



## METODIKA PRO PRAXI

**HODNOCENÍ NÁCHYLNOSTI  
EVROPSKÝCH A ASIJSKÝCH GENOTYPŮ HRUŠNĚ  
k původci bakteriální spály, bakterii *Erwinia amylovora*,  
v podmínkách technického izolátoru**

Kolektiv autorů  
UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**2023**

ROSTLINOLÉKAŘSKÁ BAKTERIOLOGIE  
VÝZKUMNÝ ÚSTAV ROSTLINNÉ VÝROBY, v. v. i.

## KOLEKTIV AUTORŮ

Ing. Václav Krejzar, Ph.D., Ing. Iveta Pánková, Ph.D.,  
Ing. Radka Krejzarová, Ph.D.  
*Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.*

## DEDIKACE

*Metodika je plánovaným výstupem projektu NAZV QK1910137 „Využití nových ovocných druhů pro dlouhodobé udržení produkčního potenciálu ovocných výsadeb v podmínkách měnícího se klimatu “ a vznikla s podporou Ministerstva zemědělství ČR v rámci řešení institucionálního projektu č. RO0418, Etapy č. 21: „Zvýšení účinnosti regulace fytopatogenních prokaryot“ a institucionální podpory MZE-RO0423.*

Metodika je určena pro množitele a produkční pěstitele genotypů hrušní, pro orgány státní správy – Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Ministerstvo zemědělství ČR, Odbor zemědělských komodit.

Publikaci bylo Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským uděleno osvědčení UKZUZ 025079/2023 o uznání uplatněné certifikované metodiky v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837“.

## OPONENTI

Prof. Ing. Radovan Pokorný, Ph.D. - *Mendelova univerzita v Brně*  
Ing. Kristýna Pavelková – *Oddělení diagnostiky škodlivých organismů rostlin,  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský*

Vydal: ROSTLINOLÉKAŘSKÁ BAKTERIOLOGIE  
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.  
Drnovská 507, CZ-161 06 Praha 6 - Ruzyně



© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Praha, 2023  
ISBN 978-80-7427-388-9

*Tato publikace nesmí být přetiskována vcelku nebo po částech, uchovávána v médiích, přenášena nebo uváděna do oběhu pomocí elektronických, mechanických, fotografických či jiných prostředků bez výslovného svolení Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v. v. i.*

## OBSAH

Úvod .....	5
<b>1. UVEDENÍ DO PROBLEMATIKY .....</b>	<b>6</b>
1.1. Bakteriální spála jabloňovitých – příznaky .....	7
1.2. Charakteristika původce bakteriální spály jabloňovitých, bakterie <i>Erwinia amylovora</i> a jeho životní cyklus .....	11
1.3. Faktory virulence bakterie <i>Erwinia amylovora</i> .....	14
1.4. Detekce bakterie <i>Erwinia amylovora</i> .....	14
1.5. Determinace a charakterizace kmenů bakterie <i>Erwinia amylovora</i> .....	15
1.6. Faktory ovlivňující iniciaci a průběh bakteriální spály .....	17
1.7. Hostitelské spektrum patogenu – spektrum komerčně dostupných genotypů hrušně .....	18
1.8. Možnosti ochrany .....	18
1.8.1. Předpovědní modely .....	24
1.8.2. Možnosti chemické a nechemické ochrany .....	25
1.8.3. Šlechtění na rezistenci .....	27
1.9. Náchylnost/rezistence hrušní k bakteriální spále jabloňovitých .....	33
<b>2. CÍL METODIKY .....</b>	<b>34</b>
<b>3. VLASTNÍ POPIS METODIKY .....</b>	<b>35</b>
3.1. Spektrum metod pro testování náchylnosti/rezistence genotypů hrušní vůči bakterii <i>Erwinia amylovora</i> .....	35
3.2. Bakteriální kmeny patogenu a příprava inokula .....	35
3.3. Rostlinný materiál .....	36
3.3.1. Detašované výhony .....	36
3.3.2. Kontejnerované stromky .....	36
3.4. Hodnocení náchylnosti genotypů hrušně vůči <i>Erwinia amylovora</i> .....	37
3.4.1. Orientační hodnocení náchylnosti genotypů hrušně vůči <i>Erwinia amylovora</i> na detašovaných výhonech (DSS) .....	37
3.4.2. Hodnocení náchylnosti genotypů hrušně vůči <i>Erwinia amylovora</i> na terminálních výhonech kontejnerovaných stromků (SS) .....	37
3.4.3. Hodnocení náchylnosti genotypů hrušně vůči <i>Erwinia amylovora</i> na květech kontejnerovaných stromků (BS) .....	38
<b>4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ .....</b>	<b>39</b>
<b>5. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY .....</b>	<b>40</b>
<b>6. EKONOMICKÉ ASPEKTY .....</b>	<b>40</b>
<b>7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>41</b>

<b>8. SEZNAM SOUVISEJÍCÍCH PUBLIKOVANÝCH ČLÁNKŮ .....</b>	<b>45</b>
<b>9. SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>46</b>
<b>10. OBRAZOVÁ ČÁST .....</b>	<b>46</b>

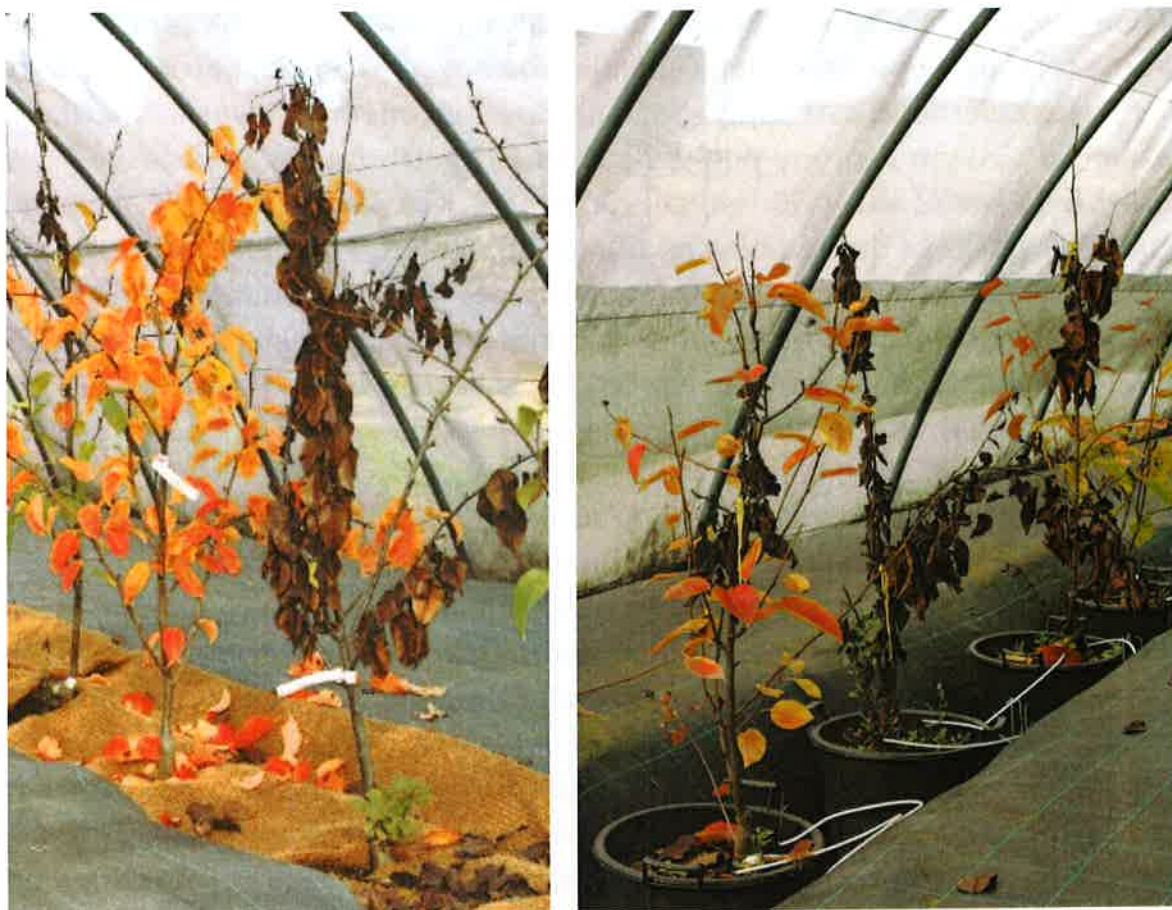


Obr. 1, 2: Genotyp asijské hrušně Nijiseiki v období kvetení.

# Hodnocení náchylnosti evropských a asijských genotypů hrušně k původci bakteriální spály, bakterii *Erwinia amylovora*, v podmínkách technického izolátoru

## ÚVOD

Metodika popisuje optimalizovaný postup stanovení hladiny náchylnosti/rezistence genotypů hrušní (obr. 1, 2) vůči původci bakteriální spály jabloňovitých (syn.: růžovitých), bakterii *Erwinia amylovora*. Metodika přistupuje k jejímu stanovení komplexně s cílem dosáhnout relevantních výsledků pro zemědělskou praxi. Jednotlivé metody testování popisují pouze určitý aspekt náchylnosti/rezistence testovaných genotypů vůči patogenu, náchylnost detašovaných květů, nezralých plodů a výhonů, či spálu květů nebo výhonů na stromcích ve velkoobjemových kontejnerech. Vzhledem k riziku přenosu bakterie na další vnímavé rostliny se testování provádí převážně v laboratorních a skleníkových podmínkách, které umožňují optimalizaci teplotních a vlhkostních parametrů ve prospěch rozvoje choroby.



Obr. 3, 4: Odumírající stromky hrušně po umělé infekci bakterií *Erwinia amylovora* na konci vegetační sezóny.

Nutnost komplexního přístupu k hodnocení hladiny náchylnosti/rezistence vyplývá z charakteristiky patogenu a choroby, kterou způsobuje. Patogen infikuje v různém pořadí prakticky všechny části rostliny. Rychlost šíření bakterie a tvorba viditelných příznaků choroby je ovlivněna komplexem vnějších podmínek, vitalitou stromu a náchylností/rezistencí rostlin různých genotypů (obr. 3, 4). Významným faktorem pro získání objektivních výsledků je proto četnost a celková doba hodnocení náchylnosti/rezistence genotypů. Regulace bakteriálního patogenu *Erwinia amylovora* je stále obtížnější vzhledem k aktuálním možnostem ochrany, spektru pěstovaných genotypů a agresivitě choroby. Výběr a pěstování rezistentních odrůd je neekonomičtější ochranným opatřením proti původci bakteriální spály jabloňovitých, bakterii *Erwinia amylovora*.

## 1. UVEDENÍ DO PROBLEMATIKY

*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. (v textu dále *Ea*) je polyfágní bakterie, která je původcem bakteriální spály jabloňovitých. Způsobuje velké ekonomické ztráty v produkčních sadech jaderovin po celém světě. Vedle jabloní a hrušní postihuje destruktivní choroba spektrum více než 130 dalších druhů rostlin spadajících převážně do čeledi *Rosaceae* (Van der Zwet and Keil, 1979). Choroba je hlavní globální hrozbou pro komerční produkci jablek a hrušek po celém světě. Kromě toho byly popsány kmeny infikující rostliny rodu *Rubus*, patřící do podčeledi *Rosoideae*, zahrnující ostružiník a maliník. *Ea* je původem ze Severní Ameriky, první záznam o výskytu choroby pochází z roku 1780. Do Anglie a současně i severní Afriky byla zavlečena v 50. letech 20. století. K zavlečení bakterie na evropský kontinent došlo ve druhé polovině 60. let 20. století. Postupně byl výskyt hlášen z Holandska, Polska, Dánska. V 70. letech se začala infekce šířit ze severozápadního pobřeží Evropy směrem na jih, do vnitrozemí Německa, Belgie a Francie. V ČR byl první výskyt patogenu prokázán v roce 1986 v Praze a během dalších let se infekce rozšířila do celé ČR. *Ea* ohrožuje komerční výsadby jabloně a hrušně i v Severní Americe, Austrálii, Jižní Koreji a Japonsku.

Bakterie *Ea* je v současnosti na většině území Evropské unie (EU) regulovaným nekaranténním škodlivým organizmem (RNŠO). Karanténním škodlivým organizmem (KŠO) zůstává pouze na plochách se šlechtitelskými a množiteltskými materiály hostitelských ovocných a okrasných druhů dřevin a rostlin. Státní rostlinolékařské správy provádí ve státech EU pravidelný vymezovací průzkum za účelem uznání nárazníkových zón v okolí lokalit produkce hostitelských rostlin *Ea* určených k pěstování na území chráněných zón. Výskyt *Ea* se dále zjišťuje v rámci soustavné rostlinolékařské kontroly v ovocných a okrasných školkách a v jejich okolí. Pokud dojde k záchytu *Ea* na hostitelských rostlinách určených k produkci ovoce nebo množiteltského materiálu, nařizují se opatření vedoucí k eradikaci patogenu nebo k zabránění jeho šíření.

V četnosti publikovaných vědeckých prací byla bakterie *Ea* zařazena mezi deset nejvýznamnějších rostlinných patogenů. Z omezeného počtu v současnosti dostupných možností ochrany se jako nejúčinnější jeví profylaktická aplikace antibiotik streptomycinu v produkčních sadech jabloně a hrušně nebo oxytetracyklinu v produkčních sadech hrušně během období kvetení. Z obav o veřejné zdraví a z nárůstu rezistence patogenu je aplikace antibiotik ve většině zemí Evropy zakázána. Jako relativně efektivní varianta k antibiotikům byla v těchto zemích v minulém období používána aplikace pouze anorganické a organické formy měďnatých sloučenin. V současnosti některé metody biologické kontroly patogenu nabízejí slibné alternativy, které povedou k minimalizaci nebo dokonce nahrazení používaných chemických přípravků, a tím i minimalizaci nebo odstranění výskytu rezistence vůči nim.

### 1.1. Bakteriální spála jabloňovitých – příznaky

Choroba se na rostlinách projevuje vadnutím a odumíráním květů (obr. 5), spálou listů (obr. 6) a plodů (obr. 7), usycháním a odumíráním vegetačních vrcholů na letorostech a výhonech, které se hákovitě ohýbají (obr. 8).



Obr. 5, 6, 7: Příznaky bakteriální spály jabloňovitých na květech, listech a plodech hrušně.

K infekci jsou nejnáchylnější orgány květu (obr. 10) a výhony v prodlužovací fázi růstu (obr. 9). Květy po infekci během 5-10 dnů hnědnou a černají. Za vhodných vnějších podmínek, tj. za dostatku živin a nepřítomnosti antagonistických kmenů bakterií v epifytu, se vytváří dostatečně velké inokulum *Ea*, které migruje do češule

(obr. 11, 12) a proniká do vnitřních pletiv vznikajících plůdků, případně stopek (Hinze et al., 2016).



Obr. 8: Hákovité ohýbání letorostu hrušně po infekci bakterií *Erwinia amylovora*.



Obr. 9: Infikované letorosty hrušně v prodlužovací fázi růstu.

