

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



**Identifikace specifických genů rezistence k *Leptosphaeria maculans*
v odrůdách řepky a šlechtitelských materiálech**

Kolektiv autorů

Certifikovaná metodika

2021

Autorský kolektiv:

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

Doc. Ing. Lenka Burketová, CSc.

Ing. Barbora Jindřichová, Ph.D.

Ing. Romana Pospíchalová

Ing. Daniel Stehlík

Česká zemědělská univerzita v Praze

MSc. Anuoluwapo Olufadekemi Fajemisin

Ing. Marie Maňasová, Ph.D.

Ing. Jana Mazáková, Ph.D.

Prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc.

Doc. Ing. Miloslav Zouhar, Ph.D.

OSEVA PRO s.r.o., odštěpný závod Výzkumný ústav olejin Opava OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.

Ing. Eva Plachká, Ph.D.

Ing. Andrea Rychlá

Mgr. Viktor Vrbovský, Dis.

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

Obsah

1	Cíl metodiky	3
2	Vlastní popis metodiky	3
2.1	Úvod do problematiky	3
2.2	Metodická část	9
2.2.1	Rostlinný materiál	9
2.2.2	Příprava inokula <i>Leptosphaeria maculans</i>	9
2.2.3	Inokulační test	10
2.2.4	Přílohy	13
2.2.5	Obrazová příloha	15
3	Srovnání „novosti postupů“	18
4	Popis uplatnění metodiky	18
5	Ekonomické aspekty	19
6	Seznam použité související literatury	20
7	Seznam publikací, které předcházely metodice	22
8	Jména oponentů a názvy jejich organizací	23
9	Dedikace	23

1 Cíl metodiky

Hlavním cílem této metodiky je popis metody detekce genů rezistence (*Rlm*) proti patogenu *Leptosphaeria maculans*, původci fomového černání stonků řepky v odrůdách a šlechtitelských materiálech řepky olejky. Metodou identifikace je inokulační test provedený na děložních listech řepky diferenciacními izoláty *L. maculans* v definovaných podmínkách.

2 Vlastní popis metodiky

2.1 Úvod do problematiky

Osmdesátá léta 20. století představují v pěstování řepky olejky (*Brassica napus* L.) a v rozvoji trhu s touto plodinou zásadní průlom. Na trh byly zavedeny nové výnosnější klasické i hybridní odrůdy, a také odrůdy s minimálním obsahem kyseliny erukové a nízkým obsahem glukosinolátů, což se odrazilo ve zvýšení ploch osetých řepkou a nárůstu produkce řepky v hlavních regionech pěstování (Evropa, Kanada, Čína, Indie, Austrálie). V 90. letech však dochází ke stagnaci růstu výnosů, jelikož vysoké zastoupení řepky v osevním postupu s sebou přináší problémy spojené se zdravotním stavem této rostliny (Zheng et al., 2020).

V České republice řepka v současnosti zaujímá v celkové rozloze osevní plochy druhé místo (15 %) hned po pšenici (ČSÚ, 2021) a patří mezi ekonomicky nejrentabilnější rostlinné komodity pěstované v ČR, a to i přesto, že se pěstitelé v porostech řepky každoročně potýkají s výskytem patogenů a škůdců a musejí vydávat nemalé finanční prostředky na ochranu řepky proti těmto škodlivým organismům.

Fomové černání stonků řepky patří mezi tři celosvětově nejvýznamnější choroby řepky. Je způsobeno dvěma hemibiotrofními houbami rodu *Leptosphaeria* (*L. maculans* (Fuckel) Ces. & De Not., 1863, *L. biglobosa* Shoemaker & H. Brun, 2001), které se vyznačují podobnou bionomií. Primárním příznakem typickým pro nekrotrofní fázi patogenů jsou na listech světle béžově zbarvené skvrny, dosahující průměru až přes 1 centimetr, na nichž se vytvářejí konidiomata – pyknidy, viditelné jako černé tečky. Tyto

skvrny vznikají především na podzim (ale i na jaře) díky askosporám, které působí jako primární inokulum uvolňující se z pseudoperithecií přežívajících na posklizňových zbytecích řepky. Sekundárním inokulem patogenů zapříčiňujícím sekundární infekce jsou pyknostry nepohlavně se formující v pyknidách. V asymptomatické biotrofní fázi prorůstá mycelium patogenů z listových skvrn nepozorovaně řápkem do báze rostliny. Následuje opět fáze nekrotrofní, kdy v průběhu pozdního jara až do období sklizně patogeni způsobují nekrotizaci pletiv kořenového krčku, kořene, báze i vyšších pater stonku, což podle stupně napadení může vést buď k nouzovému dozrávání, nebo až k lámání stonku a poléhání rostlin. Průměrné roční ztráty na výnosu jsou odhadovány v závislosti na povětrnostních podmínkách daného státu, intenzitě choroby, zvolené odrůdě a ochranných opatřeních na 5–50 % (Zheng et al., 2020). Ochrana řepky olejky proti původcům způsobujícím tuto závažnou chorobu je založena na integraci agrotechnických postupů (orba, osevní postup a zdravé mořené osivo), aplikaci fungicidů především na podzim a pěstování odolných odrůd.

