



**Metodika stanovení odolnosti  
genových zdrojů brukve řepky olejky  
(*Brassicanapus* L.) k patogenu  
*Plasmodiophora brassicae* Wor.**





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

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Metodika stanovení odolnosti  
genových zdrojů brukve řepky olejky  
( *Brassicanapus* L.)  
k patogenu *Plasmodiophora  
brassicae* Wor.**

**2018**



MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ



## CERTIFIKOVANÁ METODIKA

### **Metodika stanovení odolnosti genových zdrojů brukve řepky olejky (*Brassic napus* L.) k patogenu *Plasmodiophora brassicae* Wor.**

**Dedikace:** Certifikovaná metodika vznikla za podpory MZe jako součást řešení projektu NAZV:

QJ1510172 „Využití nekonvenčních výchozích materiálů, biotechnologických metod a efektivních postupů v liniovém a hybridním šlechtění ozimé řepky“ (2015-2018).

#### **Autorský kolektiva podíl práce jednotlivých autorů na tvorbě metodiky:**

Ing. Andrea Rychlá, zástupce autorského kolektivu (OSEVA PRO s.r.o.): 60 %

Ing. Eva Plachká, Ph.D., zástupce autorského kolektivu (OSEVA PRO s.r.o.): 30%

Mgr. Viktor Vrbovský, zástupce autorského kolektivu (OSEVA PRO s.r.o.): 10%

#### **Oponentní posudky vypracovali:**

Mgr. Veronika Konradyová, Ph.D. (Česká zemědělská univerzita v Praze)

Ing. Petr Zehnálek (ÚKZÚZ, Sekce rostlinné výroby, Národní odrůdový úřad, Oddělení zkoušek užitné hodnoty)

#### **Vydal:**

OSEVA PRO s.r.o., odštěpný závod Výzkumný ústav olejin Opava, Purkyňova 10, 764 01 Opava

## OBSAH

1	<b>Cíl metodiky</b> .....	7
2	<b>Vlastní popis metodiky</b> .....	7
2.1	<b>Úvodní část</b> .....	7
2.2	<b>Nádorovitost kořenů brukvovitých / Nádorovka kapustová (<i>P. brassicae</i>)</b> .....	8
2.3	<b>Vývojový cyklus patogena</b> .....	8
2.4	<b>Aktuální možnosti ochrany</b> .....	9
2.5	<b>Postup stanovení odolnosti testovaných genetických zdrojů</b> .....	10
2.5.1	<b>Příprava GZ</b> .....	10
2.5.1.1	Počet testovaných rostlin .....	10
2.5.1.2	Testační nádoby .....	10
2.5.1.3	Substrát .....	11
2.5.2	<b>Výsev</b> .....	11
2.5.2.1	Pozitivní kontrola .....	12
2.5.2.2	Podmínky pro realizaci testu .....	12
2.5.3	<b>Příprava inokulátu</b> .....	12
2.5.3.1	Dlouhodobé uchovávání nádorů .....	13
2.5.3.2	Vlastní příprava inokulátu .....	13
2.5.3.3	Dlouhodobé uchovávání inokulátu .....	14
2.5.3.4	Příprava inokulátů z jednotlivých patotypů patogena <i>P. brassicae</i> .....	14
2.5.4	<b>Vlastní inokulace</b> .....	14
2.5.4.1	Inokulace jednotlivými patotypy patogena <i>P. brassicae</i> .....	15
2.5.5	<b>Hodnocení odolnosti GZ k <i>P. brassicae</i></b> .....	16
2.6	<b>Využití výsledků testování</b> .....	20
3	<b>Novost postupů</b> .....	21
4	<b>Popis uplatnění metodiky</b> .....	21
5	<b>Ekonomické aspekty</b> .....	21
6	<b>Seznam použité a související literatury</b> .....	23
7	<b>Seznam výsledků, které předcházely vydání metodiky</b> .....	25

## 1 CÍL METODIKY

Cílem této metodiky je vytvoření optimalizovaného postupu stanovení stupně odolnosti testovaných genových zdrojů (GZ) brukve řepky olejky k poškození patogenem *Plasmodiophora brassicae* Wor. s ohledem na možné využití při hodnocení materiálů kolekcí Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiverzity (NP) a pro potřeby šlechtění.

## 2 VLASTNÍ POPIS METODIKY

### 2.1 Úvodní část

Význam brukve řepky olejky s ohledem na ekonomiku produkce neustále stoupá, dochází k rozšiřování pěstitelských ploch a častějšímu zařazování do osevních postupů. V roce 2017 činila osevní plocha řepky olejky 394 262 ha (ČSÚ, 2017), což představovalo 82,6% výměry všech pěstovaných olejnin v České republice (Zehnálek, 2018). To s sebou nese i negativa v podobě šíření chorob, mnohdy i dříve málo rozšířených. Jednou z nich je nádorovitost kořenů brukvovitých způsobená patogenem *P. brassicae* (Woronin, 1877), česky nádorovka kapustová (starší název hlenka kapustová) (Kůdela, 1999). Tento organismus byl na našem území dříve vnímán především jako patogen brukvovité zeleniny. V důsledku výše uvedených okolností se z něj ale stává původce významné choroby řepky olejky. Zaznamenáváme její vzestup podobně, jako tomu bylo v případě světových producentů (např. Kanada, Austrálie) (Dixon, 2009a). V současné době neexistuje jednoznačně účinná chemická ochrana a k redukci patogenu jsou využívány pouze podpůrná opatření, často ekonomicky velmi nákladná (Chytilová, 2007). V tomto kontextu se jeví jako vysoce žádoucí výběr genotypů se zvýšenou odolností, případně rezistencí k onemocnění a jejich širší využití jak pro přímé pěstování, tak pro zařazení do šlechtitelských programů.