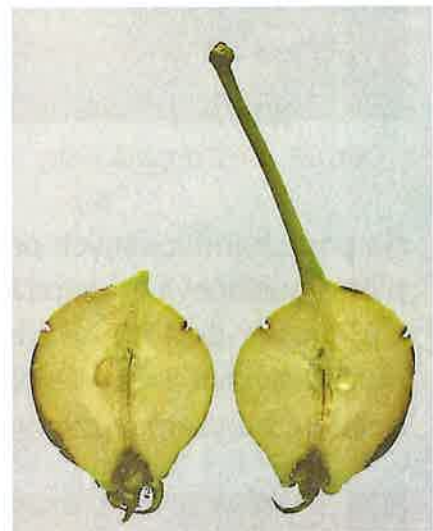


Obr. 10: Primární infekce bakterie *Erwinia amylovora* proniká do hostitelských rostlin přes bliznu pestíku z povrchově kontaminovaných květů, které v krátkém čase nekrotizují.

Podle rychlosti kolonizace se plůdky vůbec nevytvorí nebo po vytvoření zasychají a černají. V případě změny podmínek v neprospěch patogenu v době nasazování plodů zůstávají vyvíjející se plody trvale poškozené, malé, deformované a nedosahují plné zralosti (obr. 7, 11, 12). Pokud nejsou vhodné podmínky pro růst a množení *Ea* během kvetení, může epifytní část životního cyklu proběhnout pouze na povrchu listů, výhonů nebo plodů. Množení patogenu je v tomto případě pomalejší, jeho inokulum na povrchu nadzemních orgánů rostliny přežívá po kratší dobu a často bez příznaků (latentně). Podmínky nutné pro proniknutí (invazi) *Ea* do vnitřních pletiv orgánů rostliny nejsou zcela objasněny. Jako hraniční koncentrace inokula *Ea* nutná pro vznik infekce se obecně uvádí  $10^7$ - $10^8$  buněk/ml. Bakterie proniká do rostliny i přirozenými otvory nebo přes mechanická poškození.



Obr. 11: Při náhlé změně podmínek v neprospěch patogenu zůstávají vyvíjející se plody hrušně trvale poškozené a nedosahují plné zralosti.



Obr. 12: Inokulum *Erwinia amylovora* z epifytu migruje do češule a proniká do vnitřních pletiv vznikajících plůdků.

Patogen může proniknout do plodů i přes stopku z infikovaných brachyblastů nebo přes poranění. U vnímavých hostitelů bakterie proniká nejprve do intracelulárních dutin, kde se velikost inokula po určitou dobu asymptomaticky zvětšuje a postupně kolonizuje mezibuněčné prostory parenchymu. Následné poškozování vnitřních pletiv rostliny je počátkem endofytní části životního cyklu patogenu *Ea*. Bakterie pronikají do cévních svazků xylému a spolu s vodou a živinami jsou roznášeny do dalších částí rostliny (obr. 13, 14). Infikovaná pletiva černají, vypadají jako popálená ohněm.



Obr. 13, 14: Z orgánů květu se infekce šíří do listů a letorostů rostliny cévními svazky xylému.

Na povrch infikovaných orgánů mohou být za teplého a vlhkého počasí z vnitřních pletiv vytlačovány kapičky bakteriálního slizu (obr. 20), který bývá smýván a přenášen deštěm na zdravé orgány a okolní rostliny. Koncentrované inokulum může zasychat a vytvářet vlákna, tzv. vzdušné provazce (obr. 15), které jsou větrem, deštěm, hmyzem a ptactvem roznášeny na dlouhé vzdálenosti.



Obr. 15 a, b: Vzdušné provazce bakterie *Erwinia amylovora* na infikovaných rostlinách hrušně slouží k pasivnímu šíření patogenu na okolní rostliny.

V zúžených částech cévních svazků s menším objemem se *Ea* za příznivých podmínek počasí množí a následně brání průtoku xylémové tekutiny. Dle místa

průniku do cévních svazků bakterie vyvolávají různě závažné poruchy transportu živin a vody. První příznaky jsou obvykle patrné na vzrostných vrcholech převážně letorostů, které vadnou, ohýbají se, nekrotizují a černají (obr. 8, 9). Bakterie přes řapíky a centrální žilky pronikají do nejbližších listů. Řapíky, centrální žilky a později i čepele listů nekrotizují (obr. 16).

Dle stupně agresivity patogenu a průběhu počasí listy během několika dní částečně (obr. 6) nebo zcela nekrotizují a černají. Zčernalé listy zůstávají na stromech i po fyziologickém opadu listů. Rostoucí populace *Ea* v xylému postupně ucpává další větší cévy.

Na větvích a kmenech se vytvářejí zduřeniny, které praskají a nekrotizují. Do stromů následně mohou pronikat sekundární infekce, které stromy dále oslabují. Zastavení akropetálního transportu vody postupně vede k odumírání kosterních větví a později celých stromů (obr. 3, 4).



Obr. 16: Patogenem infikované centrální a postranní žilky na čepelích listů postupně nekrotizují.

## 1.2. Charakteristika původce bakteriální spály jabloňovitých, bakterie *Erwinia amylovora* a jeho životní cyklus

Bakterie *Ea* přežívá v období dormance v prasklinách nekrotických lézí na korových pletivech, v podkorových pletivech, v okolí jizev po opadu listů, ve velmi nízkých, nekultivovatelných koncentracích, přibližně do  $10^2$  cfu/ml (obr. 17). Přibližně z 10 % ložisek nebo nekrotických lézí na povrchu korových pletiv vznikají v jarním období aktivní spálová ložiska. Po obnovení akropetálního proudění vody a živin v předjaří a s pomalu rostoucími teplotami koncentrace přežívajícího inokula *Ea* velmi pozvolna narůstá a pohybuje se na hranici kultivovatelnosti bakterie, tj. do koncentrace  $10^2$ - $10^3$  cfu/ml. Bakterie se množí v rozmezí 5-37 °C. K prudkému, exponenciálnímu nárůstu inokula dochází po dosažení optimálních kombinací teplotních a vlhkostních parametrů, tj. zpravidla po dosažení vnější teploty nad 15-18 °C po dobu 4-5 dnů a ovlhčení listů nad 70-90 % po dobu několika hodin. Při teplotě 8 °C se velikost inokula zdvojnásobí za 14 h, při teplotě 18 °C již za 2,1 h (Shwartz et al., 2003).

Bakterie se množí nejintenzivněji do teploty 30 °C. Při teplotě 28 °C se velikost inokula zdvojnásobí za 1,3 h. Při teplotě nad 36 °C velikost inokula *Ea* stagnuje, bakteriální buňky odumírají a přežívají jako většina nesporulujících bakterií v nekultivovatelné velikosti inokula na místech chráněných před přímým slunečním zářením. Teplota je nejvýznamnějším faktorem pro množení patogenu, po iniciaci choroby její význam klesá. Vyšší relativní vlhkost vzduchu je relativně méně významná. Pro iniciaci choroby zpravidla postačuje, když po teplé suché periodě nastane intenzivní déšť a několik po dešti následujících hodin přetrvávají podmínky vysoké relativní vlhkosti vzduchu nad hodnotou 70 %. Přítomnost volné vody na povrchu pletiv je důležitou podmínkou pro založení populace *Ea* a pro pronikání jejího inokula do intracelulárních prostor, tedy pro přechod patogenu z epifytní fáze životního cyklu do endofytní (patogenní) fáze. V endofytní fázi životního cyklu se bakterie množí při optimální teplotě a nízké relativní vlhkosti 20-30 %, za těchto podmínek ale nedochází k propuknutí infekce. K iniciaci choroby rovněž nedochází při vysoké relativní vlhkosti nad 80 % a nízké teplotě pod 15 °C.



Obr. 17: Nekrotická léze na povrchu korového pletiva hrušně způsobená bakterií *Erwinia amylovora*.

Za nepříznivé kombinace teplotních a vlhkostních podmínek je *Ea* schopna pouze přežít v nekrotických lézích a na povrchu rostliny v prakticky nekultivovatelné koncentraci po celou vegetační sezónu a nedochází k iniciaci choroby. Nepříznivé podmínky pro rozvoj infekce nastaly v poslední dekádě v jarním období s vysokými teplotami a ojedinělými srážkami. Množení bakterií je nepřímo ovlivněno množstvím dostupných živin, stářím stromu, jeho fenologickou fází a hladinou rezistence vůči *Ea*. Vzhledem k podmínkám nezbytným pro množení inokula *Ea* jsou

z nadzemních orgánů stromu nejvíce ohroženy květy a výhony v prodlužovací fázi růstu v průběhu jara a na začátku léta.

V epifytní části životního cyklu *Ea* nejprve kolonizuje blizny květů. V jednotlivých květech se může množit po dobu 5-6 dnů. Z vnitřních částí květů je vylučován nektar, z blizny a tyčinek exsudáty pro lákání hmyzích opylovačů a následně iniciaci klíčení pylových zrn. Tyto sekrety jsou bohaté na cukry, aminokyseliny, polysacharidy a glykoproteiny, které jsou zároveň jedinečným zdrojem živin nejen pro *Ea*, ale i pro další mikroorganismy. V orgánech květu je nejvíce mikroorganismů na povrchu blizny, jejich spektrum je podle některých studií shodné na různých lokalitách. Ve spektru mikroorganismů se nacházejí především zástupci čeledí *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonadaceae* (Steven et al., 2018).

V závislosti na průběhu počasí a vyzrávání výhonů, tj. přibližně od poloviny července, riziko potenciálního exponenciálního nárůstu koncentrace inokula patogenu klesá. Vyzráváním listů klesá i množství dostupných živin na jejich povrchu. Optimální teplota a vysoká relativní vlhkost na konci vegetace mají zásadní vliv na velikost přezimujícího inokula *Ea*. Klesající teploty, nedostatek živin a dalších sekundárních metabolitů jsou signálem pro přesun bakterií *Ea* do podkorových pletiv. Čím větší populace bakterií se do podkorových pletiv přesune, tím větší bude riziko propuknutí bakteriální spály v jarních měsících.

Po umělé inokulaci květů *Ea* nejprve dochází k mírnému poklesu velikosti inokula. Po jeho stabilizaci následně dochází k jeho postupnému zvětšování a 4. den po inokulaci dosahuje koncentrace patogenu u 90 % květů hodnoty  $10^5$ - $10^7$  buněk/ml. Přítomná *Ea* ovlivňuje spektrum přítomných mikroorganismů jen částečně nebo vůbec. Složení přítomného mikrobiomu se v čase mění se stárnutím květů (Shade et al., 2013; Cui et al., 2021). Největší četností jsou zastoupeny kmeny *Proteobacteria* (96,8-100 %), *Actinobacteria* (0-0,5 %), *Cyanobacteria* (0-1,6 %) a skupina *Firmicutes* (0-1,5 %). V rané fázi kvetení dochází ke kontaminaci povrchu orgánů květu širokým spektrem entit kmene *Proteobacteria* prostřednictvím větru, deště a hmyzu. V rámci kmene *Proteobacteria* převažují čeledi *Moraxellaceae*, *Xanthomonadaceae* a *Burkholderiaceae*. V následujícím období diverzita mikrobiomu v květech klesá a postupně začínají převládat čeledi *Pseudomonadaceae* a/nebo *Enterobacteriaceae*, které později tvoří až 80 % mikrobiomu květů (Pusey et al., 2009). Příznaky spály květů se však projeví jen u necelé poloviny inokulovaných květů. To v praxi znamená, že údaje o koncentraci a četnosti patogenu *Ea* nejsou vhodnými údaji pro předpověď výskytu choroby (Thomson, 1986). Průběh choroby je ovlivněn komplexem faktorů, optimální mikroklima, přítomnost bakteriálních antagonistů, kvasinek, citlivost hostitelského systému, který snímá signály pro detekci vysoké hustoty bakterií (Medzhitov et al., 2012).

### 1.3. Faktory virulence bakterie *Erwinia amylovora*

Klíčovými faktory virulence bakterie *Ea* jsou tzv. *hrp* geny, zodpovědné za regulaci, produkci a sekreci řady specifických proteinů. Gen *hrpL* nese genetickou informaci o specifickém sekrečním systému typu III (T3SS) a geny *hrpN* a *hrpW* o sekrečním systému T3E. Přes tento sekreční systém je syntetizován harpin, který proniká buněčnými stěnami rostlinných buněk a je zodpovědný za vyvolání hypersenzitivní reakce na nehostitelských rostlinách a patogenní reakce na hostitelských rostlinách. Mezi klíčové faktory virulence patří geny ze skupiny *eps* (Narayanasamy and Uthandi, 2021), gen *amsG* z operonu, který nese genetickou informaci pro syntézu a sekreci exopolysacharidového polymeru amylovoranu (EPS; Denny, 1995; Milling et al., 2011).

Působení dalších faktorů virulence, např. *dspEF*, má stejný cíl, vyvolání rychlé změny v metabolismu infikované rostlinné buňky, která vede k její buněčné smrti. Změny metabolismu *Ea* dosahuje poskytnutím komplementárních genů ke genům rezistence, přítomným v rostlinné buňce.

K úspěšnému vyvolání infekce *Ea* využívá komplexní regulační síť, která snímá relevantní environmentální signály a koordinuje expresi faktorů virulence v raném a pozdním stádiu infekce přes bis-(3'-5') - cyklické di-GMP (c-di-GMP) a quorum sensing. K vysoké virulenci *Ea* přispívá i sekrece sideroforu deferoxaminu, který je nezbytný pro vytváření struktur biofilmu a pro mobilitu buněk *Ea*.

### 1.4. Detekce bakterie *Erwinia amylovora*

Druh *Ea* je v porovnání s dalšími druhy fytopatogenních bakterií relativně homogenní, a proto je i jeho detekce v extraktech z homogenizovaných symptomatických pletiv nebo zkoncentrovaných povrchových smyvech poměrně spolehlivá. Pro přípravu extraktu se po povrchové dezinfekci odebírá přibližně 1-3 g pletiva. Detekce je nejspolehlivější v místě přechodu mezi nekrotickým a zdravým pletivem, kde se nachází aktivní inokulum patogenu. Smyv i macerace se provádí ve sterilní vodě, sterilním fyziologickém roztoku nebo sterilním PBS pufru dle zvolené následné detekční metody.

Extrakty a koncentráty lze přímo nanášet na semiselektivní média (například MM2Cu agar, Bereswill et al., 1998). Přítomnost patogenu v symptomatických rostlinných pletivech lze stanovit spolehlivě imunoenzymatickými metodami ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), IFA (Immunofluorescence Assay) nebo LFIA (Lateral flow immunochromatographic assay; Tominaga a Ishii, 2020).