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

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

<i>R</i> geny	<i>Avr</i> geny
<i>Rlm1</i>	<i>AvrLm1–L3^d</i>
<i>Rlm2</i>	<i>AvrLm2</i>
<i>Rlm3</i>	<i>AvrLm3</i>
<i>Rlm4</i>	<i>AvrLm4–7^{de}</i>
<i>Rlm5</i>	<i>AvrLm5–9^d</i>
<i>Rlm6</i>	<i>AvrLm6</i>
<i>Rlm7</i>	<i>AvrLm4–7^{de}</i>
<i>Rlm8</i>	<i>AvrLm8</i>
<i>Rlm9</i>	<i>AvrLm5–9^d</i>
<i>Rlm10</i>	<i>AvrLm10A/AvrLm10Bⁱ</i>
<i>Rlm11</i>	<i>AvrLm11</i>
<i>Rlms</i>	<i>AvrLms</i>
<i>LepR1</i>	<i>AvrLepR1</i>
<i>LepR2</i>	<i>AvrLepR2</i>
<i>LepR3</i>	<i>AvrLm1–L3^d</i>
<i>LepR4</i>	<i>AvrLepR4</i>
<i>BLMR1</i>	?
<i>BLMR2</i>	?

^d geny s duální specifitou

^e gen *AvrLm7* je epistatický ke genu *AvrLm3* a genu *AvrLm9*

ⁱ interakce dvou sousedících genů

? prozatím neidentifikovány

I když je kvalitativní rezistence vysoce účinná a snadněji využitelná ve šlechtitelském procesu, její účinek může být překonán nově se vyvíjejícími rasami *L. maculans*, neboť v populacích patogena dochází ke změnám genetické variability díky genetickým mutacím a rekombinacím vznikajícím v průběhu pohlavní reprodukce patogena. Příčinou je selekční tlak na populace patogena, který je způsoben rozsáhlým a opakovaným pěstováním odrůdy s konkrétním *R* genem (Sprague et al., 2006), jako tomu bylo např.

ve Francii, kdy se v populaci patogena vyseletovala virulentní rasa, která překonala účinek genu *Rlm1* (Rouxel et al., 2003) nebo v Austrálii v případě genu *LepR3* (Li et al., 2003). Oproti tomu rasově nespecifická, kvantitativní rezistence je vzhledem ke svému polygennímu a QTL založení obtížněji překonávána patogenem, neboť je účinná vůči širokému spektru ras, což ji činí trvanlivější. Je ovšem obtížněji geneticky mapována a její ověření a vyhodnocení je také komplikovanější i díky jejímu ovlivnění podmínkami vnějšího prostředí. Jelikož se její účinek projevuje na stoncích, lze její efekt vyhodnotit až na dospělých rostlinách. Vyhodnocení kvalitativní rezistence je časově méně náročné, neboť testování lze provádět v laboratorních podmínkách na děložních listech diferenciacní sady genotypů řepky olejky, které jsou inokulovány izoláty *L. maculans*. Na základě inkompatibilní či kompatibilní interakce lze pak stanovit, které geny avirulence izolát patogena nese.

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

Přestože majorgeny rezistence (*Rlm*) zajišťují rostlinám velmi efektivní obranu, trvanlivost tohoto typu rezistence závisí na selekci virulentních ras patogena, které mohou jejich rozpoznání rostlinami eliminovat často nepatrnými změnami genomu. Pohlavní rozmnožování poskytuje *L. maculans* obrovskou genetickou plasticitu. Širší nasazení odrůd s jedním určitým genem rezistence pak obvykle vede k rychlé selekci populací houby, které jsou schopny tuto rezistenci překonat, jak již bylo výše zmíněno u genů *Rlm1* a *LepR3*. Podobný problém nastal také v případě genu *Rlm4*. Odrůdy nesoucí tento gen byly úspěšně pěstovány od roku 1970, ale i účinek tohoto genu byl později *L. maculans* překonán. K prolomení rezistence odrůdy stačila jediná bodová mutace v genu avirulence patogena, aby se gen rezistence řepky *Rlm4* stal neúčinným. Rezistence odrůd založená na přítomnosti genu *Rlm7* je zatím úspěšně využívána od roku 2004. Přesto však postupně pomalu v populacích *L. maculans* narůstá počet virulentních ras i k tomuto genu. Např. ve Francii byly v roce 2010 zjištěny 4 % ras

virulentních k *Rlm7*. Ovšem v následujících letech, kdy se značně rozšířilo pěstování odrůd nesoucích *Rlm7*, již bylo detekováno 19 % (2013) a 45 % (2015) virulentních ras (Balesdent et al., 2015). Příčinou relativně dlouhé persistence rezistence odrůd řepky zprostředkované genem *Rlm7* je zřejmě význam samotného efektoru *AvrLm4-7* (rozpoznávaný *Rlm4* a *Rlm7*) pro virulenci *L. maculans* (Nováková et al., 2016) a také fakt, že se gen *Rlm7* podařilo vnést do odrůd s vysokou kvantitativní rezistencí. Gen *Rlm7* v nových komerčních odrůdách na jednu stranu zajišťuje efektivní ochranu proti *L. maculans*, ale na druhou stranu s sebou stále nese velké riziko rychlého překonání rezistence založené na tomto genu.