## 2.2 Nádorovitost kořenů brukvovitých/Nádorovkakapustová(*P. brassicae*)

Nádorovitost kořenů brukvovitých rostlin způsobuje půdní patogen *Plasmodiophora brassicae* Wor., který systematicky patří do říše SARa podříše *Rhizaria*, kmene *Cercozoa* (Burki et al., 2007). Napadá buňky kořenových pletiv, které se v důsledku toho nadměrně zvětšují a tvoří nádor (Hwang et al., 2012). Nejdříve jsou viditelně poškozeny postranní kořeny, na nichž se objevují ztlustěliny a nádory, které se stále zvětšují, až zasáhnou i kořen hlavní. Ten je postupně zcela zdeformován. Rostlina s poškozenými kořeny postupně ztrácí možnost přijímat vodu a živiny, dochází k barevným změnám na listech (nafialovění listů), rostliny vystavené stresu suchem rychleji zavadají, zhoršena je i schopnost odolávat vyzimování. Může dojít až k uhynutí rostliny, nádory na kořenech se pak rozpadnou a jsou zdrojem další infekce (Dixon, 2009b). Trvalé spory, uvolněné z nádorů, jsou schopny v půdě přežít až 15 let, přitom snášejí teploty v rozmezí -40°C až 120°C (seminář, Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin - SPZO). *P. brassicae* není vázána pouze na kulturní plodiny, napadá i brukvovité plevele, což její nebezpečnost ještě zvyšuje (Chytilová, 2007). Ačkoli neexistuje účinná chemická ochrana a patogen zamožuje půdu v podstatě trvale, nejedná se o karanténní organismus. V rámci ČR byly nalezeny různé patotypy patogena identifikované různými klasifikačními systémy při hranici 25 % pro rezistentní / náchylnou reakci diagnostických rostlin. Jedná se o patotypy 7, 2, 6, 4 a 1 dle Williamse, P3, P2, P5, P1 a P4 dle Somé, 16/14/31, 16/15/15, 16/15/31, 16/14/14, 16/22/30, 16/22/31, 16/31/12, 16/31/15, 16/3/15 a 16/14/14 dle ECD (Řičařová, 2016b).

## 2.3 Vývojový cyklus patogena

Vývojový cyklus začíná trvalou sporou, uvolněnou v půdě z nádoru. Pokud jsou vhodné podmínky - v okolí se vyskytují kořeny brukvovitých rostlin - spora vyklíčí a uvolní se zoospory. Ty jsou opatřeny bičkem a mohou se aktivně pohybovat ke kořeni. Dochází k primární infekci kořenového vlášení. V napadeném pletivu se tvoří mnohojaderný útvar, v něm se vyvíjejí spory. V této fázi se netvoří viditelné nádory na kořenech a fáze probíhá na všech brukvovitých rostlinách, odolných i náchylných (Chytilová, 2007). Spory



obsahují sekundární zoospory, které se znovu uvolní do půdy. Zde dojde ke splnutí zoospor a sekundárnímu napadení kořenů hostitele. Nyní jsou již napadány kořeny hlavní, vznikají mnohojaderné útvary, dochází ke zmnožení buněk, jejich zvětšení a tak ke tvorbě nádorů. Uvnitř buněk zasažených pletiv se začínají tvořit tlustostěnné trvalé spory, které se po odumření pletiva nádoru uvolňují do půdy (tamtéž). Pokud je rostlina k patogenu rezistentní, nedojde u ní k sekundárnímu napadení kořenů (primární napadení proběhne) a ke tvorbě nádorů s trvalými sporami. Kromě jasného přínosu rezistentních odrůd v udržení ekonomické výše výnosu semen působí tyto odrůdy také fyto-sanitárně, neboť vyprovokují trvalé spory k vyklíčení, nedojde však k ukončení vývojového cyklu, čímž jsou přirozeně snižovány počty trvalých spor v zamořené půdě (seminář, SPZO).