DAS ELISA (double sandwich), využívá vazby patogenu (antigenu) na komerčně dostupné polyklonální nebo monoklonální protilátky specifické pro *Ea*. Přidáním substrátu dochází v přítomnosti komplexu antigen *Ea* a specifická protilátka k barevné změně, která je detekována spektrofotometricky. Intenzita zabarvení a hodnota absorbance roste s koncentrací patogenu v extraktu. S většinou

komerčně nabízených kitů lze bezpečně stanovit patogen *Ea* při koncentraci  $10^4$  buněk/ml a vyšší. Na obdobném principu je založena metoda IFA. Vytvořený komplex antigen - fluorescenčně značená protilátka je detekován mikroskopicky. Koncentrace přítomného patogenu je stanovena podle počtu fluoreskujících buněk, které mají tvar tyčinek v určitém počtu zorných polí. Citlivost této metody je vyšší než u ELISA,  $5 \times 10^3$ - $10^4$  buněk/ml. Citlivější nebo srovnatelně citlivé jsou molekulárně genetické metody. Přítomnost *Ea* v extraktech je po úpravě vzorku dle zvolených specifických primerů detekována metodami PCR (Polymerase Chain Reaction). Primery vytvořené podle nukleotidové sekvence plazmidu pEA29, P29TF/P29TR detekují *Ea* do koncentrace  $\geq 10^3$  cfu/ml (s Taqman sondou) a do koncentrace  $\geq 10^4$  cfu/ml s využitím fluorescenčního barviva např. Sybr Green). Primery vytvořené podle nukleotidové sekvence chromozomální DNA (Pirc et al., 2009; Gottsberger, 2010) detekují *Ea* do obdobných koncentrací. Pro detekci patogenu metodami PCR jsou komerčně dostupné řady komplexních kitů, včetně optimalizovaných protokolů a specifických primerů. Citlivost většiny kitů se reálně pohybuje mezi  $10^2$ - $10^3$  cfu/ml (Norgen Biotek Corporation, Canada; Loewe Biochemica GmbH, Germany; Qualiplante SAS, France; BIOREBA AG, Switzerland). Pozitivní výsledek detekce by měl být potvrzen izolací a determinací kmene *Ea* a stanovením jeho patogenity.

### 1.5. Determinace a charakterizace kmenů bakterie *Erwinia amylovora*

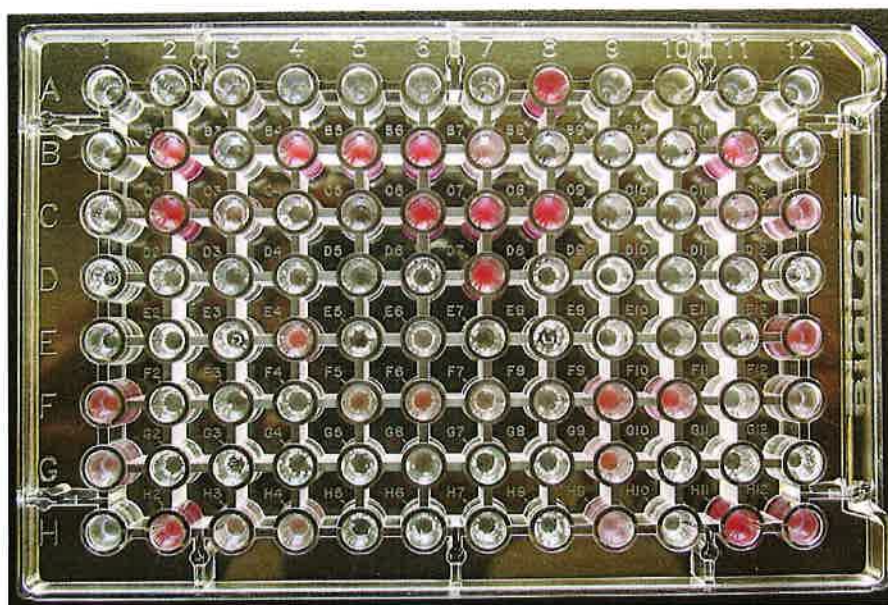
Patogen *Ea* je snadno kultivovatelný na běžných živných médiích pro bakterie, například na masopeptonovém agaru. Bakterie vytváří během 24-48 h v širokém rozmezí teplot charakteristické, snadno identifikovatelné, čistě bílé lesklé kolonie (obr. 18 a, b).



Obr. 18 a, b: Kolonie bakterie *Erwinia amylovora* na živném médiu.

Izolované kmeny mohou být determinovány a charakterizovány biochemickými (Biolog GEN III, API 20 E and API 50 CH strips; *Erwinia amylovora*. EPPO Bulletin

2004) (obr. 19), chemickými (FAME, van der Zwet et al., 2012; MALDI-TOF, EPPO Bulletin. 52, 2022) nebo genetickými metodami (PCR – konvenční, real-time (Salm and Geider, 2004), LAMP, DNA sekvenace; EPPO Bulletin. 52, 2022).



Obr. 19: Metabolický profil bakterie *Erwinia amylovora* na mikrodestičce Biolog GEN III.

*Ea* byla obecně považována za genotypicky a geneticky homogenní druh, kmeny při sekvenci genomové DNA vykazovaly podobnost nad 99,5 % a zároveň dostatečně velký rozdíl od dalšího patogenu asijských hrušní a *Rubus* spp., bakterie *Erwinia pyrifoliae*, který vyvolává tvorbu obdobných příznaků jako *Ea* (Rhim et al., 1999). Pozdější analýzy genomu *Ea* prokázaly, že vysoce konzervovaná je pouze chromozomální genetická informace, plazmidy jsou naopak zdrojem genomové diverzity (Sing and Khan, 2019). V současnosti je známo několik plazmidů pEA29, pEA68 izolovaných pouze v Evropě z rostlin jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia* L.) (Ismail et al., 2014), pEA72 a pEA78 izolovaných v severní Americe. Výsledky aktuálních studií rozšířily znalosti o genetické diverzitě v *Ea*, pravděpodobně díky zařazení nových kmenů z různých hostitelských rostlin a různých geografických oblastí. Rozdílné charakteristiky kmenů byly prokázány metodami Southern Hybridization (Rhim et al., 1999), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism analysis, Barionovi et al., 2006) MLVA (Multi-Locus Variable number of tandem repeats, Nas et al., 2016) a CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; Rezzonico et al., 2011; Bühlmann et al., 2014; Mendes et al., 2021). Zjištěné rozdíly v charakteristice kmenů se projevují rozdílnou patogenitou kmenů *Ea* a vedou k rozdílným ekonomickým dopadům.

Virulence kmenů je stanovována biologickým testem patogenity. Přestože Mendes et al. (2021) prokázali přítomnost klíčových faktorů virulence, jmenovitě hrpL (T3SS), hrpN (T3E) a amsG z operonu biosyntézy amylovoranu ve všech

studovaných izolátů *Ea*, následné testy patogenity na plátcích nezralých hrušek rozlišily čtyři úrovně virulence ve skupině testovaných izolátů. Patogenitu izolátů *Ea* lze ověřit i vpichem suspenze *Ea* do celých nezralých plodů hrušně *Pyrus communis* odrůdy Konference (BBCH 70-71; Moragrega et al., 2003). V případě pozitivního výsledku se kolem místa vpichu během 5 dnů tvoří zřetelná nekrotická léze. Orientačně lze ověřit přítomnost *hrp* genů u izolátů *Ea* v testu hypersenzitivity na listech tabáku *Nicotiana tabacum* L. (Baker et al., 1993).

### 1.6. Faktory ovlivňující iniciaci a průběh bakteriální spály

Nejvýznamnějším faktorem, který ovlivňuje výskyt a závažnost infekce původcem bakteriální spály jabloňovitých v produkčních sadech, je hladina rezistence/náchylnosti pěstovaného odrůdového sortimentu. Nebezpečí výskytu spály hrušně lze snížit výběrem tolerantních a rezistentních genotypů, vhodné jsou hybridy mezi evropskými a asijskými hrušněmi Moonglow, Kieffer, Seckel, Waite a Maxim.

Na druhém místě je zdravotní stav nové výsadby. Výsadba s převahou náchylných genotypů v jakkoli zhoršeném zdravotním stavu (mechanická poranění, nevhodné skladování před výsadbou, neprověřené podnožové nebo roubové materiály) je plýtváním lidské práce a finančních prostředků. V podmínkách aktuálního průběhu počasí v ČR je pravděpodobnost iniciace choroby u náchylných a oslabených výsadeb hrušně vysoká.

Mezi významné faktory ovlivňující výskyt choroby patří lokalita výsadby a agrotechnická praxe v sadu. Nevhodně zvolená lokalita, nerespektování fenologického vývoje ovocných stromů, nešetrně prováděné sadařské práce, stejně jako nesprávná nebo časově nevhodná aplikace pesticidních přípravků zvyšují riziko kumulace abiotických a biotických stresů, které dále snižují obranyschopnost stromů vůči chorobám a škůdcům. Nešetřená mechanická poranění způsobená výchovným nebo udržovacím řezem zvyšují riziko průniku řady patogenních agens a škůdců. V teplém a vlhkém jarním počasí je pro průnik inokula *Ea* a iniciaci choroby velmi riziková redukce násady květů a plodů. Nevhodná je jakákoli praxe, která podporuje nadměrný růst terminálů. Měkká pletiva letorostů jsou vhodná pro množení a šíření patogenu do dalších částí stromu. Nadměrné hnojení v dnešní ekonomické situaci většiny zemědělských podniků nehrozí. Zdravotní stav hrušně v konvenčních a integrovaných výsadbách ohrožuje především progresivní redukce povolených pesticidních přípravků. V poslední době není výjimkou stav, že proti danému škodlivému činiteli není aktuálně povolený žádný pesticidní přípravek. Problematická je ovšem i velmi častá aplikace nízkých koncentrací pesticidních přípravků nebo nevhodné načasování jejich aplikace, které významně poškozují prospěšnou epifytní mikroflóru a nedostatečně redukuje patogenní agens. Častá aplikace účinné látky mědi v nízké koncentraci vede k selekci a přežívání

rezistentních bakteriálních kmenů, které produkují tři druhy genů vedoucí ke ztrátě účinnosti měďnatých přípravků – geny pro syntézu sideroforů pro vyloučení mědi z buňky (Hesse et al., 2018); geny měnící permeabilitu membrány pro vstup mědi do buněk (Husseini and Akköprü, 2020); geny modifikující specifická vazebná místa pro měď v buňce (Yang et al., 2022). Důležitá je i včasná aplikace insekticidních přípravků proti významným hmyzím vektorům spály v sadu, jako jsou mery (*Cacopsylla* spp.), zejména *Mera skvrnitá* (*Cacopsylla pyri*), květopas jabloňový (*Anthonomus pomorum*), různé druhy mšic (mšice svízelová (*Dysaphis pyri*) mšice zelená (*Aphis pomi*) atd. Vliv průběhu počasí včetně jeho extrémních projevů lze pouze redukovat kombinací výše uvedených opatření.

### **1.7. Hostitelské spektrum patogenu – spektrum komerčně dostupných genotypů hrušně**

Nejvíce náchylnými hostiteli původce bakteriální spály jabloňovitých jsou ovocné a okrasné dřeviny z čeledi růžovitých (*Rosaceae*), jabloň (*Malus* spp.), hrušeň (*Pyrus* spp.), kdouloň (*Cydonia* spp.), mišpule (*Mespilus* spp.), jeřáb (*Sorbus* spp.), kdoulovec (*Chaenomeles* spp.), skalník (*Cotoneaster* spp.), hloh (*Crataegus* spp.), hlohyně (*Pyracantha* spp.), muchovník olšolistý (*Amelanchier alnifolia*), muchovník kanadský (*A. canadensis*), blýskavka Davidova (*Stranvaesia davidiana*). V ČR je nejvíce náchylným a hlavním zdrojem nákazy hloh. Z hlediska ekologického byly největší ztráty zaznamenány na solitérních stromech, remízkových porostech a intravilánových výsadbách hlohů, hlohyní a jeřábů. Na některých lokalitách ČR došlo prakticky k vymizení těchto druhů z přírodních ekosystémů.

Dnes je *Ea* rozšířena po celém území ČR. Z hlediska hospodářského jsou nejvíce ohroženy produkční výsadby jádovin, jabloně a hrušně. V seznamu doporučených odrůd hrušně k výsadbě byly v roce 2021 (SISPO): Alfa, Amfora, Bohemica, Boscova, Clappova, David, Dicolor, Elektra, Erika, Hortensia, Konference, Lucasova, Nojabrskaja, Radana, Uta, Williamsova.

### **1.8. Možnosti ochrany**

Při regulaci nežádoucích organismů je povinnost dodržovat zásady integrované ochrany rostlin (IPM). Upřednostňovány jsou mechanické metody ochrany - odřezání napadených částí, sběr, odchyt a sklepávání škůdců apod. Při nedostatečném účinku mechanických metod lze dřeviny ošetřit registrovanými přípravky na ochranu rostlin nebo dalšími prostředky (pomocné prostředky na ochranu rostlin a bioagens dle zákona č. 326/2004 Sb.), přičemž se preferují nechemické metody, zejména biologická ochrana. Komerčně atraktivní genotypy hrušně (*Pyrus communis* L.) jsou v podmínkách produkčních výsadeb v ČR středně náchylné až rezistentní vůči infekci *Ea*. Zcela rezistentní genotypy hrušně vůči *Ea* nejsou k dispozici, proto jsou pro kontrolu *Ea* účinné postupy IPM zásadní.

Preventivní opatření zahrnují výběr certifikovaného sadbového materiálu z ovocných školek pravidelně kontrolovaných ÚKZÚZ, pravidelné odstraňování výmladků vyrůstajících z podnože, odstraňování vysoce náchylných hostitelských rostlin, které mohou být trvalým zdrojem inokula *Ea*, do vzdálenosti 800 m od produkčních výsadeb (hlohy, plané hrušně a skalníky), výběr tolerantních až rezistentních odrůd vhodných pro danou lokalitu a pravidelné prohlídky zdravotního stavu stromů v sadu (2x týdně) a hostitelských rostlin v jeho okolí - hlohů, skalníků, hlohyní, jeřábů a kdouloní (1x týdně). Vlastní management v produkčních sadech na dané lokalitě, tj. správné načasování jednotlivých agrotechnických postupů, zejména ochrany proti chorobám a škůdcům i předpovědní modely, je založen na chronologickém vývoji hlavních růstových fází, tzv. fenologických růstových stádií stromu, která jsou popsána pomocí BBCH stupnice. Hlavní růstové fáze hrušně jsou: vývoj pupenů, listů a výhonů, tvorba květenství, kvetení, vývoj plodů, zralost plodů a stárnutí listů (Tabulka 1; Martínez-Nicolás et al., 2016).



Obr. 20: Zaschlý sliz bakterie *Erwinia amylovora* na genotypu asijské hrušně Nijiseiki.

