležité látky pro činnost tohoto enzymu (DreamTaq DNA polymeráza; 2  $\times$  DreamTaq Green pufr; 0,4 mM každého dNTP a 4 mM MgCl<sub>2</sub>).

Tab. 4: Složení reakční směsi (20  $\mu$ l) pro detekci genů avirulence.

Látka (zásobní koncentrace)	Objem (finální koncentrace)
MiliQ H <sub>2</sub> O	7 $\mu$ l
DreamTaq PCR Master Mix (2 $\times$ )	10 $\mu$ l (1 $\times$ )
forward primer (5 $\mu$ M)	1 $\mu$ l (0,25 $\mu$ M)
reverse primer (5 $\mu$ M)	1 $\mu$ l (0,25 $\mu$ M)
templátová DNA	1 $\mu$ l (20–100 ng)

Pro detekci konkrétních genů avirulence (*AvrLm*) u testovaných izolátů *L. maculans* lze využít následující dvojice primerů (Tab. 5), pomocí nichž jsou amplifikovány části sekvencí těchto genů za definovaných teplotních a časových podmínek (Tab. 6) nastavených v termocykleru.

Tab. 5: Seznam sad primerů pro detekci jednotlivých genů avirulence (*AvrLm*) u izolátů *Leptosphaeria maculans*.

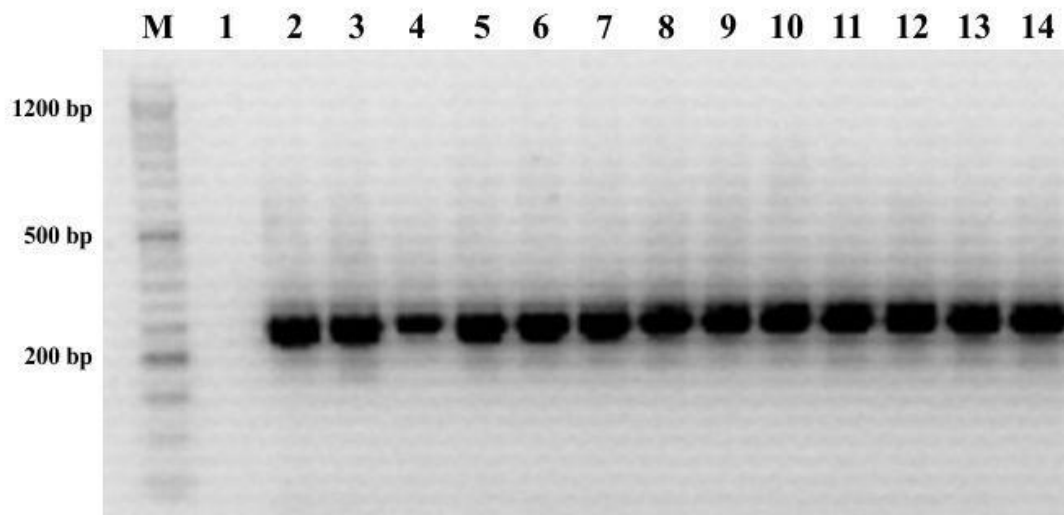
Primer	Sekvence	Velikost amplifikovaného produktu (bp)
AvrLm1 F AvrLm1 R	TTTCCAGACGTTCCGAGTGG AATGAGCGGAACCACGACAT	293
AvrLm2 F AvrLm2 R	GACGTCATCAATGCGTTCGG GTCCACGTGACTACCACCAG	180
AvrLm3 F AvrLm3 R	CTGCCTTTAGACGACCCCTG CTTTGGACACAAATCCGCGG	374
AvrLm4-7 F AvrLm4-7 R	GCTTTAGCTCAGCACCTGGA TAGGCTGATGGATCAACCGC	216
AvrLm5 F AvrLm5 R	GTCACCGTTTCTCGAGACGT ACGTGTAGAGCGACGTTGAG	269
AvrLm6 F AvrLm6 R	GAGAGCGGTAGACGTGATGG TAGCATGAGCCTAGAACGCG	234
AvrLm11 F AvrLm11 R	GCAAACCTGGAAGGGGCAGTA CCGTGTGTACTCCTTCCGTT	121

Tab. 6: Podmínky PCR reakce pro detekci genů avirulence (*AvrLm*) u izolátů *Leptosphaeria maculans*.