Při šlechtění rostlin na odolnost vůči některým patogenům se obvykle doporučuje zmíněná pyramidizace genů rezistence, což ztěžuje možnost překonání každého z nich. V případě *L. maculans* tak lze využít komplikovaný vztah mezi efektoru patogena a geny rezistence hostitele. Bylo zjištěno, že se některé z těchto *AvrLm* genů ve svém účinku potlačují, např. *AvrLm4-7* maskuje *AvrLm3*, a tím znemožní rozpoznání *AvrLm3* proteinu rostlinou s *Rlm3* receptorem (Plissonneau et al., 2015). Kombinace genů *Rlm7* and *Rlm3* tak zvyšuje trvanlivost těchto dvou genů v odrůdách řepky. Otázkou ale zůstává, zda je tato strategie vzhledem k rychlé evoluční plasticitě *L. maculans* vhodná. Pravděpodobně jen opět přispěje k selekci nových virulentních ras.

Pro minimalizaci rizika vzniku virulentních ras *L. maculans* je tak potřeba znát jednak distribuci *AvrLm* genů v populacích *L. maculans* v pěstitelských oblastech řepky, ale také přítomnost genů rezistence *Rlm* v pěstovaných odrůdách řepky. V řadě zemí je v rámci této problematiky prováděn soustavný monitoring výskytu ras *L. maculans* (Stachowiak et al., 2006; Van de Wouw et al., 2018; Winter a Koopman, 2016; Zou et al., 2018). Výzkum proběhl i České republice v období 2017–2020 a bude autorským kolektivem publikován v roce 2022. Pěstitelům by pak mohly být doporučovány skupiny odrůd, které by nezvyšovaly selekční tlak na vznik nových ras patogena a zachovaly by si rezistenci co nejdéle.

Podstatou této metodiky je detekce konkrétních majorgenů rezistence k *L. maculans* (*Rlm*) v rostlinách řepky olejky na základě reakce rostlin na

inokulaci jednotlivými izoláty *L. maculans* nesoucími definované geny avirulence (*AvrLm*). Metoda využívá silného projevu specifické rezistence na děložních listech, které jsou proto používány pro inokulační testy. Právě listy k tomuto účelu nelze využít. Projevem specifické rezistence rostliny je vznik hypersenzitivní reakce (HR) v podobě malé nekrotické léze v místě inokulace (tj. inkompatibilní interakce mezi rostlinou a patogenem). Pokud tedy nese rostlina např. gen rezistence *Rlm1*, vytvoří se HR léze v případě inokulace izolátem *L. maculans*, který nese odpovídající gen avirulence *AvrLm1*. V tomto případě se patogen nedovede v rostlině šířit. Pokud ovšem rostlina *Rlm1* nenese, tento izolát *L. maculans* je na rostlině virulentní a vytvoří rozsáhlou nekrózu děložního listu a později prorůstá řapíkem do vodivých drah stonku.

2.2 Metodická část

Uvedený postup popisuje detekci genů rezistence *Rlm* v odrůdách a šlechtitelských materiálech řepky olejky s ohledem na nejčastěji se vyskytující geny avirulence *AvrLm* v populacích *L. maculans* v Evropě (Winter & Koopmann, 2016).

2.2.1 Rostlinný materiál

Rostliny řepky olejky pěstujeme za definovaných podmínek (světlo/tma, 14/10 h, 22/20 °C, intenzita světla 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) v sadbovačích o velikosti 6 × 6 cm. Definované podmínky kultivace je třeba dodržovat, aby byly výsledky reprodukovatelné a nedošlo k ovlivnění symptomů např. příliš vysokou teplotou, při které by mohla být potlačena hypersenzitivní reakce rostlin. Rostliny je možné pěstovat v zahradnickém substrátu nebo v hydroponické kultuře (perlit, živný roztok podle Steinerja, Tab. 4., příloha; Steiner, 1984).

2.2.2 Příprava inokula *Leptosphaeria maculans*

Isoláty *L. maculans* se specifickými geny avirulence (*AvrLm*) a jejich kombinacemi kultivujeme a uchováváme na pevném médiu V8 (Tab. 5, příloha) v Petriho miskách. Tyto kultury nám poslouží pro tvorbu sporulujících kultur, ze kterých získáme konidie (pyknostry) *L. maculans* pro inokulační testy. Z povrchu agaru odebereme část mycelia (1–2 cm²) a rozetřeme jej skleněnou lopatkou po povrchu média V8 v nové Petriho misce. Petriho misky zafixujeme papírovou prodyšnou chirurgickou páskou 3M MicroporeTM a inkubujeme 10 dnů za definovaných podmínek (světlo/tma 16/8 h, 22 °C), které zajistí tvorbu a zrání pyknid na povrchu média. Zralé pyknidy v Petriho misce zalijeme sterilní ddH₂O a konidie uvolníme z pyknid třením sterilní skleněnou lopatkou. Suspenzi konidií přefiltrujeme přes několik vrstev sterilní gázy do sterilních plastových centrifugačních zkumavek (50 ml). Zkumavku doplníme do objemu 50 ml sterilní ddH₂O a konidie následně sedimentujeme pomocí nízkootáčkové