Tabulka 1: Fenologická růstová stádia evropských a asijských genotypů hrušní

Hlavní (primární) růstové fáze		Další (sekundární) růstové fáze		Charakteristika další růstové fáze
0	vývoj pupenů	01	dormance	listové pupeny jsou uzavřené a pokryté nahnědlými šupinami
		03	nalévání listových pupenů	začátek bobtnání listových pupenů
		05	konec nalévání	mírně oddělené zelenohnědé šupiny listových pupenů
		07	začátek rašení	první zelené špičky listů jsou právě viditelné
		09	rašení	zelená špička listu asi 3 mm nad šupinami pupenů
1	vývoj listů	10	oddělení prvních listů	nahnědlé šupiny mírně otevřené; vycházející listy
		11	rozložené první listy	první celé zelené listy
		15	rozvinutí dalších listů	listy, nejsou v plné velikosti; patrné řapíky
		17	všechny listy rozvinuté	listy nejsou rozvinuté v plné velikosti
		19	konec rozvinutí listů	všechny listy jsou zcela rozvinuté a roztažené
3	vývoj výhonů	31	začátek růstu výhonů	viditelné osy vyvíjejících se výhonů; asi 10 % konečné délky
		32	růst výhonu	výhony dosahují asi 20 % konečné délky
		35	pokračující růst výhonu	výhony dosahují asi 50 % konečné délky
		39	konec růstu výhonu	výhony dosahují asi 90 % konečné délky
5	rozvoj květenství	51	nalévání květních pupenů	poupata zavřená, viditelné nazelenalé šupiny
		53	pučení poupat	viditelné zelené špičky kališních lístků obklopujících květy
		54	zelené poupě	kališní lístky viditelné, ale stále sjednocené
		56	otvírání poupěte	květy stále zavřené, kališní lístky se mírně začínají oddělovat

Hlavní (primární) růstové fáze		Další (sekundární) růstové fáze		Charakteristika další růstové fáze
5	rozvoj květenství	59	okvětní lístky	viditelné první okvětní lístky, květy s okvětními lístky tvořícími dutou kouli
6	kvetení	60	otevírání prvních květů	otevírají se první bílé květy
		61	začátek kvetení	otevřeno cca 10 % květů
		65	plné kvetení	50 % květů otevřených
		66	vadnutí květů	některé okvětní lístky jsou suché a padají
		69	konec kvetení	všechny okvětní lístky jsou suché nebo opadané
7	vývoj plodů	71	začátek růstu	začátek růstu plodů; zelené plůdky; okvětní lístky spadly
		72	růst plodů	plod při 20 % konečné velikosti
		74	zvětšování plodů	plod ve 40 % konečné velikosti
		75	poloviční velikost plodů	plod v 50 % konečné velikosti
		77	pokračování zvětšování plodů	plod v 70 % konečné velikosti
		79	ukončení zvětšování plodů	plod v 90 % konečné velikosti
8	zrání plodů	80	fyzilogická zralost	plody plně vyvinuté, dužnina sladká a žlutá
		81	začátek zrání	první výskyt genotypově specifické barvy
		85	pokročilé zrání	zvýšení intenzity odrůdově specifické barvy
		88	plná zralost	barva plodů plně vyvinutá; plody konzumně zralé, dužnina křupavá a sladká s typickou chutí a správnou pevností
		89	začátek stárnutí	ovoce začíná měknout
9	stárnutí a období odpočinku	91	dokončení růstu výhonů	vyvinutý terminální pupen; listy jsou stále zcela zelené
		93	začátek stárnutí listů	listy začínají padat
		95	padání listů	listy opadly z 50 %
		97	zimní odpočinek	všechny listy opadly

Tabulka 2: Předpovědní modely pro výskyt původce bakteriální spály jablonovitých, bakterie *Erwinia amylovora*.

Název modelu	Druh jaderovin	Vstupní proměnné			Příznaky choroby	Relevantní citace	Applikace
		Počasí	Výpočet	Významné faktory u hostitele			
Maryblyt	jabloň, hrušeň	denní minimální a maximální teplota, denní srážky, ovlhčení listů	počet dní a hodin	fenologická fáze, zejména kvetení, pupeny	spála květů, výhonů, korové nekrózy a poranění	Steiner, P. W. and G. W. Lightner. 1996. Maryblyt™ 4.3. A Predictive Program for Forecasting Fire Blight Disease in Apples and Pears. University of Maryland, College Park.	cca 40 států
"Cougarblight"	jabloň, hrušeň	denní minimální a maximální teplota, denní srážky, ovlhčení listů	hranice je stanovena podle součtu hodin při teplotě nad 2.4 °C s ohledem na další faktory	genotyp, stáří, vitalita, fenol. fáze, zejména kvetení	spála květů	Smith, T. J. 1993. A Predictive Model for Forecasting Fire Blight of Pear and Apple in Washington State. Acta Horticulturae 338:153-157.	USA Washington
Californian (van der Zwet) model	Evropské a Asijské genotypy hrušní	denní minimální a maximální teplota, vlhkost a srážky	suma teplot během periody s teplotou přes 7.4 °C s tabulkovým přepočtem podle vlhkosti	genotyp, fenol. fáze, zejména kvetení	spála květů	Thomson, S.V., Schroth, M.N., Moller, W.J., and Reil, W.O. 1982. A Forecasting Model for Fire Blight of Pear. Plant Disease 66:576-579.	USA California
Californian (Thomson) model	hrušeň	průměr maximální a minimální teploty během 24 h	odečet ze spojnice mezi teplotou 16.7 °C pro 1.3. a teplotou 14.4 °C pro 1.5.	genotyp, fenol. fáze, zejména kvetení	spála květů	Thomson, S.V., Schroth, M.N., Moller, W.J., and Reil, W.O. 1982. A Forecasting Model for Fire Blight of Pear. Plant Disease 66:576-579.	USA California
Billing	jabloň, hrušeň, další	denní minimální, maximální a průměrná teplota,	suma dní s teplotou nad teplotou 13 °C	rašení, kvetení, odkvétání, druhá násada	spála pupenů, květů a	Billing, E. 1996. BIS95, an Improved Approach to Fire	Anglie

	růžovité rostliny	srážky, mlha, vlhkost, bouřka, kroupy, nebo vítr (nad 15 ms <sup>-1</sup> ), mráz (pod -2 °C) mezi 7-9 h dopoledne		květů, růstová fáze výhonů, poškození pletiv mrazem nebo větrem	výhonů, příznaky spály na plodech a větvích	Blight Risk Assessment. Acta Horticulturae 411:121-126.	
Automatizovaný předpovědní model (Jacquart-Romon and Paulin)	jabloň, hrušeň	automatická meteorologická stanice – předpověď denní min., max. a průměrné teploty, výskyt srážek, bouřek (prudký vítr, silný déšť, kroupy), výskyt symptomů choroby na lokalitě	denní maximum a minimum, srážky pod/nad 2.5 mm	rašení, kvetení, odkvétání, druhá násada květů, růstová fáze výhonů (1.2. - 31.7.)	spála pupenů, květů a výhonů	Jacquart-Romon, C. and Paulin, J.P. 1991. A Computerized Warning System for Fire Blight Control. Agronomie 11: 511-519.	Francie
Timmermans	jabloň, hrušeň	teplota, srážky, rosa, náchylnost kultivaru, věk a vitalita stromů, přítomnost starších symptomů choroby	počet hodin s teplotou nad 18.3 °C	kvetení, růstová fáze výhonů a plodů	spála květů a výhonů	Timmermans, Y. 1990. A Warning System for Fire Blight on Pears in Belgium: Preliminary Model and Practical Prospects. Acta Horticulturae 273: 121-137.	Belgie
Mills	jabloň	maximální teplota, srážky, relativní vlhkost	teplota během kvetení nad 18.3 °C, současně prší nebo je velmi vysoká relativní vlhkost	kvetení	spála květů	Mills, W. D. 1955. Fire Blight Development on Apple in Western New York. Plant Disease Rep. 39:206-207.	USA California, Ohio, Virginia, Pennsylvania, Michigan, New York

### 1.8.1. Předpovědní modely

Vzhledem k hospodářským dopadům ve školkách a produkčních sadech jaderovin byly po celém světě vytvořeny předpovědní modely predikující riziko infekce bakterií *Ea*. Modely se liší počtem sledovaných faktorů a váhou, kterou jim přisuzují. Zásadními faktory jsou teplota a relativní vlhkost (Moltmann and Herr, 2010). Nejrozšířenějším předpovědním modelem pro oblasti s produkčními sady jaderovin ve středních zeměpisných šířkách je Maryblyt (Tabulka 2). Přes svou robustnost je neustále zpřesňován (Braun a Hildebrand, 2007). Ostatní modely jsou převážně lokální, upravené dle specifických podmínek ve školkařských a produkčních sadech jaderovin v dané oblasti. Jejich vyvídací schopnost pro vymezenou oblast je výrazně vyšší. Spolehlivost každého modelu na určité lokalitě musí být nejprve otestována minimálně po dvě vegetační období. Přesnost automatických předpovědních systémů roste s počtem dalších sledovaných parametrů (náchylnost genotypu, stáří porostu, způsob hospodaření atd.), počtem lokalit a vegetačních sezón, podle kterých byl validován. Příkladem jsou modely z lokalit s rozsáhlými výsadbami jabloní a hrušní v USA - Kalifornie, v okolí Velkých jezer. V ČR je pro předpověď prvního výskytu bakteriální spály jabloňovitých ve vegetační sezóně otestován a validován firmou AMET - sdružení Litschmann & Suchý model Cougarblight založený na rychlosti množení patogenu v závislosti na hodinových teplotách vzduchu, převyšujících 15 °C, ovlhčení listů a předchozím výskytu infekce na lokalitě (Litschmann a Rožnovský, 2011). Model řeší výskyt spály květů, které jsou k infekci nejnáchylnější a uvádí odděleně údaje pro jabloně a hrušně. Pro oblasti středních a severních Čech - Mělnicko, Litoměřicko, Slánsko - byl navržen model založený na sumě efektivních teplot. Riziko prvního výskytu spály je bez ohledu na fenologickou fázi jaderovin dosaženo, jestliže suma efektivních teplot od začátku kalendářního roku, do které se započítávají pouze dny s teplotou  $\geq 4,4$  °C (hraniční teplota pro začátek aktivity a množení *Ea*), dosáhne hodnoty 220 °C (Korba et al., 2016). Vzhledem k současnému průběhu počasí s extrémními lokálními výkyvy, například srážek doprovázených silným větrem nebo kroupami, nelze spoléhat pouze na předpovědní systémy. Poškození porostu a šíření patogenu na velké vzdálenosti během extrémních projevů počasí, případně další parametry, nejsou předpovědními modely, uvedenými v tabulce 2, zohledněny. V rámci větších podniků se mohou podmínky na jednotlivých lokalitách významně lišit. Rozdíly ve srážkových úhrnech, věkovém a odrůdovém složení sadů a aktuálním stupni jejich poškození ovlivňují nástup a závažnost spalové infekce na jednotlivých lokalitách. Plošná aplikace chemických nebo biologických bakteriostatických přípravků je nákladná a kontraproduktivní, zanechává reziduální stopu a poškozuje rhizosferní a fylosferní probiotická společenstva stromů. Údaje, které systémy poskytují, musí být korigovány obhlídkou v sadu a dlouholetými zkušenostmi pracovníků pečujících o sady.

### 1.8.2. Možnosti chemické a nechemické ochrany

Na základě vyhodnocení rizika výskytu bakteriální spály jsou nejčastěji a s nejvyšší účinností aplikovány měďnaté (Cu) přípravky na bázi účinné látky oxychloridu mědi. Aplikace je paradoxně nejméně efektivní v době největšího rizika iniciace choroby při postřiku na květy vzhledem k jejich členitému povrchu. Většina dostupných přípravků je aplikována preemergentně v koncentraci 0,2 %, ve školkách při vysokém infekčním tlaku a odlistění až do koncentrace 0,4 %. Podle doporučení předpovědních modelů je aplikace přípravků prováděna maximálně do fenologické fáze 72 - tj. do fáze tvorby plodů o velikosti lískového oříšku. V nevhodné fenologické fázi a za nepříznivého počasí způsobuje aplikace přípravků rzivost listů a plodů. Účinnost přípravků lze zvýšit i jejich aplikací ve směsi. Ve směsi např. s železem a některými fungicidy nebo aditivy (např. 2-aminoimidazol) se zvyšuje prostupnost Cu do buněk. Aplikace ve směsi podle dostupné literatury snižuje riziko aktivace genů odpovědných za změny vedoucí ke vzniku rezistence vůči Cu (Worthington et al., 2012; Fayette et al., 2012). Seznam aktuálně povolených přípravků do množitelských a produkčních porostů jádovin je dostupný na webovém portálu Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ; Přípravky na ochranu rostlin (ÚKZÚZ) (eagri.cz)). Seznam povolených chemických prostředků je neustále redukován a možnosti jejich aplikace jsou omezovány. Cílem je dosažení bezreziduální produkce ovoce a nulové ekologické stopy. V blízké budoucnosti se jako nejperspektivnější jeví aplikace Cu ve formě nanočástic, které se lépe penetrují do buňky. Mají velký povrch vzhledem k objemu a tím mají větší antibakteriální účinnost než klasické přípravky s mikronovými částicemi sloučenin Cu. Důraz je kladen na pěstování tolerantních a rezistentních odrůd, využívání alternativních biologických přípravků na bázi rostlinných a mikrobiálních extraktů biologicky aktivních látek a aplikaci selektovaných kmenů antagonistických mikroorganismů. Například komerční biopesticid na bázi harpinu (Messenger™, USA) pouze indukuje rezistentní obranu reakci rostliny vůči patogenu. Testuje se aplikace řady pomocných rostlinných přípravků zvyšujících dostupnost živin z půdy a zvyšujících vitalitu a odolnost rostlin vůči biotickým a abiotickým stresům. Dále se testují přípravky obsahující směsi mikroelementů a hormonů v kombinaci s biologickými extrakty na bázi oligo nebo polysacharidů, např. chitosanu (Romanazzi et al., 2018), vitamínů (Boubakri et al., 2016) a mikroorganismů - řas (*Ascophyllum nodosum*), mykorrhizních hub a bakterií (*Azotobacter chroococcum*, *Bacillus mucilaginosus*). Nabízené spektrum přípravků se neustále rozšiřuje. Účinnost a dopad aplikace botanických nebo mikrobiálních pesticidů není znám, přípravky nepodléhají testování jako chemické přípravky. Účinnost biologických přípravků převážně nedosahuje účinnosti chemických přípravků. Biologická kontrola se zaměřuje především na potlačení fáze epifytického růstu a množení patogenu na květech před infekcí a endofytickým

růstem. Efektivita postřiku je více než u chemických přípravků ovlivněna správným načasováním a zvolenou koncentrací. Přípravky na bázi převážně antagonistických mikroorganismů nejčastěji obsahují bakterie z rodu *Bacillus subtilis* kmen QST 713 (Serenade ASO, Bayer AG, Německo), *Pantoea* (BlossomBless™, Nový Zéland, BlightBan C9-1™ a Bloomtime™, USA a Canada), *Pseudomonas* (*Pseudomonas graminis*; Mikiciński et al. 2016), *Stenotrophomonas*, *Streptomyces* a další, případně kvasinky *Aureobasidium pullulans* (BlossomProtect, Bio-Protect GmbH, Germany) a houby například *Pythium oligandrum* nebo pro patogeny specifické bakteriofágy. Společným znakem antagonistických bakteriálních, kvasinkových a houbových kmenů mikroorganismů je schopnost přežít na povrchu rostlin, konkurovat patogenům v soutěži o místo a živiny a/nebo vylučovat metabolity s bakteriostatickým nebo baktericidním účinkem vůči danému patogenu. Například druh *Pantoea agglomerans* produkuje antibiotika pantocin A a B, *Pantoea vagans* herbicilin O. Přípravky na bázi antagonistických bakterií jsou aplikovány preemergentně ve fázi kvetení. Cílem je zastavit množení patogenu v epifytní fázi životního cyklu, zabránit proniknutí infekce do rostliny a zahájení endofytní fáze životního cyklu. Každý antagonistický mikroorganismus má své specifické teplotní a vlhkostní požadavky na přežívání, růst a množení na povrchu listů. Aplikace mikroorganismů v období nevhodném pro jeho přežívání je neúčinná, aplikovaní antagonisté jsou vytlačeni jinými mikroorganismy nebo se množí velmi pomalu a nejsou schopni potlačovat růst patogenů. Z tohoto hlediska je vhodnější aplikace extrahovaných účinných látek produkovaných antagonistickými kmeny. Jejich aplikace má obdobná omezení jako aplikace chemických přípravků. S ohledem na požadavky, které by měly alternativní prostředky splňovat, především v účinnosti a udržitelnosti produkce vzhledem k příslušné agrotechnické praxi, stále chybí lepší pochopení mechanismu jejich působení a postupy jejich aplikace.