Krok	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	2 min	1
Denaturace	95	30 s	35
Nasedání primerů	55	30 s	
Elongace	72	1 min	
Konečná elongace	72	5 min	1

#### Elektroforetická separace a vizualizace amplifikovaných úseků DNA

Získané amplifikované DNA fragmenty analyzujeme pomocí elektroforézy v 2% agarózovém gelu s vizualizačním barvivem (např. GelRed nebo ethidium bromid). Do jamek v gelu nanese jednotlivé vzorky smíchané s nanášecím barvivem a vhodný velikostní marker (hmotnostní standard). Podmínky elektroforézy volíme na základě vzdálenosti mezi oběma elektrodami (elektrické napětí: 5–8 V/cm), očekávané velikosti amplifikované sekvence a rozměrů elektroforetické vaničky (čas potřebný pro separaci). DNA fragmenty vizualizujeme pomocí UV transiluminátoru a porovnáme jejich velikost s hmotnostním standardem. Výsledný elektroforeogram (Obr. 3) lze zdokumentovat vhodným automatickým dokumentačním a analytickým systémem. Podrobný protokol lze najít v certifikované metodice Ryšánek et al. (2016).



Obr. 3: Příklad elektroforetické separace PCR produktů po amplifikaci s primery AvrLm3 F a AvrLm3 R. M: velikostní marker, 1: izolát bez genu *AvrLM3*, 2–14: izoláty s genem *AvrLM3*.

### 2.2.7. Přílohy

#### MATERIÁL POTŘEBNÝ PRO SBĚR VZORKŮ

Zahradnické nůžky

Papírové sáčky či obálky dle velikosti listů v době sběru

Igelitové (mikrotenové) sáčky

Filtrační papíry

Tužka s měkkou tuhou

Box (přepravka, bedýnka) na uložení odebraných vzorků

#### MATERIÁL POTŘEBNÝ PRO PRÁCI S PATOGENEM

Skleněné Petriho misky (9 cm)

Plastové Petriho misky (9 cm)

Pinzeta, nůžky, korkovrt, injekční jehly

Skleněná tyčinka s lopatkou, skleněná hokejka, plastové hokejky

Kádinky, odměrný válec

Sterilní destilovaná voda

Filtrační papír

Parafilm M (termoplastická krycí fólie)

3M Micropore™ (papírová prodyšná páska)

Gáza

Plastové centrifugační uzavíratelné mikrozkušavky (0,2; 0,5; 1,5; 2 ml)

Plastové centrifugační zkumavky se šroubovacím víčkem (50 ml)

Automatické pipety pro různé objemy

Pipetovací špičky pro různé objemy

Bürkerova komůrka

Krycí a podložní mikroskopická sklíčka

Stereomikroskop

Světelný mikroskop (nejlépe s fázovým kontrastem)

Centrifuga kombinovaná s vortexem a třepačka

Flow-box s plynovým kahanem pro sterilní práci

Kultivační box

Mrazicí box (−18 °C, − 80 °C)

Pevná kultivační média pro růst a sporulaci *L. maculans*:

PDA (bramboro-dextrózový agar), příprava dle výrobce (HiMedia, Čadarský-Envitek , spol. s r.o.)

V8 agar (na 1 l: 200 ml V8 zeleninového džusu Campbell Soup Company, 3 g CaCO<sub>3</sub>, 16 g agaru)

## ROSTLINNÝ A PĚSTEBNÍ MATERIÁL

Semena řepky olejky (*Brassica napus*) různých genotypů

Perlit

Plastové sadbovače (s jamkami přibližně 6 × 6 cm)

Destilovaná voda

Kultivační komora

Živný roztok dle Steinerja pro hydroponické pěstování rostlin řepky (Steiner, 1984)