centrifugace (1000 g, 10 min). Poté konidie resuspendujeme ve 20 ml sterilní ddH₂O. Koncentraci konidií spočítáme pomocí Bürkerovy komůrky a následně naředíme na koncentraci 10⁸ spor/ml. Tato koncentrace je určena pro skladování konidií (zásobní suspenze konidií). Konidie, které nepoužijeme pro inokulaci rostlin ihned, skladujeme ve sterilních plastových centrifugačních zkumavkách či mikrozkušavkách při teplotě – 20 °C po dobu maximálně 6 měsíců (Šašek et al., 2012). Pro dlouhodobé uskladnění konidie uchováváme v 25% roztoku glycerolu při teplotě – 80 °C.

2.2.3 Inokulační test

Pro detekci genů rezistence *Rlm* přítomných v odrůdách řepky olejky je používán inokulační test, který je prováděn na semenáčcích řepky. Odrůdy řepky jsou testovány souborem diferenciačních izolátů *L. maculans* se známými geny avirulence: izolát A1 (*AvrLm1*), izolát A124-7 (*AvrLm1*, *AvrLm2*, *AvrLm4-7*), izolát A3 (*AvrLm3*), izolát A4-7 (*AvrLm4-7*) a izolát A564-7 (*AvrLm5*, *AvrLm6*, *AvrLm4-7*). Diferenciační izoláty *L. maculans* jsou součástí sbírky izolátů Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. (Tab. 2).

Tab. 2: Diferenciační izoláty *Leptosphaeria maculans* s geny avirulence *AvrLm* používané pro detekci genů rezistence *Rlm* v odrůdách řepky olejky.

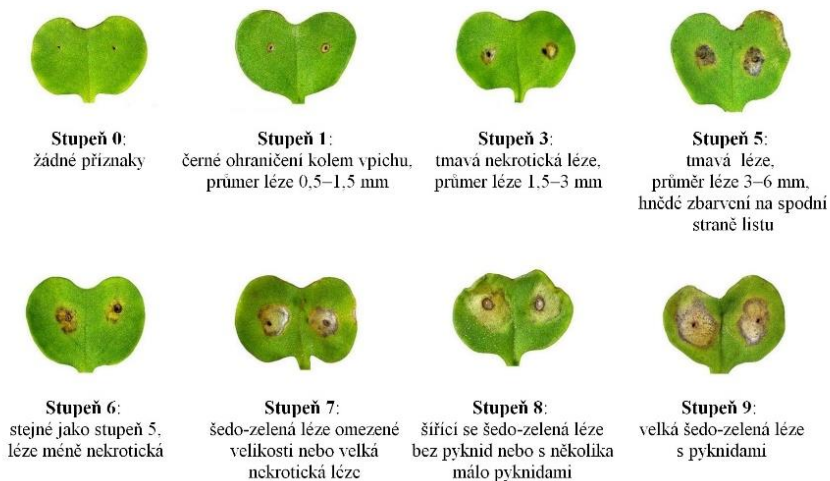
Izolát <i>L. maculans</i>	Gen avirulence		
A1	<i>AvrLm1</i>		
A124-7	<i>AvrLm1</i>	<i>AvrLm2</i>	<i>AvrLm4-7</i>
A3	<i>AvrLm3</i>		
A4-7	<i>AvrLm4-7</i>		
A564-7	<i>AvrLm5</i>	<i>AvrLm6</i>	<i>AvrLm4-7</i>

Pro kontrolu infekčnosti (patogenity) konidií diferenciačních izolátů *L. maculans* je používána odrůda Westar, která nenesé žádný *Rlm* gen a její reakce by měla být vůči izolátům nesoucím jakýkoli gen *AvrLm* vždy kompatibilní.

Pro inokulační test použijeme děložní listy 10 dní starých rostlin. Před vlastní inokulací rostliny fixujeme pomocí špejle a drátku, aby nedocházelo k poléhání rostlin a smíchání různých izolátů *L. maculans*.

Každou polovinu děložního listu propíchneme sterilním špendlíkem nebo jehlou a na místo vpichu pipetujeme 10 µl konidiální suspenze o koncentraci 10⁷ spor/ml. Na každé rostlině tak lze testovat 4 izoláty *L. maculans* (Obr. 2–5, obrazová příloha). Pro zajištění reprodukovatelných výsledků testujeme každý izolát nejméně na skupině 10 rostlin. Inokulované rostliny zakryjeme černou PE fólií pro zvýšení vzdušné vlhkosti a zabránění průniku světla. Po 48 h fólii z rostlin sejmem a rostliny dále pěstujeme za výše uvedených podmínek. Po 4 dnech od inokulace odstraníme z rostlin tvořící se pravé listy, abychom zabránili senescenci děložních listů. Symptomy vyvolané infekcí diferenciacními izoláty *L. maculans* na děložních listech v podobě lézí a nekrotizací (Obr. 6, obrazová příloha) hodnotíme přibližně po 14 dnech od inokulace pomocí škály (Obr. 1). Rychlost rozvoje symptomů závisí na kultivačních podmínkách i ročním období, takže je potřeba tvorbu symptomů kontinuálně sledovat a hodnotit symptomy v optimálním okamžiku na celé testované skupině rostlin najednou.