Žádný předpovědní systém rizika nenahradí pravidelné obhlídky výsadeb. Po odhalení ojedinělých aktivních ložisek původce bakteriální spály na stromech je třeba bezprostřední odřezání korových nekrotických částí minimálně do vzdálenosti 30 cm od léze směrem do zdravého dřeva. V případě výskytu ohniska v produkční výsadbě je nezbytné zasažené stromy odstranit a spálit a provést jednorázový plošný postřik měďnatým přípravkem na horní hranici doporučené koncentrace. Dalšímu šíření infekce je třeba předejít dezinfekcí náradí a obuvi a výměnou pracovního oblečení po sanaci stromů. V případě výskytu symptomů spály v produkční výsadbě nebo jejím okolí během vegetační sezóny je vhodné provést před opadem listů preventivní postřik chemickým nebo biologickým přípravkem za účelem redukce potenciálně přítomné *Ea*. Efektivní aplikací přípravku lze minimalizovat inokulum, které přežívá období dormance v podkorových pletivech a na jaře může za vhodných podmínek iniciovat bakteriální spálu květů. Po přechodu patogenu do vnitřních pletiv rostliny už nelze rozvoj infekce spálovou bakterií efektivně ovlivnit.

Další perspektiva napadeného stromu závisí na rezistenci genotypu vůči *Ea* a eliminaci dalších biotických a abiotických stresů.

### 1.8.3. Šlechtění na rezistenci

Výsadba rezistentních genotypů je nejlevnější a nejefektivnější způsob ochrany vůči *Ea*. V poslední dekádě byla vyšlechtěna řada genotypů hrušně s deklarovanou střední až vysokou hladinou rezistence vůči původci bakteriální spály jabloňovitých. Šlechtění na odolnost vůči bakterii *Ea* je ztíženo vertikálním charakterem rezistence, tedy rozdílnou vnímavostí jednotlivých genotypů vůči různým kmenům bakterie *Ea*. Skutečnou hladinu rezistence jednotlivých genotypů nelze proto zcela predikovat. Rezistence daného genotypu hrušně na dané lokalitě je ovlivněna klimatickými (teplota, vlhkost, četnost extrémních projevů počasí), ekosystémem, tj. absencí nebo přítomností dalších biotických (potenciální rezervoáry virulentních kmenů *Ea*) a abiotických stresových faktorů (okolní prostředí) a systémem hospodaření a ochrany v produkčních výsadách. Vzhledem k charakteru rezistence je vhodnější vysazovat odrůdy vyšlechtěné nebo alespoň otestované v obdobných klimatických podmínkách jako je lokalita výsadby. I pro podmínky ČR jsou aktuálně k dispozici odrůdy s deklarovanou střední až vysokou rezistencí vůči *Ea* (Tabulka 3). Systematické testování náchylnosti vůči *Ea* neprobíhá.



Obr. 21, 22: Průběh infekce původcem bakteriální spály na genotypech asijských hrušní Kosui a Chojuro v průběhu vegetační sezóny.

Tabulka 3: Výběr genotypů hrušní dostupných v České republice a jejich náchylnost vůči původci bakteriální spály jablonořivých, bakterii *Erwinia amylovora*.

Genotyp hrušně	Kategorie	Hodnocení náchylnosti (Le Lezec et al., 1997)	Třída náchylnosti (Le Lezec et al., 1997)	Zdroj údajů*	Původ
Alfa - R	evropská	velmi málo náchylná/rezistentní	1	Ludvík et al., 2011	ŠŠ Těchobuzice
Amanliská	stará evropská	netestováno	/	<a href="http://www.plantsdata.com">www.plantsdata.com</a>	stará podzemní odrůda původem z Francie, 18. století, odolává chorobám
Amfora - R	evropská	vysoce náchylná	4	Ludvík et al., 2011	ŠŠ Těchobuzice
Ananaska česká	lokální česká	velmi vysoce náchylná	5	Pánková et al., 2022	stará česká letní odrůda hrušně
Armida	hybrid	středně náchylná	3	VŠÚO Holovousy	VŠÚO Holovousy s.r.o.
Avranšská	stará evropská	netestováno	/	<a href="http://www.stareodrudy.org">www.stareodrudy.org</a>	stará odrůda původem z Francie, druhá polovina 18. století
Beta - R	evropská	středně náchylná	3	Korba et al., 2013	VŠÚO Holovousy s.r.o., ŠŠ Těchobuzice
Blanka	evropská	středně náchylná	3	Korba et al., 2013	ŠŠ Těchobuzice
Bodra	evropská	netestováno	/	<a href="http://www.sempra.cz">www.sempra.cz</a>	VŠÚO Holovousy s.r.o., ŠŠ Těchobuzice
Bohemica - R	stará evropská	velmi málo náchylná/rezistentní	1	Korba et al., 2013	ŠŠ Těchobuzice
Boskova lahvice	stará evropská	vysoce náchylná	4	Nečas a Krška 2006	stará podzemní odrůda původem z Francie, 18. století, odolává chorobám
Clappova	stará evropská	středně náchylná	3	Pánková et al., 2022	stará odrůda původem z USA, druhá polovina 19. století.
Červencová	stará evropská	netestováno	/	<a href="http://www.stareodrudy.org">www.stareodrudy.org</a>	stará odrůda původem z Francie, druhá polovina 18. století
David	evropská	středně náchylná	3	Ludvík et al., 2011	VŠÚO Holovousy s.r.o.

Decora	evropská	středně náchylná	3	Korba et al., 2013	ŠS Těchobuzice
Delta - R	evropská	středně náchylná	3	Korba et al., 2013	VŠÚO Holovousy s.r.o., ŠS Těchobuzice
Denisa	evropská	netestováno	/	<a href="http://www.sempr.cz">www.sempr.cz</a>	ŠS Těchobuzice
Diana	evropská	středně náchylná	3	Korba et al., 2013	ŠS Velehrad, ŠS Těchobuzice
Dicolor - R	evropská	vysoce náchylná	4	Ludvík et al., 2011	ŠS Těchobuzice
Dielova	stará evropská	netestováno	/	Koch 1967	stará odrůda původem z Belgie, začátek 19. století
Dita - R	evropská	středně náchylná	3	Korba et al., 2013	ŠS Těchobuzice
Elektra	evropská	velmi vysoce náchylná	5	Ludvík et al., 2011	VŠÚO Holovousy s.r.o.
Erika - R	evropská	velmi vysoce náchylná	5	Ludvík et al., 2011	ŠS Velehrad, ŠS Těchobuzice
Early Shu	asijská	velmi vysoce náchylná	5	Pánková et al., 2022	Japonsko
Esperenova máslovka	stará evropská	netestováno	/	<a href="http://www.platsdata.com">www.platsdata.com</a>	stará odrůda původem z Belgie, druhá polovina 18. století
Grosdemanche	stará evropská	málo náchylná/slabě rezistentní	2	Korba et al., 2013	stará odrůda původem z Francie, začátek 20. století (1905)
Guyotova	stará evropská	netestováno	/		stará odrůda z Francie, druhá polovina 19. století
Haeng Su	asijská	středně náchylná	3	Korba et al., 2013	Korea, <i>P. pyriformis</i> , Kikuchi x Joseng Henjang (1959 Japan)
Hájenka	lokální česká	velmi vysoce náchylná	5	Korba et al., 2014	lokální odrůda
Harbo	evropská	velmi vysoce náchylná	5	Korba et al., 2013	VŠÚO Holovousy s.r.o., ŠS Těchobuzice
Hardýho máslovka	stará evropská	velmi vysoce náchylná	5	Nečas a Krška 2006	stará odrůda původem z Francie
Harrow Sweet	hybrid	středně náchylná	3	Korba et al., 2013	Kanada, Ontario (1965)
Highland	evropská	středně náchylná	3	Korba et al., 2013	USA, New York (1944)

Genotyp hrušně	Kategorie	Hodnocení náchylnosti (Le Lezec et al., 1997)	Třída náchylnosti (Le Lezec et al., 1997)	Zdroj údajů*	Původ
Holenická	lokální česká	velmi vysoce náchylná	5	Korba et al., 2014	lokální odrůda
Hosui	japonská	středně náchylná	3	Pánková et al., 2022	Japonsko (1972)
Charneuská	evropská	netestováno	/		stará odrůda původem z Belgie, počátek 19. století
Chinese White (Nashi)	čínská	velmi málo náchylná/rezistentní	1	Pánková et al., 2022	Čína
Chojuro	japonská	málo náchylná/slabě rezistentní	2	Pánková et al., 2022	Japonsko (1889)
Isolda - R	evropská	netestováno	/	VŠÚO Holovousy	VŠÚO Holovousy s.r.o.
Jakubka česká	lokální česká	velmi vysoce náchylná	5	Korba et al., 2014	lokální odrůda
Jana - R	evropská	velmi vysoce náchylná	5	Korba et al., 2013	VŠÚO Holovousy s.r.o., ŠS Těchobuzice
Jizera	evropská	netestováno	/	VŠÚO Holovousy	VŠÚO Holovousy s.r.o., ŠS Těchobuzice
Karina	evropská	středně náchylná	3	Korba et al., 2013	ŠS Těchobuzice
Kiefer	hybrid	málo náchylná/slabě rezistentní	2	Pánková et al., 2022	USA, Philadelphia
Konference	evropská	velmi náchylná	4	Nečas a Krška 2006	stará odrůda původem z USA, druhá polovina 19. století
Konvert	evropská	netestováno	/	VŠÚO Holovousy	VŠÚO Holovousy s.r.o., ŠS Těchobuzice
Koporečka	lokální česká	slabě náchylná	2	Korba et al., 2014	lokální odrůda
Korean Giant	korejská	velmi málo náchylná/rezistentní	1	Warmund, 2022	Korea
Krvavka moravská	lokální česká	středně náchylná	3	Ludvík et al., 2011	lokální odrůda
Kosui	japonská	středně náchylná	3	Pánková et al., 2022	Japonsko (1959)

Kumoi	asijská	velmi vysoce náchylná	5	Korba et al., 2013	Japonsko (1955)
Laura - R	evropská	netestováno	/	VŠÚO Holovousy	VŠÚO Holovousy s.r.o., ŠS Těchobuzice
Libovická máslovka	lokální česká	velmi vysoce náchylná	5	Korba et al., 2014	lokální odrůda
Lucasova	evropská	vysoce náchylná	4	Nečas a Krška 2006	stará odrůda původem z Francie, druhá polovina 18. století
Luna	evropská	velmi vysoce náchylná	5	Korba et al., 2013	ŠS Těchobuzice
Nashi	čínská	málo náchylná/slabě rezistentní	2	Pánková et al., 2022	Čína
Man Sun Gill	japonská	velmi vysoce náchylná	5	Pánková et al., 2022	Japonsko (1939)
Milada	evropská	netestováno	/	VŠÚO Holovousy	ŠS Těchobuzice
Milka - R	evropská	netestováno	/	VŠÚO Holovousy	ŠS Těchobuzice
Merodova	lokální česká	velmi vysoce náchylná	5	Korba et al., 2014	lokální odrůda
Monika	evropská	netestováno	/	VŠÚO Holovousy	VŠÚO Holovousy s.r.o., ŠS Těchobuzice
Morava - R	evropská	netestováno	/	VŠÚO Holovousy	VŠÚO Holovousy s.r.o., ŠS Těchobuzice
Nagevicova	evropská	středně náchylná	3	Pánková et al., 2022	stará odrůda původem z Itálie (Francie)
Nela - R	evropská	vysoce náchylná	4	Korba et al., 2013	ŠS Těchobuzice
Nijissejkiji	japonská	velmi vysoce náchylná	5	Pánková et al., 2022	Japonsko (1898)
Niitaca	japonská	málo náchylná/slabě rezistentní	2	Pánková et al., 2022	Japonsko (1915)
Nitra	evropská	vysoce náchylná	4	Korba et al., 2013	Bojnice
Omega	evropská	vysoce náchylná	4	Korba et al., 2013	
Pařížanka	evropská	netestováno	/	<a href="http://www.sempira.cz">www.sempira.cz</a>	stará odrůda původem z Francie, druhá polovina 18. století
Pastornice	lokální česká	netestováno	/	<a href="http://www.stareodrudy.org">www.stareodrudy.org</a>	lokální odrůda
Petra	evropská	vysoce náchylná	4	Korba et al., 2013	ŠS Těchobuzice

Genotyp hrušně	Kategorie	Hodnocení náchylnosti (Le Lezec et al., 1997)	Třída náchylnosti (Le Lezec et al., 1997)	Zdroj údajů*	Původ
Pung Su	japonská	málo náchylná/slabě rezistentní	2	Korba et al., 2013	Japonsko
Radana - R	evropská	středně náchylná	3	Ludvík et al., 2011	ŠS Těchobuzice
Říhova bezjaderka	lokální česká	velmi vysoce náchylná	5	Korba et al., 2014	lokální odrůda
Shinco	japonská	netestováno	/	VŠÚO Holovousy	Japonsko (1941)
Shinseiki	japonská	netestováno	/	VŠÚO Holovousy	Japonsko (1945)
Sin Su	korejská	málo náchylná/slabě rezistentní	2	Korba et al., 2013	Korea (1965)
Solanka	lokální česká	málo náchylná/slabě rezistentní	2	Korba et al., 2014	lokální odrůda
Thirriotova	evropská	netestováno	/	<a href="http://www.sempr.cz">www.sempr.cz</a>	stará odrůda původem z Francie, druhá polovina 18. století
Tchom Tchu	čínská	středně náchylná	3	Korba et al., 2013	Čína
Trévouxská	evropská	netestováno	/	/	Belgie
Víla	evropská	málo náchylná/slabě rezistentní	2	Korba et al., 2013	VŠÚO Holovousy s.r.o., ŠS Těchobuzice
Vladka	evropská	netestováno	/	VŠÚO Holovousy	VŠÚO Holovousy s.r.o., ŠS Těchobuzice
Vonka - R	evropská	vysoce náchylná	4	Korba et al., 2013	VŠÚO Holovousy s.r.o., ŠS Těchobuzice
Williamsova	evropská	středně náchylná	3	Pánková et al., 2022	Anglie, 2. polovina 18.století
Williamsova čáslavka	evropská	netestováno	/	/	stará odrůda původem z Anglie, 18. století
Ya Li	čínská	středně náchylná	3	Pánková et al., 2022	stará odrůda původem z Číny

\*Citované zdroje jsou uvedeny v seznamu literatury.