Zásobní roztok	Sloučenina	Koncentrace v zásobním roztoku (g/l)	Objem na 1 l roztoku
A	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	88,2	5 ml
	$\text{KNO}_3$	44,4	
B	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	13,5	5 ml
	$\text{K}_2\text{SO}_4$	15,4	
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	47,3	
C	$\text{NaFeEDTA}$	3,285	0,5 ml
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,2	
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,269	
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,506 mg	
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,126 mg	
D		rozpustit v 50 ml	0,5 ml
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	7,8 mg/10 ml	
		přidat a doplnit roztok do 100 ml	

## MATERIÁL POTŘEBNÝ PRO INOKULACE ROSTLIN

Destilovaná voda

Jehla či špendlík

Špejle

Drátky

Automatická pipeta (10 µl)

Pipetovací špičky (10 µl)

Neprodyšná fólie

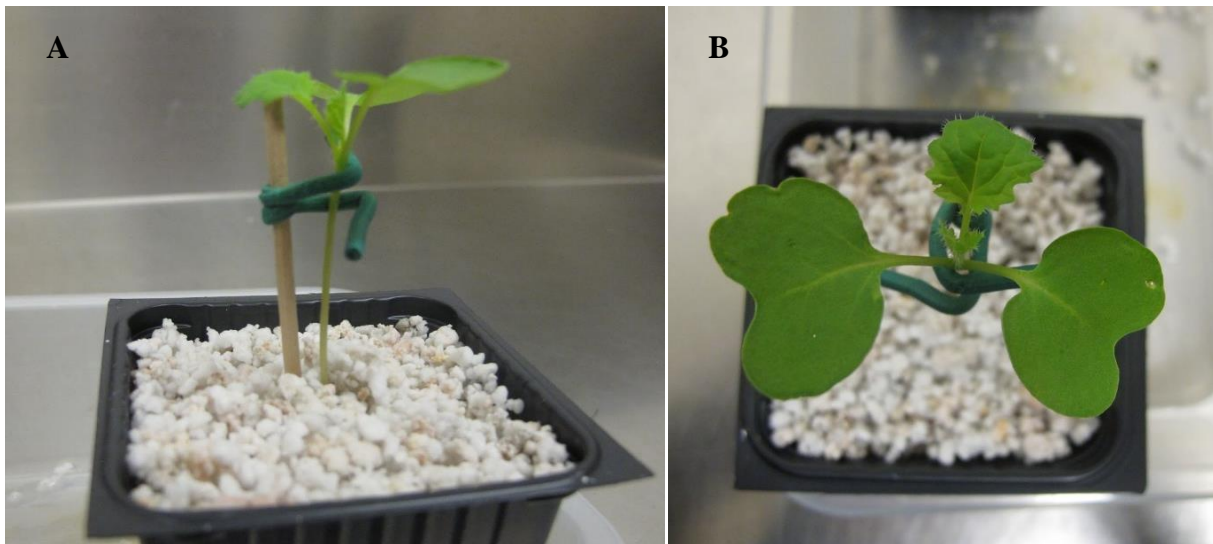
## 2.2.8. Obrazová příloha



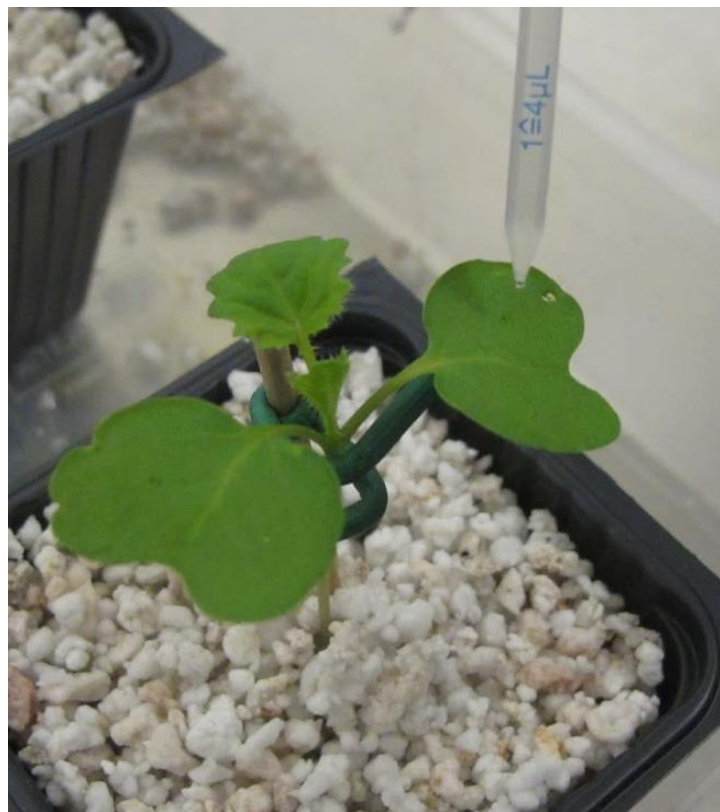
Obr. 4: Vpich jehlou na děložním lístku diferenciačního genotypu řepky olejky se známým genem *Rlm* pro vytvoření místa inokulace izolátem *Leptosphaeria maculans* s neznámými geny *AvrLm*.