Pomocí škály hodnotíme velikost a barvu nekrotických lézí popsaných a vyobrazených na Obr. 1. Pro určení přítomnosti genů rezistence se používá průměr získaný pomocí škály. Pokud je výsledná hodnota v rozmezí 1–3 odpovídá inkompatibilní reakci a v odrůdě řepky je přítomen příslušný gen rezistence (*Rlm*). Pokud je výsledná hodnota vyšší než 3, v odrůdě není přítomen gen rezistence, který by odpovídal genu/genům avirulence (*AvrLm*) v konkrétním diferenciacním izolátu *L. maculans*.



Obr. 1: Škála s příznaky infekce způsobené diferenciálními izoláty *Leptosphaeria maculans* pro hodnocení napadení děložních listů různých odrůd řepky olejky. Převzato a upraveno podle Koch et al. (1991).

Konkrétní gen rezistence *Rlm* je v odrůdě řepky přítomen a funkční, pokud reakce rostlin vůči všem testovacím izolátům *L. maculans* odpovídají výsledkům uvedeným v Tab. 3. Pro detekci genů *Rlm* je tedy nutné inokulovat testovanou odrůdu všemi diferenciálními izoláty *L. maculans*. Pokud nejsou výsledky jednoznačné, je třeba test opakovat.

Tab. 3: Geny rezistence detekované v odrůdách řepky olejky na základě inkompatibilní a kompatibilní interakce s příslušným diferenciálním izolátem *Leptosphaeria maculans*. + značí inkompatibilní interakci, – značí kompatibilní interakci.

Gen rezistence	Izolát <i>L. maculans</i>				
	A1	A124-7	A3	A4-7	A564-7
<i>Rlm1</i>	+	+	–	–	–
<i>Rlm2</i>	–	+	–	–	–
<i>Rlm3</i>	–	–	+	–	–
<i>Rlm4-7</i>	–	+	–	+	+
<i>Rlm5</i>	–	–	–	–	+
<i>Rlm6</i>	–	–	–	–	+

2.2.4 Přílohy

ROSTLINNÝ A PĚSTEBNÍ MATERIÁL

Semena řepky olejky (*Brassica napus*) různých genotypů

Perlit

Plastové sadbovače (s jamkami přibližně 6 × 6 cm)

Destilovaná voda

Kultivační komora

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

Tab. 4: Živný roztok dle Steinera pro hydroponické pěstování rostlin řepky (Steiner, 1984).

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

MATERIÁL POTŘEBNÝ PRO PRÁCI S PATOGENEM

Plastové Petriho misky (9 cm)

Skleněná lopatka

Sterilní destilovaná voda

3M Micropore™ (papírová prodyšná páska)

Gáza

Skleněná nálevka

Plastové centrifugační zkumavky se šroubovacím víčkem (50 ml)

Plastové centrifugační uzavíratelné mikrozukumavky (1,5 ml)

Automatické pipety pro různé objemy

Pipetovací špičky pro různé objemy

Bürkerova komůrka

Krycí mikroskopická sklíčka

Světelný mikroskop (nejlépe s fázovým kontrastem)

Centrifuga kombinovaná s vortexem a třepačka

Flow-box s plynovým kahanem pro sterilní práci

Kultivační box

Mrazicí box ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$)

V8 agar (Tab. 5)

Tab. 5: Složení pevného kultivačního média V8 pro růst a sporulaci izolátů *Leptosphaeria maculans*.

Pevné médium V8 (1 l):	
zeleninová šťáva V8	200 ml
CaCO ₃	3 g
agar	20 g
destilovaná voda	doplnit do 1000 ml

MATERIÁL POTŘEBNÝ PRO INOKULACE ROSTLIN

Destilovaná voda

Špendlík či jehla

Špejle

Drátky

Automatická pipeta (10 μ l)

Pipetovací špičky (10 μ l)

Neprodyšná fólie

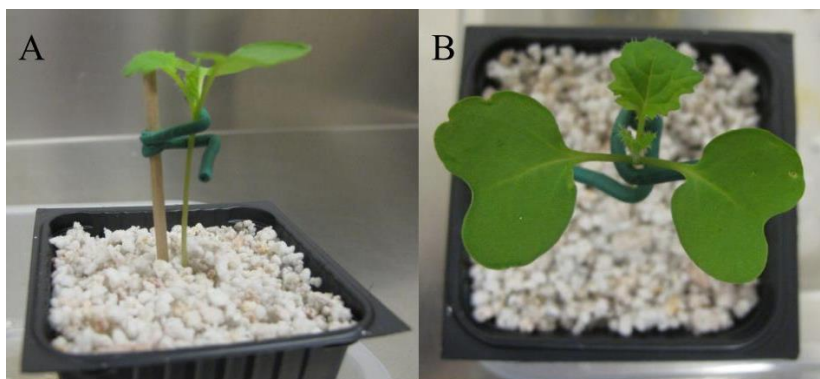
2.2.5 Obrazová příloha



Obr. 2: Vpich jehlou na děložním lístku řepky olejky s neznámými geny *Rlm* pro vytvoření místa inokulace diferenciačním izolátem *Leptosphaeria maculans* se známými geny *AvrLm*.