## Podnože

Výsledný stupeň hladiny rezistence/náchylnosti genotypu vůči bakterii *Ea* je ovlivněn i výběrem podnože. Podnože pro genotypy hrušně se rozdělují na kdouloňové a hrušňové. Doposud převažující kdouloňové podnože, tj. Kdouloň MA, Kdouloň MC, Kdouloň SA, Kdouloň BA29, nebo Kdouloň Q-Eline<sup>®</sup>, jsou v převážné většině náchylné k *Ea*. Vlastní hrušňové podnože jsou méně rozšířené, využívá se hlavně hrušňový semenáč. Pro výrobu školkařských výpěstků hrušně se ve školkách využívají především nelicenční podnože M 9, Pajam 1, Pajam 2, M 26, P 14, MM 106, hrušňový semenáč, BA 29, Kdouloň A, hrušně Kavkazská. Tyto podnože nejsou zatíženy licenčním poplatkem, protože byly vyšlechtěny v dobách, kdy šlechtění většinou financovaly státy nebo univerzity. Některé ze jmenovaných podnoží jsou množené ze semen - tzv. generativní podnože. Generativní podnože jsou sice levnější, avšak jejich vlastnosti jako vzrůstnost a afinita vůči štěpovanému genotypu jsou vzhledem k velké heterogenitě potomstva podnoží od podnože rozdílné. Velmi nadějně jsou patentované podnože série OHxF ('Old Home' x 'Farmingdale') z USA, šlechtěné primárně na rezistenci vůči bakteriální spále jabloňovitých (Farold 40<sup>®</sup>, Daynir<sup>®</sup>, Daytor<sup>®</sup>, Brokmal<sup>®</sup>; Mészáros et al., 2019). Některé klony OHxF byly testovány pro použití v našich podmínkách. Perspektivní se jevil klon OHxF 87 (Paprštein et al. 2004). Evropské patentované podnože jsou podle některých výsledků slabě náchylné až rezistentní ke spále (Pyrodwarf<sup>®</sup>, FOX11, Pyriam (OH 11); Nečas a Lébl, 2012; Nečas et al., 2019).

### 1.9. Náchylnost/rezistence hrušně k bakteriální spále jabloňovitých

Rod *Pyrus* (*P.*) patří do podčeledi Amygdaloideae a kmene Malinae a skládá se z cca 75-80 druhů a mezidruhových hybridních druhů. Vzhledem k tomu, že mezi druhy *Pyrus* bylo pozorováno několik hybridizací, je rozlišení mezi některými druhy hrušně poměrně obtížné. Obecně vytvářejí jednoduché listy střídavě uspořádané. Listy jsou u některých druhů leskle zelené, u některých hustě stříbřitě chlupaté. Květy jsou bílé, vytváří chocholíky na krátkých ostruhách nebo postranních větvích a jsou složeny z pěti kališních lístků, pěti okvětních lístků, čtýřech tyčinek a obvykle pětímístného vaječníku s volnými tvary. Plody jsou pseudoplody složeny z nádoby nebo kalichové trubice, značně rozšířené, obklopující pravý plod a sestávající z pěti plodolistů, známých jako jádro. Morfologické znaky listu, plodu a kalichu se běžně používají k rozlišení mezi jednotlivými druhy hrušně. Po celém světě existují tisíce genotypů hrušně s širokou rozmanitostí tvaru, chuti a struktury ovoce. Ze všech známých a hlášených druhů hrušně a jejich mezidruhových hybridů je z obchodního hlediska a na základě velikosti produkčních ploch významná hrušně evropská, *P. communis* a asijské hrušně *P. pyrifolia*, *P. × bretschneideri*, *P. ussuriensis* a *P. sinkiangensis*. Odrůdová skladba evropských genotypů hrušně *P. communis* se v komerční produkci v průběhu let nemění tolik jako skladba genotypů jabloňů.

Spektrum dlouhodobě pěstovaných genotypů hrušně je středně náchylné až náchylné vůči bakteriální spále jabloňovitých (Bartlett, Packham's, Williams', Clapp's, Conference, Winter Nelis, Winter Cole, Beurré Bosc, atd.). V nových produkčních výsadbách hrušně převládají středně rezistentní (Anjou, Comice, Kiefer) až velmi rezistentní genotypy (Magness, Moonglow, Harvest Queen, Harrow Delight, Harrow Sweet, Orient, Seckel, atd.). V produkčních sadech v Evropě převládají žluté, zelené a zelenožluté variety, v poslední době roste zájem o červené odrůdy. Evropské genotypy hrušně jsou obecně náchylnější vůči *Ea* než asijské genotypy druhů *P. pyrifolia*, *P. bretschneideri* a *P. ussuriensis*, původem z východní Asie, Číny, Japonska a Koreji. Při roubování jsou vzájemně kompatibilní a při shodné době kvetení se navzájem opylují. Jedná se většinou o odrůdy neklimakterického typu, které vydrží v takovém stavu zralosti, v jakém byly sklizeny až do doby, než je napadne patogen nebo dužnina přirozeně degraduje. Úspěšně se používají ve šlechtitelských programech i vzhledem k deklarované rezistenci nebo střední náchylnosti vůči *Ea* (Dongguo Li, Chi Li, Chosuko, Nutica). Mezi zajímavé a ekonomicky úspěšné variety asijských hrušní a euro x asijských kříženců patří: Novembra (1962), Nijisseiki, Shinsui, Chojuro, Tsu Li (1980); Kosui, Ya Li (1983); Benita (kříženec, 1985); Dan Bae, Hakko, Hosui, Shinsetsu, Hwa Hong, Niitaka, Shinsei (1988); Bong Ri, Choju, Haeng Soo, Shin Soo, Shin Go, Kikusui, Okusankichi, Yakumo (1989); Shinseiki, Shinko (1990); Shen Li (1993); Wu Jiu Xiang (kříženec, 2013). Většina původních i vyšlechtěných variet je rezistentní vůči původci strupovitosti hrušně, houbě *Venturia pirina*, rzi hrušňové, houbě *Gymnosporangium sabinae maculata* a pseudomonádové spále květů hrušně, bakterii *Pseudomonas syringae*. V ČR se systematické testování stávajících nebo nových genotypů hrušně vůči *Ea* neprovádí. V tabulce 3 je přehled aktuálně dostupných evropských, asijských a lokálních (krajových) odrůd hrušně a jejich případná náchylnost vůči původci spály jabloňovitých.

## 2. CÍL METODIKY

Závislost ochrany plodin na pesticidech je spojena s nežádoucími vlivy na životní prostředí, lidské zdraví a s problematickou udržitelností jejich účinnosti. Nadměrné spoléhání na chemické přípravky vedlo ke vzniku široké rezistence vůči původcům chorob, škůdcům i plevelům. V současnosti kontinuálně klesá počet povolených chemických látek a účinnost biologických přípravků velmi ojediněle dosahuje momentálního efektu syntetických pesticidů. Východiskem z této situace je pěstování genotypů s co nejvyšší hladinou rezistence vůči nejzávažnějším patogenům a škůdcům. Mezi tyto patogeny patří původce bakteriální spály jabloňovitých, bakterie *Erwinia amylovora*. V sadech způsobuje lokálně velké hospodářské ztráty ve výsadbách hrušní. V procesu šlechtění je snaha u tohoto druhu vhodně kombinovat nebo vzájemně křížit vůči *Ea* více náchylné a chutnější

odrády hrušně evropské (*Pyrus communis* L.) a méně náchylné až rezistentní odrůdy hrušni asijských (*Pyrus pyrifolia* (Burm.) Nakai). Metody testování hladiny rezistence genotypů hrušně na tkáňových kulturách, detašovaných výhonech či stromcích v podmínkách karanténních skleníků poskytují pouze informativní hodnocení rezistence. Cílem této metodiky je popsat ekologicky a ekonomicky efektivní postup inokulace a hodnocení hladiny rezistence evropských a asijských hrušni vůči bakterii *Erwinia amylovora* v polních podmínkách. Při dodržení navrhovaného metodického postupu by měly být získány relevantní výsledky hodnocení hladiny rezistence genotypů hrušni odpovídající praktickým poznatkům v produkčních sadech.

### 3. VLASTNÍ POPIS METODIKY

#### 3.1. Spektrum metod pro testování náchylnosti/rezistence genotypů hrušni vůči bakterii *Erwinia amylovora*

Hladinu rezistence hrušni lze stanovit metodami *in vitro* na rostlinách v agarových plotnách množených z tkáňových kultur, na detašovaných květech, plodech nebo výhonech v růstových komorách za optimálních podmínek pro růst a množení bakterie *Ea*. Nejčastěji se provádí testování hladiny rezistence na kontejnerovaných stromcích v podmínkách karanténních skleníků. Výsledky těchto testů jsou převážně informativní. Poskytují jen rámcové hodnocení skutečné náchylnosti genotypů hrušni v polních podmínkách. Přesnějších výsledků je těmito metodami dosahováno pouze na okrajích hodnotící stupnice. Poměrně spolehlivě lze takto rozpoznat velmi náchylné a rezistentní odrůdy. Výhodou testování na detašovaných květech, nezralých plodech nebo výhonech je jednoduchost a rychlost. Podíl genotypů spadajících do kategorie velmi náchylných v produkčních sadech klesá se snižováním počtu povolených chemických přípravků s baktericidními účinky. Většina genotypů je podle stupnice náchylnosti hodnocena jako náchylné, tolerantní nebo slabě rezistentní. Zařazení do těchto skupin pomocí výše uvedených metod není spolehlivé. Stanovená náchylnost/rezistence vůči bakterii *Ea* často neodpovídá praktickým pozorováním výskytu patogenu v produkčních výsadbách. Relevantní výsledky na celé stupnici hodnocení hladiny rezistence podnožových materiálů a genotypů hrušně poskytují pouze metody inokulace *in vivo* realizované v polních podmínkách po dobu 3-5 let.

#### 3.2. Bakteriální kmeny patogenu a příprava inokula

Pro testování hladiny rezistence jsou využívány bakteriální kmeny *Ea* izolované z jádřovin s příznaky bakteriální spály. Kmeny jsou dlouhodobě uchovávány v masopeptonovém bujónu (Merck & Co., Inc. Kenilworth, New Jersey, USA) s 20 % glycerolu při teplotě -80 °C. Před aplikací na rostliny se kmeny po rozmrazení

několikrát po 24 h pasážují na živném agaru (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA) při teplotě 28 °C. Bakteriální kultura se ve sterilních podmínkách sejme skalpelem do cca 5 ml sterilní vody. Hustota inokula se upraví na spektrofotometru při vlnové délce 600 nm ( $OD_{600}$ ) na hodnotu 1,0, tj. cca na koncentraci  $10^9$  buněk  $mL^{-1}$  a následným ředěním sterilní vodou na konečnou koncentraci  $1 \times 10^5$  buněk  $mL^{-1}$ . Pro inokulace rostlin je vhodné využívat směs kmenů *Ea* připravenou promícháním ekvivalentních podílů jednotlivých kmenů. Připravená směs se po přípravě ihned aplikuje na testované rostliny.

### 3.3. Rostlinný materiál

#### 3.3.1. Detašované výhony

Pro objektivní hodnocení výsledků je inokulováno vždy minimálně 10-12 výhonů z 10-12 stromů jednoho genotypu, o průměru 0,7-0,9 cm, a délce  $35,0 \pm 5,0$  cm, ve fenologické fázi 31-35 (tj. 20-50 % konečné délky výhonu; Martínez-Nicolás et al., 2016). Každý výhon se umístí do vlastní nádoby se sterilní vodou v růstové komoře v režimu 25/17 °C (den/noc), relativní vlhkosti 80-90 % a světelném režimu 12/12 h (den/noc). U výhonů je nutné každý den vyměnit vodu v nádobě a bázi výhonu vždy zastříhnout o cca 0,3-0,5 cm. Výhony jsou po rozmístění do nádob bezodkladně inokulovány.

#### 3.3.2. Kontejnerované stromky

Pro objektivní hodnocení výsledků je inokulováno vždy minimálně 10-12 jednoletých pravokořenných nebo roubovaných stromků od jednoho testovaného genotypu hrušně. Stromky jsou zasazeny na podzim v období vegetačního klidu do 30 L kontejnerů do směsi zahradnických substrátů (1:1) s rozdílným podílem organické hmoty a mikroprvků (PG-MIX) a vápence (pH 5,5-9,0). Stromky jsou následně přemístěny do technického izolátoru s kovovou nerezovou tkaninou (obr. 23).

Obr. 23: Technický izolátor s kovovou nerezovou sítí k eliminaci šíření infekce aplikovaných bakterií.



V průběhu pokusu jsou stromy zavlažovány kapkovou závlahou. Kořenový systém je chráněn proti vysychání a mrazu kokosovou rohoží.

### **3.4. Hodnocení náchylnosti genotypů hrušně vůči bakterii *Erwinia amylovora***

#### **3.4.1. Orientační hodnocení náchylnosti genotypů hrušně vůči bakterii *Erwinia amylovora* na detašovaných výhonech (DSS)**

Pět mililitrů směsi virulentních bakteriálních kmenů *Ea* se aplikuje ručním postřikovačem na listy 10-12 detašovaných výhonů od každého genotypu, vždy na jeden detašovaný výhon z jednoho stromu. Výhony jsou inokulovány směsí kmenů *Ea* o koncentraci odpovídající velikosti přirozeného iniciačního inokula bakteriální spály, tj. cca  $10^5$  buněk  $\text{mL}^{-1}$ . Minimálně dva detašované výhony od každého testovaného genotypu jsou jako negativní kontrola ošetřeny sterilní destilovanou vodou. Na každém detašovaném výhonu je po 4, 7, 10 a 14 dnech po inokulaci stanoveno procento listů s nekrotickými skvrnami a lézemi (obr. 6). Pro každý genotyp a termín hodnocení je vypočítáno průměrné procento listových nekrot. Pro každý genotyp je nejvyšší hodnota vypočítaná během 14denního hodnocení transformována do pěti stupňové stupnice náchylnosti vůči původci bakteriální spály jabloňovitých (Le Lezec et al., 1997; Sobiczewski et al., 2015). Pět tříd náchylnosti jádrovin vůči *Ea* je uvedeno v pořadí od velmi málo náchylných (rezistentních) k velmi náchylným: 1 – velmi málo náchylné odrůdy (0-20 % listů s nekrotickými lézemi), 2 – málo náchylné (>20-40 %), 3 – středně náchylné (>40-60 %), 4 – vysoce náchylné (>60-80 %), 5 – velmi náchylné (>80-100 %).