Obr. 5: Vpichy jehlou na děložních lístcích diferenciačního genotypu řepky olejky se známým genem *Rlm* pro inokulaci izoláty *Leptosphaeria maculans* s neznámými geny *AvrLm*. Na každé půlce děložního listu je jeden vpich (červená šipka) a v levém rohu jednoho děložního listu je větší vpich sloužící pro orientaci při inokulaci a vyhodnocení (modrá šipka).



Obr. 6: Fixovaná rostlina diferenciačního genotypu řepky olejky před inokulací, (A) pohled ze strany, (B) pohled ze shora.



Obr. 7: Inokulace děložních lístků diferenciačního genotypu řepky olejky na místě vpichu kapkou suspenze konidií (pykno spor) izolátu *Leptosphaeria maculans* o koncentraci  $10^7$  spor/ml.



Obr. 8: Děložní lístky diferenciačního genotypu řepky olejky inokulované 4 různými izoláty *Leptosphaeria maculans*.

### 3. Srovnání „novosti postupů“

V předložené metodice je uveden podrobný, optimalizovaný a ověřený postup umožňující spolehlivou detekci genů avirulence v izolátech *L. maculans*. Na základě detekce genů avirulence lze identifikovat a monitorovat rasovou strukturu v populacích *L. maculans* vyskytujících se na území České republiky, a tak vyhodnotit riziko spojené s překonáním genů rezistence, které jsou v současné době šlechtitelsky uplatňovány v pěstovaných odrůdách řepky olejky. V zemích patřících k nejvýznamnějším pěstitelům řepky (Francie, Velká Británie, Německo, Kanada a Austrálie), je běžné, že tento monitoring genů avirulence a ras je prováděn opakovaně již řadu let, zatímco v ČR se touto problematikou dosud nikdo nezabýval.

### 4. Popis uplatnění metodiky

Metodika bude uplatněna na základě uzavřené smlouvy o využití s uživatelem Agritec Plant Research s.r.o., a to bezplatně, protože projekt, v jehož rámci tato metodika vznikla, využívá pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví a rybolovu podle článku 31 Nařízení Komise (EU) č. 702/2014 ze dne 25. června 2014, kterým se v souladu s články 107 a 108 Smlouvy o fungování Evropské unie prohlašují určité kategorie podpory v odvětvích zemědělství a lesnictví a ve venkovských oblastech za slučitelné s vnitřním trhem (ABER) nebo článku 30 Nařízení Komise (EU) č. 651/2014 ze dne 17. června 2014, kterým se v souladu s články 107 a 108 Smlouvy o fungování Evropské unie prohlašují určité kategorie podpory za slučitelné s vnitřním trhem (GBER).

Tato metodika bude rovněž zdarma zveřejněna na webových stránkách [www.agronavigator.cz](http://www.agronavigator.cz), a proto ji mohou využít šlechtitelské stanice zabývající se šlechtěním řepky olejky a instituce vzdělávající v oblasti ochrany a šlechtění rostlin.