## 2.4 Aktuální možnosti ochrany

V současné době není registrován v České republice žádný přípravek k potlačení a likvidaci patogenu *P. brassicae*. Nejdůležitějším opatřením k omezení jeho šíření je prevence. Patogen se šíří především v důsledku častého zařazování brukvovitých plodin do osevního postupu (v intervalu kratším než 6 let) a nedostatečné likvidaci brukvovitých plevelů. V České republice byl jeho výskyt nejprve zaznamenán v oblastech s vysokým podílem pěstování brukvovité zeleniny. Na základě výzkumu z let 1984 až 1986 bylo zjištěno, že se nádorovitost vyskytuje prakticky na celém území (Rod, 1996). Projev patogenu na zamořených půdách je do jisté míry ročníkovou záležitostí. Obecně lze říci, že rozvoj podporuje přemokřená půda, nízké pH, malá provzdušněnost půdy a vyšší teploty (seminář, SPZO). Lokálním odvodňováním, pravidelným vápněním, udržováním půdy v dobré kondici a dodržováním vhodných osevních postupů lze rozvoji do jisté míry předejít (tamtéž). Pokud je pozemek již zamořen, je potřebné dodržovat preventivní opatření k zamezení a šíření na ostatní hony – čištěním použité zemědělské mechanizace od zbytků zeminy a pěstováním pouze rezistentních odrůd brukvovitých plodin (tamtéž). Právě uplatnění rezistentních odrůd se v současné době jeví jako nejlepší ochrana před zavlečením a šířením patogenu. V případě brukve řepky olejky jsou na trhu k dispozici některé hybridní odrůdy s rezistencí k *P. brassicae*. Je třeba ale také mít na paměti schopnost patogenu překonávat rezistenci vznikem nových patotypů (Diederichsen et al., 2014). Lze tedy očekávat, že v nejbližší době se

stane odolnost vůči *P. brassicae* jedním z důležitých šlechtitelských znaků a rezistence bude další běžnou vlastností moderních odrůd řepky, stejně jako nízký obsah kyseliny erukové a nízký obsah glukosinolátů.

## **2.5 Postup stanovení odolnosti testovaných genetických zdrojů (GZ)**

Pro screeningové hodnocení náchylnosti testovaných genotypů řepky k patogenu *P. brassicae* byl jako nejvhodnější postup vyhodnocen nádobový pokus s řízenou inokulací patogenem. Tento způsob je dostatečně vypovídající, při dodržení stanoveného metodického postupu. Také jeho časová a finanční náročnost je, ve srovnání s vedením pokusu v podmínkách infekčního pole, výrazně nižší. Zároveň je omezeno riziko šíření patogenu do okolního prostředí a zamořování půd.

### **2.5.1 Příprava GZ**

#### **2.5.1.1 Počet testovaných rostlin**

Testování GZ brukve řepky olejky na odolnost k napadení patogenem *P. brassicae* je nutno realizovat na větším počtu jedinců. Optimální počet testovaných rostlin je 40-50 v rámci jednoho testu. Za pomoci čítače semen, případně ručně, odpočítáme vzorek 50 semen s dobrou klíčivostí. Při zhoršené klíčivosti navýšíme úměrně počet semen ve vzorku.

#### **2.5.1.2 Testovací nádoby**

Pro testování odolnosti v podmínkách nádobového pokusu je potřebné zvolit vhodnou testovací nádobu. Musí splňovat požadavky na omezení možnosti kontaminace okolí únikem infikované vody nebo substrátu a zároveň musí umožnit napěstování dostatečného počtu rostlin a to po dobu minimálně 8 týdnů. Za tímto účelem bylo ověřováno použití květníků, sadbovačů, truhlíků a plastových neperforovaných přepravních beden. Květníky byly umístěny na podtác, stejně i sadbovače, truhlíky byly zkoušeny ve variantě perforované i

neperforované. Použití neperforovaných truhlíků bylo vyhodnoceno jako ne příliš vhodné, často dochází k přemokření a uhnívání rostlin, v důsledku zadržování přebytečné vody. Jako nejvhodnější nádoba se na základě výsledků testů jeví perforovaný truhlík s podmiskou, o délce minimálně 50 cm. Použití květníků a sadbovačů je možné, je však časově a prostorově náročnější. V tomto případě je třeba počítat s 50 květníky (buňkami) na jeden test a semena vysévat ručně po jednom. Během vegetace je tento systém více náchylný na nerovnoměrné rozložení vláhy: častější vysychání okrajových nádob nebo naopak skryté přemokřování.

### **2.5.1.3 Substrát**

Pokusné nádoby plníme běžným zahradnickým substrátem. Příklad perlitu je možný, ale není nezbytný, jeho použitím vzrůstají cenové náklady na realizaci pokusu. Z našich testů vyplývá, že není vhodné používat tentýž substrát opakovaně pro více testů a to především s ohledem na výživové poměry. Nádoby plníme substrátem asi 1-2 cm pod okraj, abychom omezili riziko vyplavování infikované zeminy při zalévání. Je vhodné vysévat semena bezprostředně po naplnění, do lehce vlhkého substrátu. Při jeho přeschnutí je náročné znovuobnovit optimálního vláhového poměru a je ohrožena rovnoměrnost vzcházení.

### **2.5.2 Výsev**

Výsev provádíme ručně. Pokusnou nádobu označíme nezaměnitelným identifikačním číslem vzorku na voděodolné a UV záření stabilní jmenovce. Substrát jemně utlačíme a urovnáme. V případě použití truhlíků vzorek předpřipravených semen (50 ks) rovnoměrně rozmístíme po povrchu sypáním z malého papírového sáčku. Do každé pokusné nádoby přisejeme 3-4 semena náchylného materiálu (viz pozitivní kontrola).

Vysetá semena zakryjeme vrstvou substrátu (asi 1 cm) a dlaní přitlačíme. Nádoby dostatečně zalijeme zahradnickou konví s jemným kropítkem a nakryjeme netkanou textilií bílé barvy.