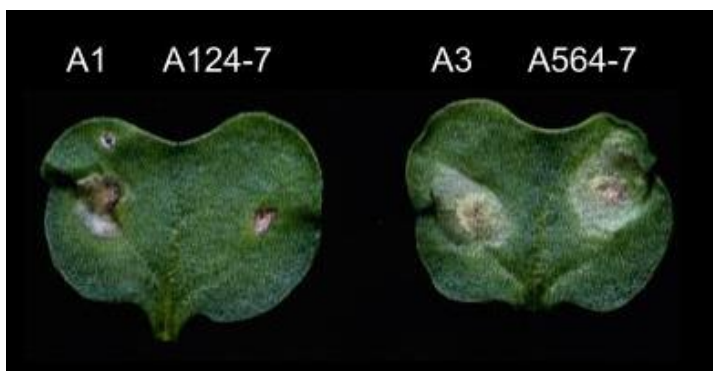
Obr. 3: Vpichy jehlou na děložních lístcích řepky olejky s neznámými geny *Rlm* pro inokulaci diferenciačními izoláty *Leptosphaeria maculans* se známými geny *AvrLm*. Na každé půlce děložního listu je jeden vpich (červená šipka) a v levém rohu jednoho děložního listu je větší vpich sloužící pro orientaci při inokulaci a vyhodnocení (modrá šipka).



Obr. 4: Fixovaná rostlina řepky olejky před inokulací, (A) pohled ze strany, (B) pohled ze shora.



Obr. 5: Inokulace děložních lístků řepky olejky na místě vpichu kapkou (10 μ l) suspenze konidií (pyknospor) diferenciačními izoláty *Leptosphaeria maculans* o koncentraci 10^7 spor/ml.



Obr. 6: Příznaky na děložních lístcích testované odrůdy řepky olejky způsobené diferenciačními izoláty *Leptosphaeria maculans* se známými geny *AvrLm*. Izoláty A1 (*AvrLm1*), A3 (*AvrLm3*) a A564-7 (*AvrLm5*, *AvrLm6*, *AvrLm4-7*) způsobují kompatibilní reakci (šedo-zelená nekrotická léze), izolát A124-7 (*AvrLm1*, *AvrLm2*, *AvrLm4-7*) způsobuje inkompatibilní interakci (tmavá nekrotická léze). Z testu vyplývá, že odrůda řepky olejky obsahuje gen rezistence *Rlm2*.

3 Srovnání „novosti postupů“

V předložené metodice je uveden podrobný, optimalizovaný a ověřený postup umožňující detekci běžných majorgenů rezistence (*Rlm*) u řepky olejky proti *L. maculans* na základě testování a sledování interakcí klíčických rostlin s diferenciacními izoláty tohoto patogena. Pro testování jsou použity izoláty *L. maculans* s definovanými geny avirulence (*AvrLm*). Vyhodnocením kombinací reakcí rostlin na jednotlivé izoláty lze určit přítomnost majorgenů rezistence v odrůdách a nových šlechtitelských materiálech řepky. Tento postup nebyl v České republice dosud použit. Spolu se znalostí výskytu genů *AvrLm* v populacích *L. maculans*, který je předmětem další navrhované certifikované metodiky, umožní informace o identifikovaných genech *Rlm* v konkrétním genotypu řepky navrhnout pěstitelům takovou skladbu odrůd, která nebude vytvářet vysoký selekční tlak na populace patogena a vést k překonání genů rezistence v pěstovaných odrůdách řepky.

