národní
úložiště
šedé
literatury

Metodika hodnocení rezistence pšenice ke klasovým fuzariózám v polních podmínkách

Chrpová, Jana; Šíp, Václav; Štěrbová, Lenka; Sumíková, Taťána; Palicová, Jana
2015

Dostupný z http://www.nusl.cz/ntk/nusl-263436

Dílo je chráněno podle autorského zákona č. 121/2000 Sb.

Tento dokument byl stažen z Národního úložiště šedé literatury (NUŠL).

Datum stažení: 19.04.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní nusl.cz .

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Praha - Ruzyně

Metodika hodnocení rezistence pšenice ke klasovým fuzariózám v polních podmínkách

METODIKA PRO PRAXI

Ing. Jana Chrpová, CSc.

Ing. Václav Šíp, CSc.

Ing. Lenka Štěrbová, Ph.D.

Mgr. Taťána Sumíková, Ph.D.

Mgr. Jana Palicová, Ph.D.

Dedikace

Metodika vznikla s využitím podpory projektů MZe NAZV QJ 1210189 a MŠMT LD 14087.

Metodika je určena pro šlechtitelskou praxi. O uplatnění metodiky byla uzavřena smlouva s firmou SELGEN, a.s.

Metodika získala osvědčení o uznání uplatněné certifikované metodiky v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“ vydané Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským (UKZUZ 125096/2015).

Odborný oponent: RNDr. Ivana Polišenská, Ph.D., Agrotest fyto, s.r.o., Kroměříž.

Odborný oponent ze státní správy: Ing. Pavel Kraus, Ph.D., ÚKZÚZ, Národní odrůdový úřad, Brno.

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha 6 – Ruzyně, 2015

ISBN 978-80-7427-186-1

Metodika hodnocení rezistence pšenice ke klasovým fuzariózám v polních podmínkách

METODIKA PRO PRAXI

Ing. Jana Chrpová, CSc.

Ing. Václav Šíp, CSc.

Ing. Lenka Štěrbová, Ph.D.

Mgr. Taťána Sumíková, Ph.D.

Mgr. Jana Palicová, Ph.D.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha 6 – Ruzyně,

2015

Metodika hodnocení rezistence pšenice ke klasovým fuzariózám v polních podmínkách

Na základě zkušeností získaných při provádění testů rezistence ozimé a jarní pšenice ke klasovým fuzariózám v období 2000-2015, monitoringu původců klasových fuzarióz (2011 – 2014), dostupných literárních údajů a speciálních pokusů byly získány nové závěry a doporučení týkající se jak obecných hledisek, tak především vlastní metodiky testování v polních podmínkách. Předložená metodika obsahuje soubor poznatků a opatření směřujících ke zvýšení přesnosti testů rezistence ke klasovým fuzariózám určených především pro potřeby šlechtění.

Klíčová slova: pšenice, fuzariózy klasu, testování rezistence, metodika testů rezistence

Methodology of testing wheat resistance to Fusarium head blight under field conditions

This handbook brings new conclusions and recommendations concerning evaluation of resistance to Fusarium head blight. The presented findings are based on experience gained from the tests of disease resistance performed in the period 2002-2015, on results of monitoring of *Fusarium* pathogens (2011 – 2014), available literature and special experiments. This methodology is mainly aimed at increasing precision of tests of resistance to Fusarium head blight which will favourably impact on resistance breeding.

Key words: wheat, breeding and variety testing, Fusarium head blight, methodology of resistance tests

OBSAH

I. Cíl metodiky 3
II. Vlastní popis 3
1/Úvod 3
1.1. Monitoring výskytu klasových fuzarióz na území ČR 3
1.2. Genetika rezistence, šlechtění na rezistenci 4
2/Rozbor dostupných metod a popis doporučovaného postupu 5
2.1. Metody testování rezistence a možnosti jejich uplatnění 5
2.1.1. Aplikace inokula do klasů formou postřiku suspenzí spór 5
2.1.2. Bodová infekce – point inoculation, single floret 6
2.1.3. Využití přirozené infekce v provokačních podmínkách 7
2.2. Výběr patogenů a izolátů pro polní infekční testy, příprava inokula 7
2.3. Hodnocení rezistence 8
2.4. Hodnocení šlechtitelských materiálů v raných generacích po křížení 11
III. Srovnání novosti přístupů a metodická doporučení pro hodnocení rezistence k fuzarióze klasu 12
IV. Popis uplatnění certifikované metodiky 13
V. Ekonomické aspekty 13
VI. Seznam použité literatury 13
VII. Seznam publikací, které předcházely metodice 15

I. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je podat souhrn dostupných poznatků a předložit doporučení využitelná při hodnocení rezistence ke klasovým fuzariózám v polních podmínkách pro potřeby šlechtění.

II. VLASTNÍ POPIS

1/Úvod

Klasové fuzariózy patří k závažným chorobám obilnin. Jejich význam v současné době narůstá v souvislosti s ústupem od klasických osevních postupů a se zvýšeným používáním minimalizačních technologií zpracování půdy. Kromě toho, že v důsledku napadení dochází ke snížení kvality zrna a k výnosovým ztrátám, produkují houby rodu *Fusarium* mykotoxiny, které mají negativní vliv na zdraví lidí a hospodářských zvířat. Legislativní limity maximálního obsahu fuzáriových toxinů v obilovinách jsou následující: deoxynivalenol (DON) – 1,25 $mg.kg^{-1}$; zearalenon (ZEA) – 0,1 $mg.kg^{-1}$ pro nezpracované obiloviny kromě pšenice tvrdé, ovsa a kukuřice s účinností od 1.7. 2006. Pro ostatní mykotoxiny nejsou limity stanoveny. Mezi významné původce klasových fuzarióz ve střední Evropě patří *F. graminearum, F. poae, F. culmorum* a *F. avenaceum*.
Bylo prokázáno, že dodržování doporučených opatření, jejichž součástí je i pěstování odrůd s vyšším stupněm rezistence a cílená fungicidní ochrana, přináší úspěch v boji proti patogenům z rodu *Fusarium* a hraje významnou roli v udržování hladin mykotoxinů na hodnotách neohrožujících zdraví člověka ani zvířat. Stále platí (Mesterházy et al., 2015), že základem úspěchu ve šlechtění na rezistenci k fuzarióze klasu je vhodná volba rodičů do křížení a následné výběry v segregujících generacích. V současné době jsou k dispozici nové poznatky vycházející z monitoringu výskytu klasových fuzarióz a z polních a skleníkových pokusů, které proběhly v rámci řešení projektu QJ 1210189 a LD 14087.

1.1. Monitoring výskytu klasových fuzarióz na území ČR

Na základě dlouhodobé studie (2004-2014) uskutečněné ve spolupráci VÚRV, v.v.i. a ÚKZÚZ (dříve Státní rostlinolékařská správa) bylo zjištěno, že výskyt klasových fuzarióz je významně ovlivněn průběhem počasí v daném ročníku. Z hlediska srážek je pro rozvoj infekce a akumulaci mykotoxinů rozhodující období 10, popř. 20 dní před kvetením a dále i období těsně po infekci.
Bylo zjištěno, že na území ČR existují oblasti s každoročním výskytem klasových fuzarióz (především kraje Zlínský, Moravskoslezský a Olomoucký). Nadlimitní hodnoty byly často zjištěny v blízkosti říčních toků a rybníků. Pro rozvoj choroby a akumulaci mykotoxinů má pravděpodobně velký význam vzdušná vlhkost (mlhy, rosa). Výskyt nadlimitních hodnot byl zaznamenán v oblastech s průměrnou roční teplotou vyšší než 6 °C. Opakovaně byl prokázán zhoršující vliv kukuřice jako předplodiny.
V tabulce 1 je shrnuta frekvence výskytu původců klasových fuzarióz v posledních čtyřech letech. Dlouhodobě byl považován za hlavního původce klasových fuzarióz u pšenice ve střední Evropě druh *Fusarium culmorum* (Wisniewska et al., 2014). Zřejmě v důsledku klimatických změn se postupně hlavním původcem klasových fuzarióz u pšenice stává *Fusarium graminearum* (Sýkorová et al., 2003; Šíp et al., 2008; Polišenská et al., 2010). Za povšimnutí stojí, že v ročnících 2012 a 2013 bylo u pšenice zjištěno vysoké zastoupení *F. poae* (Chrpová et al., 2015) a podobný trend byl zaznamenán i v roce 2014 (Tabulka 1). Podle nejnovějších poznatků (Covarelli et al., 2015) dochází k většímu zastoupení *F. poae*