### 2.5.2.1 Pozitivní kontrola

Jako pozitivní kontrolu doporučujeme použít osivo pekingského zelí Granaat. Jde o materiál velmi citlivý k infekci patogenem, používaný také při testování GZ brukvovité zeleniny. Díky své výrazné morfologické odlišnosti od řepky je velmi jednoduché jeho odlišení při hodnocení. Projevy infekce jsou u této odrůdy velmi zřetelné. Rostliny slouží jako kontrola správné inokulace a dostatečného infekčního tlaku patogenu.

### 2.5.2.2 Podmínky pro realizaci testu

Pokus realizujeme s ohledem na možnost rizika šíření patogenu do okolí, v pokud možno uzavřeném, řádně označeném prostoru, s dostatečným osvětlením a přiměřenou teplotou. Za tímto účelem je možné použít nevytápěný skleník s pasivním větráním. Termín realizace pokusu pak směřujeme do období březen – říjen, přihlížíme k požadavkům patogena na dostatečnou vlhkost a teplotu. V letních měsících je vhodné zastínit prostor bílou netkanou textilií, chladit pasivním větráním a kropením prostoru pro docílení vyšší vzdušné vlhkosti.

Po výsevu je nutné udržovat substrát v optimální vlhkosti. Zalévání realizujeme zahradnickou konví s jemným kropítkem. Není doporučeno zalévat přes netkanou textilií, hrozí riziko přemokření a rozvoje houbových chorob. Brukev řepka olejka snadno a rychle klíčí. V optimálních podmínkách a při dobré klíčivosti semen je pokus vzešlý po 4-5 dnech. V této době přistupujeme k inokulaci.

### 2.5.3 Příprava inokula

Odolnost GZ lze testovat buď proti jednotlivým patotypům patogenu *P. brassicae* (specifická rezistence) nebo proti patotypům ve směsi (obecná rezistence). Infekční materiál pro inokulaci vybíráme na základě tohoto zvoleného cíle testování.

Jako zdroj infekce používáme nádory z napadených rostlin. Pro realizaci prvních testů je třeba získat inokulum s ověřeným složením (dle zaměření). V našich pokusech byla použita směs nejběžnějších ras patogenu, poskytnutá z pracoviště VÚRV, Sekce aplikovaného výzkumu zelenin a speciálních plodin Olomouc. Následné přemnožení je již realizováno na pracovišti - jsou využívány

dobře vyvinuté nádory z testovaných rostlin a pozitivních kontrol. Pokud potřebujeme větší množství infekčních nádorů, je možno vyset do nádob (objem 10 l a více) pozitivní kontrolu a infikovat ji. Při opakovaném používání směsného inokula by mohlo dojít k vytěsnění některých původně přítomných ras. Je proto vhodné po několika cyklech znovu použít inokulum ověřeného složení. Kořeny odebraných rostlinomyjeme od zeminy, oddělíme nádory, a ihned zpracováváme. Pro přípravu inokula jsou vhodné dobře vyvinuté nádory z dostatečně silných kořenů řepky, ve fázi před jejich rozpadem.

### **2.5.3.1 Dlouhodobé uchovávání nádorů**

Nádory je možné také uchovávat pro pozdější použití. V tomto případě zasažená pletiva po omytí uložíme do označených PVC sáčků a neprodyšně uzavřeme. Sáčky uložíme při  $-18^{\circ}\text{C}$ . V našich pokusech jsme ověřili, že materiál lze takto uchovávat po dobu jednoho roku bez snížení životaschopnosti spor. V metodice (Chytilová, 2007) je vhodná doba uchování stanovena na 1-2 roky. Po rozmrazení je ale potřebné materiál ihned použít, opětovným zamrazením životaschopnost klesá.

### **2.5.3.2 Vlastní příprava inokula**

Příprava inokula je realizována podle modifikované metodiky (Castlebury, 1994). Čerstvé nebo rozmražené nádory zvážíme a odměříme vodu v množství 1000 ml na 100 g kořenů. Nejprve nádory mixujeme s menším množstvím připravené vody při nejvyšších otáčkách mixeru po dobu 3 minut. Získanou řídkou kaši naředíme zbylou vodou a filtrujeme do větší nádoby přes mušelínové plátno. Takto připravenou suspenzi použijeme přímo k inokulaci nebo ji můžeme uchovávat (viz. dlouhodobé uchovávání inokula). Pro dosažení stabilního počtu spor v inokulu je potřebné dodržet daný postup přípravy a používat dobře vyvinuté nádory sklizené v optimální době. Abychom dosáhly dostatečného infekčního tlaku patogenu, musí 1 ml inokula obsahovat  $10^5$ - $10^6$  spor. Je doporučeno po přípravě stanovit koncentraci spor v Bürkerově komůrce (Úprava dle Neubauera), nebo alespoň zkontrolovat stav spor vizuálně pod mikroskopem. Spory velké, malé nebo deformované jsou obvykle neživotaschopné. Při přípravě inokula dbáme na omezení rizika šíření patogenu kontaminací odpadních vod. Po ukončení práce je vhodné sterilizovat použité nástroje a desinfikovat zařízení 20% roztokem SAVO Original (chlornan sodný 47 g/kg) po dobu 20 minut, s následným opakovaným oplachem čistou vodou. I

přes tato opatření je doporučeno vyčlenit na pracovišti nástroje, nářadí i zařízení určené pouze pro práci s patogenem.