4 Popis uplatnění metodiky

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

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

5 Ekonomické aspekty

Řepka olejka a zejména její ozimá forma je plodinou, která poskytuje lidské společnosti suroviny, bez kterých si již nedovedeme některá odvětví a jejich fungování vůbec představit. Využití řepky olejky a dalších olejnin v různých výrobních odvětvích má vzestupný trend, a to nejen z důvodu tlaku společnosti na zvyšování podílu obnovitelných zdrojů. Celková produkce řepkového oleje ve světě v hospodářském roce 2019–20 dosáhla 28 mil. t. Nejvíce řepkového oleje bylo vyrobeno v EU (9,7 mil. t), dále v Číně (6 mil. t), Kanadě (4 mil. t) a Indii (2,7 mil. t). V České republice bylo v roce 2021 vyprodukováno 1246 tis. tun řepkového semene, a to ze sklizňové plochy 368 tis. ha s průměrným výnosem 3,38 t/ha. Výkupní ceny pak validovaly podle olejnatosti a měsíce prodeje mezi 12–14 tis. Kč/t. Uplatněním metodických postupů k získání nových informací lze predikovat následující ekonomické a další neekonomické přínosy, a to jak u pěstitelů, producentů osiva, šlechtitelů i zpracovatelů olejnin. Hlavním aspektem je zefektivnění šlechtění nových odrůd a zlepšení marketingu prodeje. Každá nová odrůda bude deklarovaná z hlediska přítomnosti genů rezistence *Rlm* vůči *L. maculans*, a to již v průběhu procesu šlechtění, který bude pouze obohacen o tento další selekční faktor. Každoroční předpokládané uplatnění je zejména u českých liniových odrůd mezi 4 až 5 tis. ha. To při každoročním prodeji 5000 výsevních jednotek představuje tržby cca 5–10 mil. Kč při minimální ceně 1–2 tis. Kč za 1 výsevní jednotku české liniové odrůdy řepky. V ceně je zohledněna prodejní sleva. Při zvýšení prodeje o cca 2 % dojde ke každoročnímu navýšení tržeb minimálně o 100–200 tis. Kč, a to pouze na 1,3 % sklizňové plochy ČR, přičemž v budoucnu je predikován další roční nárůst ploch osetých českými liniovými odrůdami řepky cca o 0,5 %. Vyjádřeno kumulativně to může v horizontu 5 let znamenat nárůst tržeb až o dalších 192,5–385 tis. Kč. Dalším významným aspektem, který bude uvedením metodiky do praxe ovlivněn, je snížení vstupů fungicidního ošetření řepky olejky. V případě, že bude kalkulováno podzimní ošetření na 1 ha řepky olejky v rozmezí 500–1500 Kč, bude úspora na tomto ošetření v případě pěstování prověřených rezistentních odrůd cca 1000–1500 Kč. V případě českých linií pěstovaných na 4450 ha pak celkovou úsporu můžeme vyjádřit na 4,45–6,675 mil. Kč ročně, kumulativně za pět let pak

cca 22,25–33,4 mil. Kč. Pokud bychom predikovali zvýšení zastoupení rezistentních odrůd v osevním postupu o 1,5 % ročně nad rámec výše uvedené kalkulace, pak by celková úspora na nákladech na podzimní fungicidní ošetření měla dosáhnout kumulativně za pět let částky 23,9–35,9 mil. Kč. Nelze opominout ani další neekonomické aspekty, které budou ovlivněny, a to zejména snížení reziduí fungicidů v komoditě, snížení aplikace fungicidů do životního prostředí a v neposlední řadě i snížení nákladů na pohonné hmoty.

6 Seznam použité související literatury

Balesdent M. H., Plissoneau C., Coudard, L., Daverdin, G., Le Meur, L., Carpezat, J., Leflon, M., Pinochet, X., Ermel, M., Brun, H., & Rouxel, T. 2015. Résistance du colza au phoma: où en est-on de l'efficacité de la résistance Rlm7? *Phytoma*, 684: 20–4.

ČSÚ, 2021. dostupné z:

https://vdb.czso.cz/vdbvo2/faces/index.jsf?page=vystup-objekt-parametry&z=T&f=TABULKA&sp=A&skupId=346&katalog=30840&pv o=ZEM02C&evo=v545 ! ZEM02A-2021_1

Koch, E., Song, K., Osborn, T. C., & Williams, P. H. 1991. Relationship between pathogenicity and phylogeny based on restriction fragment length polymorphism in *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 4: 341–349.

Li, H., Sivasithamparam, K., & Barbetti, M. J. 2003. Breakdown of a *Brassica rapa* subsp. *sylvestris* single dominant blackleg resistance gene in *B. napus* rapeseed by *Leptosphaeria maculans* field isolates in Australia. *Plant Diseases*, 87: 752.

Nováková, M., Šašek, V., Trdá, L., Krutinová, H., Mongin, T., Valentová, O., Balesdent, M. H., Rouxel, T., & Burketová, L. 2016. *Leptosphaeria maculans* effector *AvrLm4-7* affects salicylic acid (SA) and ethylene (ET) signalling and hydrogen peroxide (H₂O₂) accumulation in *Brassica napus*. *Molecular Plant Pathology*, 17: 818–831.

Plissonneau, C., Daverdin, G., Ollivier, B., Blaise, F., Degrave, A., Fudal, I., Rouxel, T., & Balesdent, M. H. 2015. A game of hide and seek between avirulence genes *AvrLm4-7* and *AvrLm3* in *Leptosphaeria maculans*. *New Phytologist*, 209: 1613–1624.

Rouxel, T., Penaud, A., Pinochet, X., Brun, H., Gout, L., Delourme, R., Schmit, J., & Balesdent, M. H. 2003. A 10-year survey of populations of *Leptosphaeria maculans* in France indicates a rapid adaptation towards the *Rlm1* resistance gene of oilseed rape. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 871–881.

Sprague, S. J., Balesdent, M. H., Brun, H., Hayden, H. L., Marcroft, S. J., Pinochet, X., Rouxel, T., & Howlett, B. J. 2006. Major gene resistance in *Brassica napus* (oilseed rape) is overcome by changes in virulence of populations of *Leptosphaeria maculans* in France and Australia. *European Journal of Plant Pathology*, 114: 33–40.

Stachowiak, A., Olechnowicz, J., Jedryczka, M., Rouxel, T., Balesdent, M. H., Happstadius, I., Gladders, P., Latunde-Dada, A., & Evans, N. 2006. Frequency of avirulence alleles in field populations of *Leptosphaeria maculans* in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 114: 67–75.