u pšenice především v ročnících, které jsou nepříznivé pro výskyt *F. graminearum* (tedy v relativně sušších ročnících).

Tabulka 1 Frekvence výskytu původců klasových fuzarióz v ročnících 2011-2014

	2011		2012		2013		2014		průměr
Fusarium species	n	%	n	%	n	%	n	%	%
F. graminearum	64	50,8	27	22,5	39	33,3	20	17,1	30,9
F. poae	39	30,9	112	93,3	55	47,0	55	47,0	54,6
F. culmorum	32	25,4	3	1,7	3	2,6	6	5,1	8,7
F. avenaceum	4	3,2	7	5,8	10	8,5	15	12,1	7,4
F. sporotrichioides	1	0,8	1	0,8	0	0,0	0	0	0,4
F. equisetti	1	0,8	5	4,2	0	0,0	3	2,6	1,9
F. langsethiae	0	0,0	0	0,0	1	0,8	0	0	0,2

1.2. Genetika rezistence, šlechtění na rezistenci

Rezistence obilnin ke klasovým fuzariózám je polygenně založená a má různé komponenty. Nejprve byla popsána rezistence k invazi patogena (typ I) a rezistence k šíření infekce v klasu (typ II) (Schroeder a Christensen, 1963). Později byly definovány další komponenty (typy) rezistence (Mesterházy 1995, 2002). Za nejdůležitější považujeme následující typy rezistence: I - rezistence k napadení (invazi patogena); II - rezistence k šíření patogena; III - rezistence k infekci zrna; IV - tolerance; V - rezistence k akumulaci mykotoxinů. Při napadení fuzariózou klasu hrají významnou roli i tzv. *mechanismy pasivní rezistence* (výška rostliny, hustota klasu, typ kvetení).

Schroeder a Christensen (1963) uváděli, že reakce na inokulaci prováděnou postřikem konidií do klasů vypovídá o rezistenci typu I a reakce na infekci prováděnou vnesením inokula do kvítku (single floret inoculation) souvisí s rezistencí typu II. Nové výsledky výzkumu (Mesterházy et al., 2007) však ukazují, že inokulace postřikem pokrývá všechny komponenty rezistence. Rezistence typu II se podle tohoto výzkumu na celkové rezistenci podílí 30-40%. Stále probíhá hledání zdrojů rezistence využitelných ve šlechtění. Zdroje s vysokým stupněm rezistence (u pšenice např. odrůda Sumai 3) jsou sice dostupné, ale v mnoha evropských šlechtitelských programech bylo prokázáno, že kombinování vysoké úrovně rezistence s vysokou produktivitou a zvláště s potravinářskou jakostí zrna je velmi obtížné.

Jako perspektivní pro rozvoj šlechtění na rezistenci k fuzarióze klasu se jeví využití molekulárních metod. Vzhledem k tomu, že se jedná o kvantitativně založenou rezistenci, jde o využití QTL (quantitative trait loci – lokusy kvantitativních znaků), které byly detekovány na různých chromozomech. Údaje o QTL pro rezistenci a o jejich přínosu pro rezistenci jsou dnes k dispozici pro řadu zdrojů rezistence (Buerstmayr et al., 2009).

I přes současný rozvoj molekulárních metod je hodnocení rezistence k fuzarióze klasu v polních podmínkách stále nezbytnou součástí šlechtitelského procesu stejně jako stanovení obsahu DON v zrnu po infekci u pokročilejších materiálů.