### **2.5.3.3 Dlouhodobé uchovávání inokula**

Pokud nepoužijeme připravené inokulum bezprostředně, lze jej skladovat v uzavřené plastové nádobě odpovídající velikosti v chladničce, při 4°C. Za těchto podmínek je doba použitelnosti inokula 1 rok, bez výraznějšího poklesu životaschopnosti spor (Chytilová, 2007). Pro potřeby realizace screeningových testů dle této metodiky je obvykle potřebné skladovat inokulum kratší dobu (cca 6 měsíců). V našich testech jsme používali inokulum uchovávané při 4°C po dobu půl roku a životaschopnost spor nebyla snížena. Je vhodné připravit inokulum z čerstvého nebo zamraženého materiálu před realizací prvních testů (březen-duben) v objemu dle plánované spotřeby pro daný vegetační rok a používat ho k následným testům. Po založení posledních testů (září) případné zbytky inokula likvidujeme.

### **2.5.3.4 Příprava inokulátů z jednotlivých patotypů patogenu *P. brassicae***

V případě, že se zaměřujeme na specifickou rezistenci vůči jednotlivým patotypům patogenu *P. brassicae*, dodržujeme při přípravě inokulazásady eliminace rizika vzájemné kontaminace patotypů. Jedná se o použití samostatných vysterilizovaných nádob na jednotlivé patotypy a sterilizaci společných nástrojů (např. mixérů, nádob, sít). Po oplachu čistou nekontaminovanou vodou necháme působit po dobu 20 minut 20% roztok SAVO Original (chlornan sodný 47 g/kg) a následně 3 × opláchneme destilovanou vodou respektive vodou nekontaminovanou patogenem *P. brassicae*.

### **2.5.4 Vlastní inokulace**

Ze vzešlých rostlin odstraníme netkanou textilií. Před inokulací má být substrát spíše suchý, aby nedošlo k následnému přemokření, proto několik dnů předem omezíme zálivku. Do kádinky vhodné velikosti odměříme množství inokula a naředíme vodou. Na jeden 50 cm truhlík použijeme 60 ml inokula zředěného 300 ml vody, tedy 7,2 ml zředěné suspenze na jednu rostlinu. Obsahem

rovnoměrně inokulujeme povrch substrátu v testovací nádobě. Vzhledem k poměrně velkému objemu zředěného inokula (360 ml) aplikovaného na plochu 825 cm<sup>2</sup> je zajištěna dostačující rovnoměrnost. Pokud potřebujeme aplikovat s větší přesností, použijeme dávky pipetou v objemu 7,2 ml ke kořenovým krčkům jednotlivých rostlin. Poté rostliny zalejeme konví s růžicí neinokulovanou vodou, čímž dosáhneme rovnoměrnějšího rozmístění spor v profilu substrátu a spory se proplaví blíže kořenovému vlášení. Po inokulaci již rostliny nezakrýváme textilií.

Po dobu 7-8 týdnů udržujeme substrát přiměřeně vlhký, snažíme se vyhnout vyschnutí. Monitorujeme výskyt škůdců, případně realizujeme insekticidní zásahy. V období 4-5 pravých listů je většinou vhodné rostliny přihnojit dusíkatým hnojivem, zohledňujeme při tom výživovou kapacitu použitého substrátu. Pro účely hodnocení je optimální dopěstovat silné rostliny s šířkou kořenového krčku 4mm a více. Příznaky napadení jsou na nich nejvíce patrné. S ohledem na omezenou velikost pokusné nádoby toho ale ne vždy můžeme dosáhnout. I výrazně menší rostliny jeví známky napadení kořenového systému, hodnocení je ale náročnější.

Po 8 týdnech od inokulace náhodně odebereme několik testovaných rostlin, včetně rostlin pozitivní kontroly a zjistíme zasažení kořenů nádory. Vlivem vnějších podmínek (teplota, vlhkost, pH, velikost rostlin), se vizuální projevy napadení kořenů mohou projevit až později. Pokud je zaznamenán výskyt nádorů na rostlinách, přistupujeme k hodnocení.

#### **2.5.4.1 Inokulace jednotlivými patotypy patogenu *P. brassicae***

Při inokulaci jednotlivými patotypy sledovaného patogenu (specifická rezistence) musí být opět dodržovány zásady eliminace rizika vzájemné kontaminace. To znamená:

- pro zakládání testů vždy použít nový sterilní substrát,
- používat samostatné/oddělené nádoby včetně podmisek pro jednotlivé skupiny testovaných GZ a patotypy,
- zálivku provádět vodou nekontaminovanou patogenem *P. brassicae*,
- při zálivce a eventuálním přemísťování pokusných nádob zabránit možné vzájemné kontaminaci mezi jednotlivými patotypy zálivkovou vodou nebo substrátem.