#### **3.4.2. Hodnocení náchylnosti genotypů hrušně vůči *Ea* na terminálních výhonech kontejnerovaných stromků (SS)**

Jeden náhodně vybraný terminální výhon na 10-12 kontejnerovaných stromcích (a) umístěných v technickém izolátoru s ocelovou sítí je každoročně inokulován ve fenologické fázi 35-39 podle stupnice BBCH (výhony v 50-90 % konečné délky; Martínez-Nicolás et al., 2016). Výhon je inokulován odstřížením vrcholové části pod prvním rozvinutým listem nůžkami infikovanými směsnou suspenzí kmenů *Ea*. Koncentrace směsi odpovídá velikosti přirozeného iniciačního inokula *Ea*, tj. cca  $10^5$  buněk  $\text{mL}^{-1}$ . Délka nekrotické léze ( $NS_i$ ) a celková délka infikovaného výhonu ( $TS_i$ ) v cm se hodnotí ve čtyřech termínech, 2, 4, 6, a 8 týdnů po inokulaci. Pro každý strom a každý termín se vypočítá poměr nekrotické léze k celkové délce výhonu (obr. 24). V případě progresu choroby do dalších částí stromu je odhadnuto procento listů s nekrotickými lézemi ( $L_i$ ) a procento poškozených plodů ( $F_i$ ), stanoven pokles celkové vitality stromu ( $V_i$ ) v % a celkový počet hodnocených příznaků ( $Y$ ). Pro každý termín hodnocení je pro jednotlivé genotypy ( $x$ ) vypočtena průměrná hodnota náchylnosti ke spále výhonů ( $TS_x$ ):  $TS_x = 10 \sum_{i=1}^{10} \left( \frac{NS_i}{TS_i} + L_i + V_i + F_i \right) / Y$ .

Po ukončení hodnocení pokusu je nejvyšší vypočítaná průměrná hodnota podílu nekrotické léze pro daný genotyp transformována do stupnice náchylnosti vůči *Ea* (Le Lezec et al., 1997; Sobiczewski et al., 2015) a je stanovena třída náchylnosti daného genotypu vůči *Ea* v daném roce (viz kapitola 3.4.1.). Po vyhodnocení jsou infikované výhony odstříženy. Roční hodnocení  $SS_x$  umožňuje sledovat vliv průběhu vegetační sezóny na náchylnost jednotlivých genotypů hrušně vůči *Ea*. Pro relevantní posouzení dlouhodobé odolnosti genotypů vůči virulentnímu inokulu v polních podmínkách by měly být vyhodnoceny minimálně tři po sobě jdoucí vegetační cykly.



Obr. 24: Nekrotická léze na výhonu hrušně infikovaném bakterií *Erwinia amylovora*.

### 3.4.3. Hodnocení náchylnosti genotypů hrušně vůči *Ea* na květech kontejnerovaných stromků (BS)

Na 10-12 kontejnerovaných stromcích ( $a$ ) umístěných v technickém izolátoru s ocelovou sítí je každoročně inokulován jeden náhodně vybraný chocholík květů (obr. 25) ve fenologické fázi 61-65 podle stupnice BBCH (Martínez-Nicolás et al. 2016). Květy jsou inokulovány cca 1 mL směsí virulentních kmenů *Ea* o koncentraci odpovídající velikosti přirozeného iniciačního inokula, tj. cca  $10^5$  buněk  $\text{mL}^{-1}$ . Aplikace se provádí ručním postřikovačem o objemu 10 mL s ochranou proti úletu. Stromy jsou po této aplikaci monitorovány po celou vegetační sezónu. V termínech 3-7 dnů po inokulaci je na každém stromu ( $i$ ) hodnocen počet nekrotických květů ( $NB_i$ ) v květenství ( $TB_i$ ). V případě progresu infekce z květů do dalších částí stromu je postupně dle fenologické fáze 2,4,6, a 8 týdnů po inokulaci stanoven podíl nekrotické léze na výhonech ( $NS_i/TS_i$ ), odhadnuto procento listů s nekrotickými lézemi ( $L_i$ ) a poškozených plodů ( $F_i$ ), stanoven pokles celkové vitality stromu ( $V_i$ ) v % a počet hodnocených příznaků ( $Y$ ). Náchylnost jednotlivých kultivarů ( $x$ ) ke květní spále (BS) k danému termínu hodnocení je vypočítána podle vzorce:

$$BS_x = 10 \sum_{i=1}^{10} \left( \frac{NB_i}{TB_i} + \frac{NS_i}{TS_i} + L_i + V_i + F_i \right) / Y.$$

Po ukončení hodnocení pokusu v dané vegetační sezóně je nejvyšší vypočítaná průměrná hodnota  $BS$  pro daný genotyp transformována do stupnice náchylnosti vůči  $Ea$  (Le Lezec et al., 1997; Sobiczewski et al., 2015) a je stanovena třída náchylnosti daného genotypu vůči  $Ea$  v daném roce (viz kapitola 3.4.1.). Po vyhodnocení jsou infikované části stromu odstraněny. Roční hodnocení  $BS$  umožňuje sledovat vliv průběhu vegetační sezóny na náchylnost jednotlivých genotypů hrušně vůči květní spále. Pro relevantní posouzení dlouhodobé odolnosti genotypů vůči květní spále v polních podmínkách by měly být vyhodnoceny minimálně tři po sobě jdoucí vegetační cykly.



Obr. 25: Chocholík květů hrušně před inokulací suspenzí bakterie *Erwinia amylovora*.

#### 4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Předkládaná metodika „Hodnocení náchylnosti evropských a asijských genotypů hrušně k původci bakteriální spály, bakterii *Erwinia amylovora*, v podmínkách technického izolátoru“ využívá nových vědeckých poznatků o virulenci a šíření původce bakteriální spály jabloňovitých, bakterie  $Ea$  při testování náchylnosti genotypů hrušně. Aplikací nízké koncentrace patogenu na květy ve formě drobných kapének a infikovanými nůžkami na poraněné výhony jsou v technickém izolátoru vytvořeny podmínky do maximální míry blízké přirozeným podmínkám iniciace infekce původcem bakteriální spály v produkčních výsadbách. Hodnocení zejména květní spály, nejčastějšího způsobu infekce bakterie  $Ea$ , probíhá po celou dobu vegetační sezóny tak, jak dochází k přirozenému šíření inokula na rostlinách. Tento způsob umožňuje komplexní hodnocení dopadů infekce  $Ea$  na jednotlivé genotypy. Vedle stanovení náchylnosti stromů vůči původci spály květů, umožňuje zhodnotit i následné rozdíly v rychlosti šíření a rozsahu poškození jednotlivých orgánů rostliny, vliv přítomné infekce na další fenologické fáze, velikost násady plodů a celkovou vitalitu stromů. Vzhledem k vertikálnímu charakteru náchylnosti jaderovin vůči  $Ea$ , bylo jak pro orientační stanovení náchylnosti na detašovaných

výhonech, tak i pro testování náchylnosti na kontejnerovaných stromcích v technickém izolátoru použito směsné inokulum *Ea*. Jednotná metodika hodnocení příznaků a jejich transformace do mezinárodní stupnice umožňuje snadné porovnání výsledků orientační metody stanovení náchylnosti na detašovaných výhonech, metody infekce terminálních výhonů na kontejnerovaných stromcích s komplexním hodnocením náchylnosti hrušní po infekci květů.

## 5. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Většina produkčních výsadeb hrušně je realizována v systému integrované produkce, který je založen na snižování vnějších vstupů, zejména omezení syntetických hnojiv a chemických pesticidů a jejich nahrazení přírodními látkami, biologickými procesy a integrovanými opatřeními. Četnost a intenzitu napadení produkčních výsadeb hrušní původcem bakteriální spály jabloňovitých lze neefektivněji ovlivnit výběrem vhodných genotypů pro danou lokalitu s co nejvyšší hladinou rezistence vůči *Ea*. Významná je i náchylnost podnože. Náchylná podnož se může stát trvalým významným zdrojem inokula *Ea*. Certifikovaná metodika představuje ekonomický a ekologický způsob testování hladiny rezistence evropských i asijských genotypů hrušně. Metody testování v maximální míře zohledňují přirozený průběh infekce, vertikální charakter rezistence a průběh počasí v produkčním sadu. Při hodnocení primární infekce květů se projevuje komplexní vliv patogenu na stromy a transformace výsledků hodnocení do jednotné stupnice umožňuje porovnání různých metod testování náchylnosti/rezistence evropských a asijských genotypů hrušní k *Ea*.

Potřebnost a aktuálnost testování hladiny rezistence jádrovin je obecně dána klesajícím počtem povolených účinných chemických látek, malou účinností alternativních baktericidních přípravků s neznámým vlivem na produkční výsadby a výsadbou nových v podmínkách ČR neprověřených odrůd. Metodika obsahuje detailní charakteristiku patogenu, průběh infekce, možnosti ochrany výsadeb a popis testování náchylnosti/rezistence jádrovin ekonomickou metodou, která s maximální mírou simuluje podmínky přirozené infekce v produkčních výsadbách. Metodika je určena pro množitele a produkční pěstitele genotypů hrušní, odbornou i laickou veřejnost, orgány státní správy – Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Ministerstvo zemědělství ČR, Odbor zemědělských komodit i drobné pěstitele.

## 6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Dvou až tříleté hodnocení náchylnosti nových genotypů hrušní je nejlevnějším preventivním opatřením proti šíření infekce *Ea* v produkčních sadech. Výsadba

málo náchylných odrůd snižuje v závislosti na lokalitě celkové náklady na materiální a lidské zdroje při péči o sad, zvyšuje stabilitu a kvalitu produkce a snižuje reziduální zátěž půdy a uhlíkovou stopu sadu. Vlastní testování náchylnosti genotypů hrušní v podmínkách technického izolátoru s kovovou nerezovou sítí je vůbec nejlevnější formou testování hladiny náchylnosti s relevantními výsledky pro praxi. Testování s nulovou spotřebou elektrické energie a minimální uhlíkovou stopou probíhá v přirozených podmínkách v průběhu celé vegetační sezóny. Dvou až tříleté testování zohledňuje variabilitu průběhu jednotlivých vegetačních sezón a posiluje relevanci výsledků.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Baker, C. J., Orlandi, E. W., & Mock, N. M. (1993). Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension cells. *Plant Physiology*, 102(4): 1341–1344.  
<https://doi.org/10.1104/pp.102.4.1341>
- Barionovi, D., Giorgi, S., Stoeger, A., Ruppitsch, W. and Scortichini, M. (2006). Characterization of *Erwinia amylovora* strains from different host plants using repetitive-sequences PCR analysis, and restriction fragment length polymorphism and short-sequence DNA repeats of plasmid pEA29. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 1084–1094.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02813.x>
- Bereswill, S., Jock, S., Bellemann, P., & Geider, K. (1998). Identification of *Erwinia amylovora* by growth morphology on agar containing copper sulfate and by capsule staining with lectin. *Plant Disease*, 82(2): 158–164.  
<https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.2.158>
- Boubakri, H., Gargouri, M., Mliki, A., Brini, F., Chong, J., & Jbara, M. (2016). Vitamins for enhancing plant resistance. *Planta*, 244(3): 529–543.  
<https://doi.org/10.1007/s00425-016-2552-0>
- Braun, P.G., Hildebrand, P.D. (2007). Application of the MaryBlyt™ version 4.3 to the prediction of fire blight in raspberry. *Canadian Journal of Plant Pathology*, [online] 29(3): 276–282. <http://dx.doi.org/10.1080/07060660709507470>
- Bühlmann, A., Dreo, T., Rezzonico, F., Pothier, J. F., Smits, T. H., Ravnikar, M., ... & Duffy, B. (2014). Phylogeography and population structure of the biologically invasive phytopathogen *Erwinia amylovora* inferred using minisatellites. *Environmental microbiology*, 16(7): 2112–2125.  
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.12289>
- Cui, Z., Huntley, R.B., Zeng, Q. et al. (2021). Temporal and spatial dynamics in the apple flower microbiome in the presence of the phytopathogen *Erwinia amylovora*. *ISME J* 15: 318–329. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00784-y>
- Denny, T. P. (1995). Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Annual review of phytopathology*, 33(1): 173–197.

- Erwinia amylovora*, (2004): EPPO Bulletin, 34: 159–171.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2004.00714.x>
- Fayette, J., Roberts, P. D., Pernezny, K. L., & Jones, J. B. (2012). The role of cymoxanil and famoxadone in the management of bacterial spot on tomato and pepper and bacterial leaf spot on lettuce. *Crop Protection*, 31(1): 107–112.  
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.09.006>
- Gottsberger, R. (2010). Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting chromosomal DNA of *Erwinia amylovora*. *Letters in Applied Microbiology*, 51: 285–292.  
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02892.x>
- Hesse, E., O'Brien, S., Tromas, N., Bayer, F., Luján, A. M., van Veen, E. M., ... & Buckling, A. (2018). Ecological selection of siderophore-producing microbial taxa in response to heavy metal contamination. *Ecology letters*, 21(1): 117–127. <https://doi.org/10.1111/ele.12878>
- Hinze, M., Köhl, L., Kunz, S., Weißhaupt, S., Ernst, M., Schmid, A., & Voegelé, R. T. (2016). Real-time PCR detection of *Erwinia amylovora* on blossoms correlates with subsequent fire blight incidence. *Plant Pathology*, 65(3): 462–469.  
<https://doi.org/10.1111/ppa.12429>
- Husseini, A., & Akköprü, A. (2020). The possible mechanisms of copper resistance in the pathogen *Pseudomonas syringae* pathovars in stone fruit trees. *Phytoparasitica*, 48(5): 705–718.  
<https://doi.org/10.1007/s12600-020-00828-1>
- Ismail, E., Blom, J., Bultreys, A., Ivanović, M., Obradović, A., van Doorn, J., ... & Puławska, J. (2014). A novel plasmid pEA68 of *Erwinia amylovora* and the description of a new family of plasmids. *Archives of microbiology*, 196(12): 891–899. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-1028-5>
- Koch, Václav. Hrušky. 1. vyd. Svazek 15., Praha: Academia, 1967. 379 s.
- Korba, J., Šillerová, J., Prokinová, E., Hošková, P. (2013). Evaluation of susceptibility level of pear cultivars to fire blight (*Erwinia amylovora*) in the Czech Republic. *Horticultural Science*, 40(2), Juli: 58–64.
- Korba, J., Šillerová, J., Paprštejn, F., Sedlák, J. (2014). Certifikovaná metodika. Metodika testování odolnosti lokálních odrůd jaderovin k patogenu bakteriální spály růžovitých (*Erwinia amylovora*). ISBN: 978-80-7427-156-4.
- Krejzar, V., Pánková, I. (2016). Autorizovaný software ERW k prognóze potenciální aktivity karanténní bakterie *Erwinia amylovora*, původce bakteriální spály jablonovitých (růžovitých). Autorizovaný software.
- Le Lezec M., Lecomte P., Laurens F., Michelesi J.C. (1997): Sensibilité varietale au feu bacterien. *L'arboriculture Fruitiere*, 503: 57–62.
- Litschmann, T., & Rožnovský, J. (2011). Evaluation of automatic monitoring systems as tool to predict harmful factors impacts in fruit orchards. In *Bioclimate: Source and Limit of Social Development International Scientific Conference*, 6th–9th September.