2/Rozbor dostupných metod a popis doporučovaného postupu

2.1. Metody testování rezistence a možnosti jejich uplatnění

2.1.1. Aplikace inokula do klasů formou postřiku suspenzí spór

Aplikaci inokula je třeba provádět v době květu (nejvíce citlivé stadium pro infekci). Pro rozvoj infekce je vhodné využití závlahy.

2.1.1.1. Infekce cíleně vybraných klasů: Pro zvýšení přesnosti je doporučováno infikovat 10 vybraných klasů suspenzí spór ve fázi 65 - střed kvetení (Zadoks et al., 1974). Doporučená koncentrace spór je $0{,}8 \times 10^7$/ml. Po aplikaci inokula je vhodné překrýt klasy na 24 hodin polyetylénovým sáčkem, aby byla zajištěna konstantní vysoká vlhkost i ochrana před případnými srážkami nebo závlahou, které by mohly infekcí smýt (Obr. 1).

Obr. 1 Umělá infekce s využitím polyetylénových sáčků

Výhodou metody je možnost dosáhnout vysokých hodnot obsahu DON, což umožňuje lépe posoudit odrůdové rozdíly v rezistenci k této chorobě. Metoda je při podpoření infekce mikrozávlahou úspěšná při různém průběhu počasí. Tuto metodu lze použít pro hodnocení rezistence typu I (k napadení) i rezistence typu II (k šíření patogena) (Miedaner, 2004). Metoda je pro svou jednoduchost velmi rozšířená na řadě pracovišť. Nevýhodou metody je malý objem získaného zrna pro analýzy.

2.1.1.2. Plošná infekce parcel: Umělá infekce postřikem suspenzí spór by měla být provedena opakovaně (obvykle 2x), aby byly infekcí pokryty všechny klasy, které nakvétají postupně. První inokulace by měla být provedena v počátku květu (BBCH 61-64), další inokulaci je třeba opakovat týden po první. U menších parcel se doporučuje překrytí polyetylénovou folií, aby byla zajištěna konstantní vysoká vlhkost. U pokusů s větším rozsahem to není možné. Použití závlahy představuje vždy výhodu. Předností metody je získání velkého množství zrna pro analýzy.

2.1.2. Bodová infekce – point inoculation, single floret

Suspense spór je aplikována do klasů mikropipetou (Obr. 2). Pro inokulaci je doporučováno využít střední kvítek ve středu klasu (Yabwalo et al., 2011). Někdy se doporučuje využít pro inokulaci 2 kvítky, dle našich zkušeností je pro sledování rozvoje infekce dostatečné provést inokulaci do 1 kvítku. Metoda je používána pro detekci rezistence k šíření patogena (rezistence typu II) nebo pro přesné studie, neboť je přesně známý objem inokula aplikovaný do klasu. Doporučovaná koncentrace je 3 x10^4 – 8 x 10^7 spór/ml. Výhodou je přesnost, nevýhodou je velká pracovní náročnost a to, že metoda nepostihuje rezistenci typu I, tedy rezistenci k napadení. Je získán malý objem zrna pro analýzy.

Bodová infekce může být prováděna také jako tzv. “Cotton method”, kdy je inoculum do kvítku vnášeno pomocí malého smotku vaty. Nevýhodou této metody je určitá nestandardnost, tj. není známý přesný objem inokula. Výhodou je označení bodu infekce.

Obr. 2 Bodová infekce s použitím pipety

Obr. 3 Bodová infekce s použitím “cotton method”

2.1.3. Využití přirozené infekce v provokačních podmínkách

Je využívána přírodní infekce v podmínkách podporujících rozšíření fuzáriové infekce: po předplodině kukuřici při minimalizovaném zpracování půdy. Přirozené podmínky je vhodné doplnit o rozhoz kukuřičných zbytků.
Metoda nejlépe imituje přirozený způsob infekce, ke kterému dochází v zemědělské praxi. Mohou se zde uplatnit i mechanismy pasivní rezistence jako např. hustota klasu, výška rostliny, postavení listů. Ke zvýšení efektivnosti metody přispívá použití závlahy pro podpoření rozvoje infekce.