## 2.5.5 Hodnocení odolnosti GZ k *P.brassicae*

Před vlastním hodnocením je vhodné nechat substrát více vyschnout. Rostlinu uchopíme pevně dvěma prsty těsně nad substrátem a opatrně ji vytrhneme, aby nedošlo k poškození kořenů. Druhou rukou přitlačujeme substrát v okolí kořenového krčku. Prsty jemně očistíme kořeny od zbytků substrátu. Pokud je substrát vlhčí, často ulpívá na kořenech. V tomto případě je vhodné kořeny omýt (ve větší nádobě s vodou, abychom omezili množství použité vody, nemyjeme pod proudem tekoucí vody) a zlehka osušit. Pokud je substrát přiměřeně suchý, není nutné rostliny mýt, pouze zlehka odstraníme zbytky substrátu, příznaky na kořenech jsou dobře patrné. Takto připravíme všechny testované rostliny jednoho genového zdroje. Zkontrolujeme, zda je zřetelné napadení i na kořenech pozitivní kontroly (pekingského zelí). Hodnocení provádíme použitím stupňů 0-1-2-3. Slovní popis použité škály je uveden v Tab.1.

Postup hodnocení výsledků testů specifické a obecné rezistence je shodný.

Tab.1: Hodnocení poškození kořenů (škála podle Kuginuki et al. 1999 )

Stupeň	Popis projevu
0	Kořeny zdravé, zcela bez nádorů a rozšíření
1	Na bočních kořenech se objevují rozšíření a malé nádory.
2	Boční kořeny jsou zasaženy nádory, začíná poškození hlavního kořene.
3	Nádorem zasažena celá kořenová soustava, hlavní kořen deformován.



Fotodokumentace jednotlivých stupňů poškození kořenové soustavy patogenem:

Obr.1: Stupeň 0 – zdravý kořen



Obr.2: Stupeň 1 – malé nádory na bočních kořenech



Obr.3: Stupeň 2 -velké nádory na bočních kořenech, zasažen i hlavní kořen



Obr.4:Stupeň 3- hlavní kořen zcela deformován



Obr.5:Srovnání stupňů napadení – zleva 0-1-2-3



Vyhodnotíme všechny rostliny jednoho GZ, rozdělíme podle stupňů a počty rostlin zaznamenejeme do tabulky.

Obr.6:Příklad vyhodnocení genového zdroje rozdělením dle dosaženého stupně



Na základě zjištěných dat vypočteme index napadení – DI (disease index). Je to průměrný výsledek intenzity napadení pro populaci rostlin vyjádřený jako procento možného maxima, podle vzorce (Strelkov, 2006):

$$DI = \frac{\sum(\text{počet rostlin ve stupni napadení} \times \text{číslo stupně}) \times 100}{\text{celkový počet hodnocených rostlin} \times 3}$$

Genotypy s velmi malou odolností k napadení mají DI větší než 80%, naopak materiály s vyšším až vysokým stupněm odolnosti DI menší než 20% (Chytilová, 2007).

Pro stanovení odolnosti GZ používáme škálu hodnot deskriptoru podle následující tabulky:

Tab.2: Hodnoty deskriptoru a stupeň odolnosti DI

Hodnota deskriptoru	Index napadení (DI)	Stupeň odolnosti
<b>9</b>	0% - 10%	Vyšší až vysoká odolnost
<b>8</b>	11% - 20%	
<b>7</b>	21% - 30%	Malá odolnost
<b>6</b>	31% - 40%	
<b>5</b>	41% - 50%	
<b>4</b>	51% - 60%	
<b>3</b>	61% - 70%	
<b>2</b>	71% - 80%	Velmi malá odolnost
<b>1</b>	81% - 100%	

## 2.6 Využití výsledků testování

Testování odolnosti GZ realizujeme opakovaně. Je nutné vyloučit vliv vnějších podmínek (teplota prostředí, vláhové poměry), případně rozdíly v kvalitě použitého inokula. Minimální počet hodnocení pro jeden genový zdroj jsou tři opakování. Výsledky (hodnoty deskriptoru) za uvedené období průměrujeme. Data pro položky řádné kolekce Národního programu vložíme do IS GRIN Czech. Zde jsou volně dostupná uživatelům GZ. Hodnocení šlechtitelských materiálů přinese cenné informace šlechtiteli pro objektivní posouzení kvality i pro rozhodování o dalších směrech šlechtitelské práce. Ač jsou v současnosti na trhu k dispozici materiály se zvýšenou odolností k *P. brassicae* hybridního původu, lze očekávat šlechtitelské aktivity i v oblasti liniových odrůd. Obsáhlá kolekce GZ brukve řepky olejky NP může potenciálně obsahovat materiály s vyšší odolností k napadení a tedy s přínosem pro šlechtitelské programy. Z tohoto důvodu je důležité položky hodnotit kontinuálně a v krátkém časovém horizontu.

### 3 NOVOST POSTUPŮ

Stanovení odolnosti GZ brukve řepky olejky k patogenu *P. brassicae* nebylo doposud pro položky kolekcí NP realizováno. Současně se vzrůstajícím tlakem patogena a jeho šířením v rámci České republiky je i pro šlechtitele velmi přínosné testovat svá novošlechtění na tuto vlastnost. Předložená metodika vychází z metodiky hodnocení náchylnosti brukvovité zeleniny k *P. brassicae* (Chytilová, 2007), je však modifikována a upravena pro potřeby hodnocení GZ brukve řepky olejky. Kurátorům kolekcí olejnin se tím otvírá možnost hodnotit položky na tuto vlastnost a tím umožnit uživatelům přístup k cenným datům.