- Ludvík V., Blažek J., Kloutvorová J., Kněžáček L., Kosina J., Lánský M., et al. (2011). Metodika pro integrované systémy pěstování ovoce. Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o. Ovocnářská unie České republiky Svaz pro integrované systémy pěstování ovoce. ISBN 978-80-87030-19-6
- Martínez-Nicolás, J. J., Legua, P., Melgarejo, P., Martínez, R., & Hernández, F. (2016). Phenological growth stages of nashi tree (*Pyrus pyrifolia*): codification and description according to the BBCH scale. *Annals of Applied Biology*, 168(2): 255–263. <https://doi.org/10.1111/aab.12261>
- Medzhitov R, Schneider DS, Soares MP (2012). Disease tolerance as a defense strategy. *Science*. 335: 936–41. <https://doi.org/10.1126/science.1214935>
- Mendes RJ, Luz JP, Santos C, Tavares F. (2021). CRISPR genotyping as complementary tool for epidemiological surveillance of *Erwinia amylovora* outbreaks. *PLoS One*. Apr 16;16(4): e0250280. <https://doi: 10.1371/journal.pone.0250280>
- Mészáros, M., Laňar, L., Kosina, J., Náměstek, J. (2019). Aspects influencing the rootstock–scion performance during long term evaluation in pear orchard. *Horticultural Science*, 46(1): 1–8. <https://doi.org/10.17221/55/2017-HORTSCI>
- Mikiciński, A., Sobiczewski, P., Puławska, J., & Malusa, E. (2016). Antagonistic potential of *Pseudomonas graminis* 49M against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight. *Archives of Microbiology*, 198(6): 531–539. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1207-7>
- Milling, A., Babujee, L., Allen, C. (2011). *Ralstonia solanacearum* extracellular polysaccharide is a specific elicitor of defense responses in wilt-resistant tomato plants. *Plos one*, 6(1), e15853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015853>
- Moltmann, E., and R. Herr, (2010). "Effect of wetness on blossom infections by *Erwinia amylovora*-impact on forecasting models." XII International Workshop on Fire Blight 896.
- Moragrega, C., Llorente, I., Manceau, C. et al. (2003). Susceptibility of European pear cultivars to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* using immature fruit and detached leaf assays. *European Journal of Plant Pathology* 109: 319–326. <https://doi.org/10.1023/A:1023574219069>
- Narayanasamy, S., & Uthandi, S. (2021). Microbial mitigation of drought stress: Potential mechanisms and challenges. *Microbial Management of Plant Stresses*, 185–201. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85193-0.00011-5>
- Nas, Yasin & Valentini, Franco & Balestra, Giorgio & Mazzaglia, Angelo & D'Onghia, Anna & Varvaro, L. (2016). Modification of a Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA) for typing isolates of *Erwinia amylovora*. *Plant Pathology*. 66. <https://doi.org/10.1111/ppa.12660>
- Nečas T., Balík J., Wolf J., Goliáš J., Láčík J., Šillerová J., Kiss T., Ondrášek, I. et al. (2018). Asijské hrušně v podmínkách České republiky pěstování, pomologie, skladování

- a choroby. 1. vyd. Brno: Ediční středisko Mendelovy univerzity, 184 s. ISBN 978-80-7509-557-2.
- Nečas T., Göttingerová M., Ondrášek I., Náměstek J., Wolf J., Kiss T., Laňar L., Mészáros M., Nečasová J., Letocha T. (2019). Inovace ovocnického školkařství moderní postupy rozmnožování a dopěstování. 1. vyd. Brno: Ediční středisko Mendelovy univerzity v Brně, 2019. 154 s. ISBN 978-80-7509-636-4.
- Nečas, T., Lébl, K. (2012): Evaluation of selected nursery traits in combination rootstocks and variety in Asian pear trees. *Acta of Mendel University of agriculture and forestry Brno* 60 (8): 171–180. ISSN 1211-8516.
- Paprstein, F., Kosina, J., Korba, J., & Sillerova, J. (2004). Evaluation of resistance to fire blight in Czech pear cultivars. In X International Workshop on Fire Blight 704: 577–582. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.704.92>
- Pirc, M., Ravnikar, M., Tomlinson, J. and Dreo, T. (2009), Improved fireblight diagnostics using quantitative real-time PCR detection of *Erwinia amylovora* chromosomal DNA. *Plant Pathology*, 58: 872–881. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02083.x>
- PM 7/20 (3) *Erwinia amylovora*. EPPO Bulletin. 52, (2022): 198–224. <https://doi.org/10.1111/epp.12826>
- Pusey PL, Stockwell VO, Mazzola M. (2009). Epiphytic bacteria and yeasts on apple blossoms and their potential as antagonists of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 99:571–81. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-5-0571>
- Rhim, S.-L., B. Völksch, L. Gardan, J.-P. Paulin, C. Langlotz, W.-S. Kim, and K. Geider. (1999). *Erwinia pyrifoliae*, an *Erwinia* species different from *Erwinia amylovora*, causes a necrotic disease of Asian pear trees. *Plant Pathol.* 48: 514-520. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1999.00376.x>
- Rezzonico, F., Smits, T. H., & Duffy, B. (2011). Diversity, evolution, and functionality of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) regions in the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(11): 3819-3829. <https://doi.org/10.1128/AEM.00177-11>
- Romanazzi, G., Feliziani, E., & Sivakumar, D. (2018). Chitosan, a biopolymer with triple action on postharvest decay of fruit and vegetables: Eliciting, antimicrobial and film-forming properties. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2745. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02745>
- Salm, H. & Geider, K. (2004). Real-time PCR for detection and quantification of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fireblight. *Plant Pathology*. 53. 602–610. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2004.01066.x>.
- Shade A, McManus PS, Handelsman J. (2013). Unexpected diversity during community succession in the apple flower microbiome. *MBio*. <https://doi.org/10.1128/mBio.00602-12>
- Shwartz, H., Shtienberg, D., Vintal, H. et al. (2003). The interacting effects of temperature, duration of wetness and inoculum size on the infection of pear

- blossoms by *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight. *Phytoparasitica* 31: 174–187. <https://doi.org/10.1007/BF02980788>
- Singh, J., Khan, A. (2019). Distinct patterns of natural selection determine sub-population structure in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Sci Rep* 9, 14017. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50589-z>
- Sobiczewski P., Peil A., Mikiciński A., Richter K., Lewandowski M., Żurawicz E., Kellerhals M. (2015). Susceptibility of apple genotypes from European genetic resources to fire blight (*Erwinia amylovora*). *European Journal of Plant Pathology*, 141: 51–62. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0521-7>
- Steven B, Huntley RB, Zeng Q. (2018). The influence of flower anatomy and apple cultivar on the apple flower phytobiome. *Phytobiomes*. 2: 171–9. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-03-18-0015-R>
- Tominaga, T., Ishii, M. (2020). Detection of microorganisms with lateral flow test strips. In *Methods in Microbiology* (Vol. 47, pp. 351-394). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2019.11.007>
- Thomson S. (1986). The role of the stigma in fire blight infections. *Phytopathology*. 76: 476–478.
- Van Der Zwet, T., & Keil, H. L. (1979). Fire blight: A bacterial disease of rosaceous plants (No. 510). US Department of Agriculture.
- Van der Zwet, T., Orolaza-Halbrendt, N., & Zeller, W. (2012). Spread and current distribution of fire blight. In: *Fire blight: history, biology, and management*. Eds. Van der Zwet, T., Orolaza-Halbrendt, N., & Zeller, W., The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA, ISBN: 978-0-89054-483-9, pp.42115–36.
- VŠÚO Holovousy s.r.o. Metodické listy OPVK Nové odrůdy a podnože jaderovin 15.
- Warmund, M. (2022). Fruit cultivars for home plantings, pp.6 <http://hdl.handle.net/10355/12796>
- Worthington, R. J., Rogers, S. A., Huigens III, R. W., Melander, C., & Ritchie, D. F. (2012). Foliar-applied small molecule that suppresses biofilm formation and enhances control of copper-resistant *Xanthomonas euvesicatoria* on pepper. *Plant disease*, 96(11): 1638–1644. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-12-0190-RE>
- Yang, H. W., Lee, J. H., & Zhao, Y. (2022). RpoN regulon in *Erwinia amylovora* revealed by transcriptional profiling and in silico binding site analysis. *Phytopathology*, <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-22-0255-R>.

## 8. SEZNAM SOUVISEJÍCÍCH PUBLIKOVANÝCH ČLÁNKŮ

- Pánková I., Krejzar V., Krejzarová R., Buchtová S. (2022): Testování hladiny náchylnosti evropských a asijských genotypů hrušně vůči původci spály růžovitých v technickém izolátoru. *Rostlinolékař* 33(5): 11-15.

- Krejzar V., Pánková I., Krejzarová R., Buchtová S. (2022): Asijské hrušně a destruktivní bakterie. *Zemědělec* 30(40): 22-22.
- Buchtová S., Pánková I., Krejzar V., Krejzarová R. (2022): Antagonistická aktivita epifytních bakterií z listů ovocných dřevin vůči spektru hospodářsky významných patogenů. *Rostlinolékař* 33(4): 13-16.
- Krejzar V., Krejzarová R., Pánková I., Buchtová S. (2022): Unáhlená změna statusu. *Zemědělec* 30 (23): 40-42.
- Krejzar V., Pánková I., Krejzarová R., Buchtová S. (2022): Infekce bakterií komplexu *Pseudomonas syringae* na hrušních na Moravě. *Zahradnictví* 21(3): 32-34.
- Pánková I., Krejzar V., Krejzarová R., Buchtová S. (2023): Comparison of shoot and blossom susceptibility of European and Asian pear cultivars to fire blight across different conditions. *Plant Protect. Sci.*, 59: in press.

## 9. SEZNAM TABULEK

- Tabulka 1: Fenologická růstová stadia evropských a asijských genotypů hrušní.
- Tabulka 2: Předpovědní modely pro výskyt původce bakteriální spály jabloňovitých, bakterie *Erwinia amylovora*.
- Tabulka 3: Výběr genotypů hrušní dostupných v České republice a jejich náchylnost vůči původci bakteriální spály jabloňovitých, bakterii *Erwinia amylovora*.

## 10. OBRAZOVÁ ČÁST

Titulní strana – ilustrační fotografie.

- Obrázek 1: Genotyp asijské hrušně Nijiseiki v období kvetení.
- Obrázek 2: Genotyp asijské hrušně Nijiseiki v období kvetení.
- Obrázek 3: Odumírající stromek hrušně po umělé infekci bakterií *Erwinia amylovora* na konci vegetační sezóny.
- Obrázek 4: Odumírající stromky hrušně po umělé infekci bakterií *Erwinia amylovora* na konci vegetační sezóny.
- Obrázek 5: Příznaky bakteriální spály jabloňovitých na květech hrušně.
- Obrázek 6: Příznaky bakteriální spály jabloňovitých na listech hrušně.
- Obrázek 7: Příznaky bakteriální spály jabloňovitých na plodech hrušně.
- Obrázek 8: Hákovité ohýbání letorostu hrušně po infekci bakterií *Erwinia amylovora*
- Obrázek 9: Infikované letorosty hrušně v prodlužovací fázi růstu.
- Obrázek 10: Primární infekce bakterie *Erwinia amylovora* proniká do hostitelských rostlin přes bliznu pestíku z povrchově kontaminovaných květů, které v krátkém čase nekrotizují.
- Obrázek 11: Při náhlé změně podmínek v neprospěch patogenu zůstávají vyvíjející se plody hrušně trvale poškozené a nedosahují plné zralosti.

- Obrázek 12: Za optimálních vnějších podmínek se v epifytu hrušně vytváří dostatečně velké inokulum *Ea*, které migruje do češule a dále proniká do vnitřních pletiv vznikajících plůdků.
- Obrázek 13: Z orgánů květu se infekce šíří do listů a letorostů rostliny cévními svazky xylému.
- Obrázek 14: Z orgánů květu se infekce šíří do listů a letorostů rostliny cévními svazky xylému.
- Obrázek 15: Vzdušné provazce bakterie *Erwinia amylovora* na infikovaných rostlinách hrušně slouží k pasivnímu šíření patogenu na okolní rostliny.
- Obrázek 16: Patogenem infikované centrální a postranní žilky na čepelích listů postupně nekrotizují.
- Obrázek 17: Nekrotická léze na povrchu korového pletiva hrušně způsobená bakterií *Erwinia amylovora*.
- Obrázek 18: Kolonie bakterie *Erwinia amylovora* na živném médiu.
- Obrázek 19: Metabolický profil bakterie *Erwinia amylovora* na mikrodestičce Biolog GEN III.
- Obrázek 20: Zaschlý sliz bakterie *Erwinia amylovora* na genotypu asijské hrušně Nijiseiki.
- Obrázek 21: Průběh infekce původcem bakteriální spály na genotypu asijské hrušně Kosui v průběhu vegetační sezóny.
- Obrázek 22: Průběh infekce původcem bakteriální spály na genotypu asijské hrušně Chojuro v průběhu vegetační sezóny.
- Obrázek 23: Technický izolátor s kovovou nerezovou sítí k eliminaci šíření infekce aplikovaných bakterií.
- Obrázek 24: Nekrotická léze na výhonu hrušně infikovaném bakterií *Erwinia amylovora*.
- Obrázek 25: Chocholík květů hrušně před inokulací suspenzí bakterie *Erwinia amylovora*.
- Zadní strana – ilustrační fotografie.



*Tato publikace nesmí být přetiskována vcelku nebo po částech, uchovávána v médiích, přenášena nebo uváděna do oběhu pomocí elektronických, mechanických, fotografických či jiných prostředků bez výslovného svolení Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v. v. i. výslovného svolení Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v. v. i.*



**HODNOCENÍ NÁCHYLNOSTI EVROPSKÝCH A ASIJSKÝCH GENOTYPŮ HRUŠNĚ  
K PŮVODCI BAKTERIÁLNÍ SPÁLY, BAKTERII *ERWINIA AMYLOVORA*,  
V PODMÍNKÁCH TECHNICKÉHO IZOLÁTORU**

Certifikovaná metodika (*UKZUZ 025079/2023*)

Vydal: ROSTLINOLÉKAŘSKÁ BAKTERIOLOGIE  
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.,  
Drnovská 507, CZ-161 06 Praha 6 - Ruzyně

Vydání první. Náklad: 50 výtisků

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Praha, 2023

ISBN 978-80-7427-388-9

[www.vurv.cz](http://www.vurv.cz)