Polní infekční testy *vs.* přirozená infekce

V rámci spolupráce VÚRV, v.v.i. a ÚKZÚZ byl vytvořen postup hodnocení rezistence pšenice k fuzarióze klasu, jimž jsou hodnocena novošlechtění v registračním řízení a odrůdy doporučené pro pěstování v zemědělské praxi. Postup zahrnuje 2 metody: resistence se hodnotí pomocí umělé aplikace inokula do klasů v době květu (viz kapitola 2.1.1) a pomocí přirozené infekce v provokačních podmínkách (kapitola 2.1.3).
Výhodou pokusů s umělou infekcí je možnost dosáhnout vysokých hodnot obsahu DON, což umožňuje lépe posoudit odrůdové rozdíly v rezistenci k této chorobě. Tato metoda, vyvinutá a aplikovaná ve VÚRV, je navíc při podpoření infekce mikrozávlahou úspěšná při různém průběhu počasí. Využití přírodní infekce v provokačních podmínkách (předplodina – kukuřice a minimalizované zpracování půdy pro hodnocení rezistence odrůd) imituje nejlépe přirozený způsob infekce, ke kterému dochází v zemědělské praxi. Metoda je více zranitelná v důsledku nepříznivých povětrnostních podmínek. Podle získaných výsledků jsou oběma metodami detekovány shodně odrůdy s vyšším stupněm rezistence a náchylné odrůdy (Chrpová et al., 2008). Rozdíly v hodnocení rezistence oběma metodami jsou částečně způsobeny uplatněním *mechanismů pasivní rezistence* při využití přirozené infekce v provokačních podmínkách.

2.2. Výběr patogenů a izolátů pro polní infekční testy, příprava inokula

Na základě opakovaných studií byla potvrzena obecná a trvalá rezistence k patogenům z rodu *Fusarium* (Hollins et al., 2003; Mesterházy et al., 2005).
Pokud není cílem sledovat určitý kmen nebo druh fuzária, je prováděna obvykle inokulace aplikací izolátu jednoho z dvou rozhodujících druhů klasových toxigenních fuzárií (hlavních producentů DON): *Fusarium graminearum* nebo *Fusarium culmorum* popř. směsí obou těchto u nás nejrozšířenějších druhů (Tvarůžek a kol., 2012). Na základě poznatků o zastoupení fuzáriových patogenů v posledních letech (viz. kapitola 1.1.) je možno doporučit, aby zvláště při hodnocení šlechtitelských materiálů byla využita směs izolátů *F. graminearum, F. culmorum* a *F. poae*, která nejvíce odpovídá reálnému výskytu. V provedené studii (Chrpová et al., 2015) bylo navíc zjištěno, že směsné inokulum se zastoupením více druhů fuzáriových patogenů zvyšuje potenciál produkce DON, neboť ve vzorcích zrna z pokusů infikovaných směsným inokulem byl detekován vyšší obsah DON než ve vzorcích napadených pouze *F. graminearum* nebo *F. culmorum*.
Toto doporučení je v souladu s již dříve publikovaným doporučením (Šíp et al., 2008), kdy pro zpřesnění a urychlení detekce odrůdové rezistence bylo zjištěno jako prospěšné zahrnutí více izolátů (vybraných na základě předložených charakteristik) používaných pro simultánní inokulace a i ve směsi. Detailní příprava inokula je popsána v metodice Tvarůžek a kol. (2012).