### 4 POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika je prioritně určena kurátorům kolekcí genetických zdrojů olejnin a šlechtitelským pracovištím k otestování odolnosti materiálů k patogenu *P. brassicae*. Zde by se měla stát nedílnou součástí standardního hodnocení, výsledky budou veřejně přístupné uživatelům IS GRIN Czech a šlechtitelům přinesou cenné informace o vlastnostech rodičovských komponent i jejich vlastních novošlechtění. Dojde k uzavření Smlouvy o využití výsledků mezi tvůrci metodiky a koordinátorským pracovištěm NP, čímž bude zajištěna možnost využití výsledku pro testování GZ kolekcí brukve řepky olejky a bezplatnému zpřístupnění získaných dat uživatelům.

### 5 EKONOMICKÉ ASPEKTY

Jak již bylo zmíněno, v současné době není na trhu k dispozici žádná účinná chemická ochrana proti patogenu *P. brassicae* a preventivní opatření mají pouze podpůrný charakter. Jedinou účinnou cestou pro udržení produkce a k postupnému ozdravování zasažených ploch je pěstování odrůd k patogenu odolných. Pokud se podaří šlechtiteli skloubit dobrý výnos s vysokou odolností, bude mít nová odrůda vysoký potenciál uplatnění na trhu. Pro zemědělce hospodařící v zasažených oblastech se jedná dokonce o jedinou možnou cestu řešení situace, pokud se nechtějí zcela vzdát pěstování ekonomicky významné olejnin, jakou řepka je. Existuje předpoklad, že odolnost vůči patogenu *P. brassicae* bude postupně vnášena do všech nově tvořených odrůd, jako jedna z běžně požadovaných vlastností. Zároveň se jedná o ochranu bez použití

chemických látek, tedy bez negativního dopadu na životní prostředí. Testování odolnosti šlechtitelských materiálů i položek kolekcí výrazně urychlí vývoj odrůd odolných ke specifickým rasám patogena, a to i v případě vzniku ras nových.

V ČR je *P. brassicae* zasaženo cca 10% orné půdy (Řičařová, 2016c). Každoročně je řepkou oseto kolem 400 000 ha. Na 40 000 ha plochy by mělo být použito osivo rezistentních materiálů, aby byla udržena přiměřená výše výnosu. Vycházíme-li z průměrného výnosu 2,91 t/ha (ČSÚ, 2017) a výkupní ceny 9 404,57 Kč/t (AGROSERVER, 2017), znemožněním pěstování na zasažené ploše by klesly příjmy zemědělců o 1 095 milionů korun ročně. V současné době jsou v praxi využívány odolné hybridní odrůdy, jejich nabídka je však relativně omezená. Vytvořením odrůdy nové a jejím uplatněním na 5% zasažené plochy zajistíme celkové roční tržby okolo 54 mil. Kč.

Metodika testování odolnosti GZ je koncipována tak, aby náklady na realizaci, a to jak finanční, tak časové, byly co možná nejnižší. Vstupní náklady se týkají pořízení pokusných nádob, s předpokládanou životností minimálně 5 let. Při opakovaném použití (alespoň 12 krát) dosáhnou náklady na jeden test výše 10 Kč. Náklady na pořízení substrátu pro 50 cm truhlík jsou 10 Kč. Předpokládaná výše spotřeby energií a vody je odhadnuta na 5 Kč. Časová náročnost založení, vedení a vyhodnocení testu jednoho GZ dosáhne zhruba 30 minut. Osobní náklady pro technický personál činí asi 75 Kč. Náklady ve výši 10 Kč jsou odhadovány ve spojitosti s likvidací použitého infekčního materiálu a desinfekcí prostor. Celkové náklady na otestování jednoho GZ ve třech opakováních dosáhnou 330 Kč s DPH.



## 6 SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

AGROSERVER. řepka MATIF. 2017. [online].[Cit.17.9.2018]. Dostupné z: <https://www.agroserver.cz/repka-matif>

BURKI, F., Shalchian-Tabrizi, K., Minge, M., Skjæveland, Å., Nikolaev, SI, et al. Phylogenomics Reshuffle the Eukaryotic Supergroups. *PLoS ONE*. 2007, roč. 2, čís. 8: e790, s. e790. DOI: [10.1371/journal.pone.0000790](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000790)

CASTLEBURY. 1994. A Technique for the Extraction and Purification of Viable *Plasmodiophora brassicae* Resting Spores from Host Root Tissue

ČESKÝ STATISTICKÝ ÚŘAD. 2017 [online]. ČSÚ. [Cit.17.9.2018]. Dostupné z: <https://vdb.czso.cz>

DIXON, G. R. 2009a. The Occurrence and economic impact of *Plasmodiophora brassicae* and clubroot disease. *Journal of Plant Growth Regulation* 28. 194-202.

DIXON, G. R. 2009b. *Plasmodiophora brassicae* in its environment. *Journal of Plant Growth Regulation* 28. 212– 228.