### 5. Ekonomické aspekty

Řepka olejka a zejména její ozimá forma je plodinou, která poskytuje lidské společnosti suroviny, bez kterých si již nedovedeme některá odvětví a jejich fungování vůbec představit. Využití řepky olejky a dalších olejnin v různých výrobních odvětvích má vzestupný trend, a to nejen z důvodu tlaku společnosti na zvyšování podílu obnovitelných zdrojů. Celková produkce řepkového oleje ve světě v hospodářském roce 2019–20 dosáhla 28 mil. t. Nejvíce řepkového oleje bylo vyrobeno v EU (9,7 mil. t), dále v Číně (6 mil. t), Kanadě (4 mil. t) a Indii (2,7 mil. t). V České republice bylo v roce 2021 vyprodukováno 1246 tis. tun řepkového semene, a to ze sklizňové plochy 368 tis. ha s průměrným výnosem 3,38 t/ha. Výkupní ceny pak validovaly podle olejnatosti a měsíce prodeje mezi 12–14 tis. Kč/t. Uplatněním metodických postupů k získání nových informací lze predikovat následující ekonomické a další neekonomické přínosy, a to jak u pěstitelů, producentů osiva, šlechtitelů i zpracovatelů olejnin. Hlavním aspektem je zefektivnění šlechtění nových odrůd

a zlepšení marketingu prodeje. Každá nová odrůda bude deklarovaná z hlediska přítomnosti genů rezistence *Rlm* vůči *L. maculans*, a to již v průběhu procesu šlechtění, který bude pouze obohacen o tento další selekční faktor. Každoroční předpokládané uplatnění je zejména u českých liniových odrůd mezi 4 až 5 tis. ha. To při každoročním prodeji 5000 výsevních jednotek představuje tržby cca 5–10 mil. Kč při minimální ceně 1–2 tis. Kč za 1 výsevní jednotku české liniové odrůdy řepky. V ceně je zohledněna prodejní sleva. Při zvýšení prodeje o cca 2 % dojde ke každoročnímu navýšení tržeb minimálně o 100–200 tis. Kč, a to pouze na 1,3 % sklizňové plochy ČR, přičemž v budoucnu je predikován další roční nárůst ploch osetých českými liniovými odrůdami řepky cca o 0,5 %. Vyjádřeno kumulativně to může v horizontu 5 let znamenat nárůst tržeb až o dalších 192,5–385 tis. Kč. Dalším významným aspektem, který bude uvedením metodiky do praxe ovlivněn, je snížení vstupů fungicidního ošetření řepky olejky. V případě, že bude kalkulováno podzimní ošetření na 1 ha řepky olejky v rozmezí 500–1500 Kč, bude úspora na tomto ošetření v případě pěstování prověřených rezistentních odrůd cca 1000–1500 Kč. V případě českých linií pěstovaných na 4450 ha pak celkovou úsporu můžeme vyjádřit na 4,45–6,675 mil. Kč ročně, kumulativně za pět let pak cca 22,25–33,4 mil. Kč. Pokud bychom predikovali zvýšení zastoupení rezistentních odrůd v osevním postupu o 1,5 % ročně nad rámec výše uvedené kalkulace, pak by celková úspora na nákladech na podzimní fungicidní ošetření měla dosáhnout kumulativně za pět let částky 23,9–35,9 mil. Kč. Nelze opominout ani další neekonomické aspekty, které budou ovlivněny, a to zejména snížení reziduí fungicidů v komoditě, snížení aplikace fungicidů do životního prostředí a v neposlední řadě i snížení nákladů na pohonné hmoty.

## 6. Seznam použité související literatury

- Cross, D. J., Liban, S. H., Peng, G., Fernando, W. G. D., & Kutcher, H. R. 2014. Identification of avirulence genes in the *Leptosphaeria maculans* population in Manitoba and Saskatchewan in 2010. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 36: 257–258.
- Feng, J., Hwang, R., Chang K. F., & Hwang, S. F. 2010. An inexpensive method for extraction of genomic DNA from fungal mycelia. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 32(3): 396–401.
- Koch, E., Song, K., Osborn, T. C., & Williams, P. H. 1991. Relationship between pathogenicity and phylogeny based on restriction fragment length polymorphism in *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 4: 341–349.
- Kutcher, H. R., Balesdent, M. H., Rimmer, S. R., Rouxel, T., Chevre, A. M., Delourme, R., & Brun, H. 2010. Frequency of avirulence genes in *Leptosphaeria maculans* in western Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 32: 77–85.