2.3. Hodnocení rezistence

Hodnocení symptomů v klasech

Obvyklé je hodnocení ve 3 termínech (v 7denních intervalech) se začátkem 14. den po infekci (možno hodnotit i dříve – od objevení příznaků). Výsledné symptomatické hodnocení prováděné po ukončení infekční doby (obvykle 28. popř. 35. den po inokulaci) vychází z procenta napadení klasů a intenzity symptomatické reakce:

- Symptomatické hodnocení je možno vyjadřovat jako % napadení klasu.
- Pro hodnocení může být využita devítibodová stupnice ÚKZÚZ, kdy 9 < 5 %, 8 = 5–17 %, 7 = 18–30 %, 6 = 31–43 %, 5 = 44–56 %, 4 = 57–69 %, 3 = 70–82 %, 2 = 83–95 % a 1 > 95 % napadení klasu.
- Může být použita i stupnice, kterou navrhl Mesterházy (1987), kdy 0 = rezistentní (R), 4 = náchylná (S). Použití této stupnice je vhodné zvláště při hodnocení kříženců v rámci štěpící populace.
- Rezistence odrůdy může být posuzována také podle hodnot AUDPC, což je plocha pod křivkou průběhu choroby, získaná na základě 3 – 5 opakovaných měření (Shaner & Finney, 1977). Místo hodnocení AUDPC je možno použít průměr symptomatického hodnocení ve všech termínech.
- Při hodnocení umělé i přirozené infekce v porostu je třeba hodnotit výskyt choroby (incidence), který je ovlivněn především rezistencí k napadení (typ I) a rozvoj napadení (severity), který má vztah k rezistenci k šíření patogenu (typ II) (Bai & Shanner, 1994).

Hodnocení dalších znaků ovlivněných infekcí

Po sklizni jsou hodnoceny další znaky (% fuzariózou poškozených zrn – obr. 4) a redukce výnosových znaků vzhledem k neinfikované kontrole. Mesterházy et al. (2005) prokázal statisticky významnou korelaci mezi % fuzariózou poškozených zrn a obsahem DON a zdůrazňuje význam stanovení % fuzariózou poškozených zrn a obsahu DON ve šlechtění i při hodnocení zdrojů rezistence.

Obr. 4 Stanovení % fuzariózou poškozených zrn: vlevo mírně rezistentní odrůda, vpravo náchylná odrůda

Obr. 5 Hodnocení symptomů fuzariózy klasu - stupnice ÚKZÚZ

Stanovení obsahu DON

- Finančně i časově jsou nejnáročnější chromatografické metody. Používá se kapalinová chromatografie (HPLC/UV) a v poslední době s využitím univerzální hmotnostní detekce dochází k rozvoji multitoxinových metod, kdy je možné stanovit vedle sebe desítky až stovky toxinů produkovaných fuzárii i jinými patogeny. Chromatografické metody se používají pro přesné konfirmační analýzy
- Pro rutinní provozní stanovení nebo při využití ve šlechtitelském procesu je vhodné imunochemické stanovení metodou ELISA s využitím komerčních kitů (R-Biopharm, Neogen, Romer Labs aj.). Výhodou těchto testů je rychlost stanovení a možnost provádět testy bez nutnosti velkých investic do laboratorního vybavení v porovnání s chromatografickými metodami. Nevýhodou je omezené množství informací o výskytu dalších toxinů v zrnu (nutné použít více testů).
- Od 1. 1. 2003 podléhá veškerá manipulace s trichothecenovými toxiny povolení Státního úřadu pro jadernou bezpečnost (SÚJB) podle zákona č. 281/2002 Sb. o zákazu biologických a toxinových zbraní a vyhlášky č. 74/2013 Sb. Trichotheceny jsou v příloze tohoto zákona zařazeny do skupiny vysoce rizikových toxinů. Vzhledem k tomu, že v zákoně není stanoven žádný limit pro plnění této povinnosti, podléhá povolení SÚJB i manipulace s malým množstvím analytického standardu deoxynivalenolu, který je potřeba pro výše uvedené metody. Stanovení obsahu DON pomocí imunoafinitní chromatografie (často nazývané lateral flow testy nebo strip testy) je alternativou k imunochemickému. Tato metoda má díky své jednoduchosti a rychlosti (výsledek ze vzorku zrna je k dispozici během 15min.) velký potenciál využití zejména ve výkupních organizacích. Ve šlechtění umožňuje analyzovat větší objemy šlechtitelského materiálu (Chrpová a kol., 2010).