DIEDERICHSEN, E., Frauen, M., Ludwig-Müller, J. 2014. Clubroot disease management challenges from a German perspective, *Canadian Journal of Plant Pathology* 36:sup1. 85-98.

HWANG, S. F., Strelkov, S. E., Feng, J., Gossen, B. D., Howard, R. J. 2012. *Plasmodiophora brassicae*: a review of an emerging pathogen of the Canadian canola (*Brassica napus*) crop. *Molecular Plant Pathology* 13(2). 105– 113.

CHYTILOVÁ, V. a DUŠEK, K. 2007. Metodika testování odolnosti brukvovitých plodin k nádorovitosti. VÚRV v.v.i.. s.10-11

KUGINUKI, Y., Hiroaki, Y., Hirai, M. 1999. Variation in virulence of *Plasmodiophora brassicae* in Japan tested with clubroot-resistant cultivars of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. spp. *pekinensis*). *Eur J Plant Pathol.* 105:327–332.

KŮDELA, V. 1999. České názvosloví chorob rostlin : studijní zpráva, Prag ÚZPI 75

ROD, J. 1996. Zprávy - původce nádorovitosti brukvovitých plodin. Brno: ÚKZUZ, 37 květen, roč. 1996, zvláštní číslo, s. 16-17

ŘIČAŘOVÁ, V. 2016a. Nádorovitosti kořenů brukvovitých na ozimé řepce – nový problém pro farmáře. Agromanual 5. 30-33

ŘIČAŘOVÁ, V., Kaczmarek, J., Strelkov, S.E. et al. Eur J Plant Pathol. 2016b. Pathotypes of *Plasmodiophora brassicae* causing damage to oilseed rape in the Czech Republic and Poland 145: 559. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0939-1>

ŘIČAŘOVÁ, V., Kazda, J., Baranyk, P., Ryšánek P. 2016c. Clubroot – an Emerging Disease Faced by Czech Oilseed Rape Growers, *Scientia agriculturae bohemica*, 47, 2016 (3): 105–112

STRELKOV, S.E., Tewari J.P., Smith-Degenhardt E. 2006. Characterization of *Plasmodiophora brassicae* populations from Alberta, Canada. *Can J Plant Pathol.* 28:467–474.

ZEHNÁLEK, P. 2018. Seznam doporučených odrůd řepky olejky 2017. ÚKZÚZ Brno. s. 21



## 7 SEZNAM VÝSLEDKŮ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY VYDÁNÍ METODIKY

KLÍMA M., Bělská K., Čurn V., Endlová L., Havlíčková L., Hejna O., Hilgert-Delgado A., Horáček J., Horák J., Jelínková I., Jozová E., Kučera V., Macháčková I., Plachká E., Poslušná J., Prášil I., Rychlá A., Řičica M., Šmirous P., Tyller V., Urban M., Větrovcová M., Vítámvás P., Vrbovský V. 2015. Výsledky a průběh programu Česká řepka v roce 2015. Sborník SPZO, Hluk 2015. 32 vyhodnocovací seminář, Hluk, 25.-26.11.2015. SPZO s.r.o., Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin, Praha. S. 47-53. ISBN 978-80-87065-64-8

KLÍMA M., Bělská K., Čurn V., Endlová L., Havlíčková L., Hejna O., Hilgert-Delgado A., Horáček J., Horák J., Jelínková I., Jozová E., Kučera V., MACHÁČKOVÁ I., Plachká E., Poslušná J., Prášil I., Rychlá A., Řičica M., Šmirous P., Tyller V., Urban M., Větrovcová M., Vítámvás P., Vrbovský V. 2016. Výsledky a průběh programu Česká řepka v roce 2016. Sborník SPZO, Hluk 2016. 33 vyhodnocovací seminář, Hluk, 23.-24.11.2016. SPZO s.r.o., Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin, Praha. S. 114-119. ISBN 978-80-87065-69-3

KLÍMA M., Bělská K., Bryxová P., Čurn V., Endlová L., Havlíčková L., Hejna O., Hilgert-Delgado A., Horáček J., Horák J., Jelínková I., Jozová E., Kučera V., Macháčková I., Plachká E., Poslušná J., Prášil I., Rychlá A., Řičica M., Šafář J., Šmirous P., Tyller V., Ulvrová T., Větrovcová M., Vítámvás P., Vrbovský V. 2017. Výsledky a průběh programu Česká řepka v roce 2017. Sborník SPZO, Hluk 2017. 34 vyhodnocovací seminář, Hluk, 22.-23.11.2017. SPZO s.r.o., Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin, Praha. S. 148-154. ISBN 978-80-87065-76-1

RYCHLÁ, A., Plachká E. 2017. Testování odolnosti řepky ozimé k *Plasmodiophora brassicae*. Úroda 12, roč. LXV, vědecká příloha, s. 343-346. ISSN 0139-6013



Tisk:

Náklad:

Tato publikace neprošla jazykovou úpravou.

Za věcnou a jazykovou správnost odpovídají autoři.

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

Purkyňova 10

764 01 Opava

Tel: +420 553 624 160

e-mail: [opava@oseva.cz](mailto:opava@oseva.cz)

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