- Li, H., Sivasithamparam, K., & Barbetti, M. J. 2003. Breakdown of a *Brassica rapa* subsp. *sylvestris* single dominant blackleg resistance gene in *B. napus* rapeseed by *Leptosphaeria maculans* field isolates in Australia. *Plant Diseases*, 87: 752.
- Liu, S. Y., Liu, Z., Fitt, B. D., Evans, N., Foster, S. J., Huang, Y. J., Latunde-Dada, A. O., & Lucas, J. A. 2006. Resistance to *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in *Brassica napus* (oilseed rape) induced by *L. biglobosa* and chemical defence activators in field and controlled environments. *Plant Pathology*, 55(3): 401–412.
- Mahuku, G. S., Hall, R., & Goodwin, P. H. 1996. Co-infection and induction of systemic acquired resistance by weakly and highly virulent isolates of *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49: 61–72.
- Rashid, M. H., Liban, S., Zhang, X. H., Parks, P., Borhan, H., & Fernando, W. G. D. 2021. Impact of *Brassica napus*-*Leptosphaeria maculans* interaction on the emergence of virulent isolates of *L. maculans*, causal agent of blackleg disease in canola. *Plant Pathology*, 70: 459–474.
- Rouxel, T., Penaud, A., Pinochet, X., Brun, H., Gout, L., Delourme, R., Schmit, J., & Balesdent, M. H. 2003. A 10-year survey of populations of *Leptosphaeria maculans* in France indicates a rapid adaptation towards the *Rlm1* resistance gene of oilseed rape. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 871–881.
- Ryšánek, P., Mazáková, J., Řičařová, V., Singh, K. S., & Zouhar, M. 2016. Molekulární metody detekce a identifikace vybraných patogenů řepky. Certifikovaná metodika. ČZU v Praze.
- Sprague, S. J., Balesdent, M. H., Brun, H., Hayden, H. L., Marcroft, S. J., Pinochet, X., Rouxel, T., & Howlett, B. J. 2006. Major gene resistance in *Brassica napus* (oilseed rape) is overcome by changes in virulence of populations of *Leptosphaeria maculans* in France and Australia. *European Journal of Plant Pathology*, 114: 33–40.
- Stachowiak, A., Olechnowicz, J., Jedryczka, M., Rouxel, T., Balesdent, M. H., Happstadius, I., Gladders, P., Latunde-Dada, A., & Evans, N. 2006. Frequency of avirulence alleles in field populations of *Leptosphaeria maculans* in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 114: 67–75.
- Steiner A. A., 1984. The universal nutrient solution. In: *Proceedings of the Sixth International Congress on "Soilless Culture"*. Pudoc, Wageningen, The Netherlands. P. 633–650.
- Šašek, V., Nováková, M., Jindřichová, B., Bóka, K., Valentová, O., & Burketová L. 2012. Recognition of avirulence gene *AvrLm1* from hemibiotrophic ascomycete *Leptosphaeria maculans* triggers salicylic acid and ethylene signaling in *Brassica napus*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 25: 1238–1250.

- Van de Wouw, A. P., Howlett, B. J., & Idnurm, A. 2018. Changes in allele frequencies of avirulence genes in the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, over two decades in Australia. *Crop & Pasture Science*, 69: 20–29.
- Winter, M., & Koopmann, B. 2016. Race spectra of *Leptosphaeria maculans*, the causal agent of blackleg disease of oilseed rape, in different geographic regions in northern Germany. *European Journal of Plant Pathology*, 145: 629–641.
- Zheng, X., Koopmann, B., Ulber, B., & von Tiedemann, A. 2020. A global survey on diseases and pests in oilseed rape – current challenges and innovative strategies of control. *Frontiers in Agronomy*, 2: 1–15.
- Zou, Z. W., Zhang, X. H., & Fernando, W. G. D. 2018. Distribution of mating-type alleles and genetic variability in field populations of *Leptosphaeria maculans* in western Canadian Journal of Phytopathology, 166: 438–447.