Steiner A. A., 1984. The universal nutrient solution. In: Proceedings of the Sixth International Congress on "Soilless Culture". Pudoc, Wageningen, The Netherlands. P. 633–650.

Šašek, V., Nováková, M., Jindřichová, B., Bóka, K., Valentová, O., & Burketová, L. 2012. Recognition of Avirulence Gene *AvrLm1* from hemibiotrophic ascomycete *Leptosphaeria maculans* triggers salicylic acid and ethylene signaling in *Brassica napus*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 25: 1238–1250.

Van de Wouw, A. P., Howlett, B. J., & Idnurm, A. 2018. Changes in allele frequencies of avirulence genes in the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, over two decades in Australia. *Crop & Pasture Science*, 69: 20–29.

Winter, M., & Koopmann, B. 2016. Race spectra of *Leptosphaeria maculans*, the causal agent of blackleg disease of oilseed rape, in different geographic regions in northern Germany. *European Journal of Plant Pathology*, 145: 629–641.

Zheng, X., Koopmann, B., Ulber, B., & von Tiedemann, A. 2020. A global survey on diseases and pests in oilseed rape – current challenges and innovative strategies of control. *Frontiers in Agronomy*, 2: 1–15.

Zou, Z. W., Zhang, X. H., Fernando, & W. G. D. 2018. Distribution of mating-type alleles and genetic variability in field populations of *Leptosphaeria maculans* in western Canada. *Journal of Phytopathology*, 166: 438–447.

7 Seznam publikací, které předcházely metodice

Klima, M., Bělská, K., Čurn, V., Endlová, L., Gališová, V., Hejna, O., Horáček, J., Horák, J., Hoštičková, I., Jozová, E., Kosová, K., Kučera, V., Macháčková, I., Plachká, E., Prášil, I., Rychlá, A., Schemit, Y. H., Řičica, M., Smýkalová, I., Šafář, J., Šmirous, P., Tyller, V., Vítámvás, P., & Vrbovský, V. 2020. Výsledky a průběh programu Česká řepka v roce 2020. 37. vyhodnocovací sborník. SPZO s.r.o. S. 68–73.

Plachká, E. 2018: Význam fomového černání stonků řepky v pěstování ozimé řepky v ČR. XXI. Česká a slovenská konference o ochraně rostlin. Mendelu v Brně 5.–6. září 2018. Sborník abstraktů. S. 64.

Plachká, E., Vrbovský, V., Rychlá, A., Burgetová, M., Jindřichová, B., Burketová, L., Fajemisin, O., Mazáková, J., & Ryšánek P. 2019. Hodnocení významu fomového černání ve šlechtění a pěstování řepky olejky ozimé v ČR a monitoring genů avirulence v populacích *Leptosphaeria maculans*. Systém výroby řepky a systém výroby slunečnice (36. vyhodnocovací seminář), Hluk, 20.–21. 11. 2019, SPZO s.r.o., Praha. S. 150–156.

Plachká, E., & Šafář, J. 2020: Význam fomového černání stonku řepky v ČR. Úroda, 68 (12), vědecká příloha časopisu, 207–212.

Plachká, E., Šafář, J., & Burgetová, M. 2020. Zdravotní stav řepky olejky ozimé na Opavsku a Šumpersku v sezóně 2019/2020. Sborník SPZO 2020 – Výsledky pěstování olejnin, 37. vyhodnocovací sborník. SPZO s.r.o. S. 106–115.

Plachká, E., Vrbovský, V., Rychlá, A., Burgetová, M., Jindřichová, B., & Burketová, L. 2020. Aktuální poznatky o fomovém černání stonku řepky. Úroda, 68 (4), odborná příloha časopisu, 4–7.

Pošlušná, J., Plachká, E., Horáček, J., Macháčková, I., Ondráčková, E., Šmirous, P., & Vrbovský, V. 2019: The harmfulness of phoma stem canker, Sclerotinia stem rot, and phytoplasma on winter oilseed rape with regard to Czech breeding programs. Agronomy, 9 (2): 75.

Prokinová, E., Plachká, E., & Šafář, J. 2019: Příspěvek k signalizaci a prognóze napadení řepky *Leptosphaeria* spp. Rostlinolékař, 30 (2): 23–27.

Ryšánek, P., & Burketová, L. 2017. Rezistence řepky k houbám z rodu *Leptosphaeria* – cesta ke stabilizaci jejich výnosů? Rostlinolékař, 28 (6): 16–18.

8 Jména oponentů a názvy jejich organizací

Ing. Petr Zehnálek

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní odrůdový úřad,
Oddělení zkoušek užitné hodnoty

Doc. Dr. Ing. Jaroslav Salava

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.

9 Dedikace

Metodika je výsledkem výzkumného projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum ministerstva zemědělství ČR – QK1710397 Charakterizace kompatibility vztahů mezi původci fomového černání stonku

a odrůdami ozimé řepky jako základ pro zvýšení rentability pěstování této plodiny v ČR. Metodika obsahuje také výsledky získané v rámci institucionální podpory MZe RO1818.

Publikaci bylo Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským uděleno osvědčení č. **UKZUZ 226581/2021** o uznání uplatněné certifikované metodiky v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“.