## 7. Seznam publikací, které předcházely metodice

- Klima, M., Bělská, K., Čurn, V., Endlová, L., Gališová, V., Hejna, O., Horáček, J., Horák, J., Hoštičková, I., Jozová, E., Kosová, K., Kučera, V., Macháčková, I., Plachká, E., Prášil, I., Rychlá, A., Schemit, Y. H., Řičica, M., Smýkalová, I., Šafář, J., Šmirous, P., Tyller, V., Vítámvás, P., & Vrbovský, V. 2020. Výsledky a průběh programu Česká řepka v roce 2020. 37. vyhodnocovací sborník. SPZO s.r.o. S. 68–73.
- Plachká, E. 2018: Význam fomového černání stonků řepky v pěstování ozimé řepky v ČR. XXI. Česká a slovenská konference o ochraně rostlin. Mendelu v Brně 5.–6. září 2018. Sborník abstraktů. S. 64.
- Plachká, E., Vrbovský, V., Rychlá, A., Burgetová, M., Jindřichová, B., Burketová, L., Fajemisin, O., Mazáková, J., & Ryšánek P. 2019. Hodnocení významu fomového černání ve šlechtění a pěstování řepky olejky ozimé v ČR a monitoring genů avirulence v populacích *Leptosphaeria maculans*. Systém výroby řepky a systém výroby slunečnice (36. vyhodnocovací seminář), Hluk, 20.–21. 11. 2019, SPZO s.r.o., Praha. S. 150–156.
- Plachká, E., & Šafář, J. 2020: Význam fomového černání stonku řepky v ČR. Úroda, 68 (12), vědecká příloha časopisu, 207–212
- Plachká, E., Šafář, J., & Burgetová, M. 2020. Zdravotní stav řepky olejky ozimé na Opavsku a Šumpersku v sezóně 2019/2020. Sborník SPZO 2020 – Výsledky pěstování olejnin, 37. vyhodnocovací sborník. SPZO s.r.o. S. 106–115.
- Plachká, E., Vrbovský, V., Rychlá, A., Burgetová, M., Jindřichová, B., & Burketová, L. 2020. Aktuální poznatky o fomovém černání stonku řepky. Úroda, 68 (4), odborná příloha časopisu, 4–7.

- Pošlušná, J., Plachká, E., Horáček, J., Macháčková, I., Ondráčková, E., Šmirous, P., & Vrbovský, V. 2019: The harmfulness of phoma stem canker, Sclerotinia stem rot, and phytoplasma on winter oilseed rape with regard to Czech breeding programs. *Agronomy*, 9 (2): 75.
- Prokinová, E., Plachká, E., & Šafář, J. 2019: Příspěvek k signalizaci a prognóze napadení řepky *Leptosphaeria* spp. / Contribution to signalling and forecast the infestation of oilseed rape by *Leptosphaeria* spp. *Rostlinolékař*, 2: 23–27.
- Ryšánek, P., & Burketová, L. 2017. Rezistence řepky k houbám z rodu *Leptosphaeria* – cesta ke stabilizaci jejich výnosů? *Rostlinolékař*, 28 (6): 16–18.
- Vrbovský, V. 2020. Výsledky a průběh programu Česká řepka v roce 2020. 37. vyhodnocovací sborník. SPZO s.r.o. S. 68–73.

## 8. Jména oponentů a názvy jejich organizací

RNDr. Jan Juroch

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení metod monitoringu a prognóz výskytu ŠO

Doc. Dr. Ing. Jaroslav Salava

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.

## 9. Dedikace

Metodika je výsledkem výzkumného projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum ministerstva zemědělství ČR – QK1710397 Charakterizace kompatibility vztahů mezi původci fomového černání stonku a odrůdami ozimé řepky jako základ pro zvýšení rentability pěstování této plodiny v ČR. Metodika obsahuje také výsledky získané v rámci institucionální podpory Mze RO1818.

Publikaci bylo Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským uděleno osvědčení č. **UKZUZ 226584/2021** o uznání uplatněné certifikované metodiky v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“.