Další znaky se vztahem k rezistenci

Níže uvedené znaky přispívají k pasivní rezistenci. Významně se projevují např. u odrůdy Bohemia, která má schopnost akumulovat v příznivých podmínkách velké množství DON, ale díky dlouhému stéblu a řidšímu klasu je schopna dobře odolávat infekci.

Výška rostliny: Vyšší rostliny mají větší šanci uniknout infekci. Výška rostliny se tedy podílí na rezistenci typu I - k napadení a přispívá též ke snížení vlhkosti v klasu, tím se vytvářejí méně příznivé podmínky pro patogena. Orientaci pouze na výběr vysokých rostlin však nelze doporučit, neboť v moderní pěstitelské praxi se lépe uplatňují odrůdy se středním nebo krátkým stéblem (Bürstmayr et Bürstmayr, 2015).
Ve VÚRV, v.v.i. byl u souboru 100 odrůd pšenice ozimé hodnocen vliv přítomnosti genu krátkostébelnosti *Rht-D1b* (*Rht 2*) na rezistenci k fuzarióze klasu (Tabulka 2). Odrůdy s tímto genem krákostébelnosti (pocházejícím z odrůdy Norin 10) byly v průměru o 7,7 cm kratší. Rozdíl v ranosti zjištěn nebyl. Odrůdy s genem *Rht-D1b* celkově vykazovaly nižší úroveň rezistence. Na rozdíl od kategorie *Rht-D1a* nebyly detekovány odrůdy vykazující mírnou rezistenci a 56 % odrůd bylo náchylných k fuzarióze klasu. Nejvyšší úrovně rezistence dosáhly ve skupině odrůd s genem *Rht-D1b o*drůdy Evina, Chevalier a Julie (zařazené do kategorie MR-M).

Tabulka 2. Vliv přítomnosti alelické formy *Rht-D1b* na výšku, ranost a rezistenci k fuzarióze klasu (MR=mírná rezistence, M=střední stupeň, MN=mírná náchylnost, N=náchylnost)

				rezistence k fuzarióze klasu				
Alelická forma	počet odrůd	průměrná výška	ranost	MR	MR-M	M	MN	N
Rht- D1b (Rht 2)	36	86,4	151,5	0	3	5	8	20
Rht D1a	64	94,1	151,6	11	7	20	17	9

Typ kvetení: Podle údajů z literatury při uzavřeném kvetení dochází k menší infekci klasovými fuzariózami (Gilsinger et al., 2005; Kubo et al., 2010). Ochranný charakter má i úplná extruze (vystrčení) tyčinek (Kubo et al., 2010 aj.), neboť zhoršuje podmínky pro růst houby v klasu. Ve VÚRV, v.v.i. byl hodnocen vztah extruze tyčinek k napadení klasu u 121 odrůd. Bylo zjištěno statisticky nevýznamně lepší symptomatické hodnocení u odrůd s úplnou extruzí tyčinek.

Typ klasu: K šíření patogena také přispívá hustota klasu. U odrůd s dlouhým a řídkým klasem dochází k menšímu rozvoji napadení fuzariózou klasu. Podle hypotézy A. Mesterházyho (1995) osinatost přispívá ke zvýšení rizika infekce fuzariózou klasu. Výsledky jiných autorů však tuto hypotézu nepotvrdily (Bürstmayr et Bürstmayr, 2015). Ve studii provedené ve VÚRV (Chrpová et al., 2011) byla osinatost významně spojena s nižším obsahem DON i nižším symptomatickým hodnocením, zvláště u kříženců Sumai3/SG-S 191-01. Jednalo se zřejmě o efekt genetické vazby s rezistencí z odrůdy Sumai3 a nikoliv o efekt vlastní osinatosti.

2.4. Hodnocení šlechtitelských materiálů v raných generacích po křížení

V rámci šlechtitelského procesu je rezistence k fuzarióze klasu obvykle hodnocena až od generace F5. Již v generaci F1 však lze zjistit specifickou kombinační schopnost rodičů (donorů rezistence k fuzarióze klasu) a vybrat rodičovské kombinace perspektivní pro dosažení požadované úrovně rezistence k fuzarióze klasu.

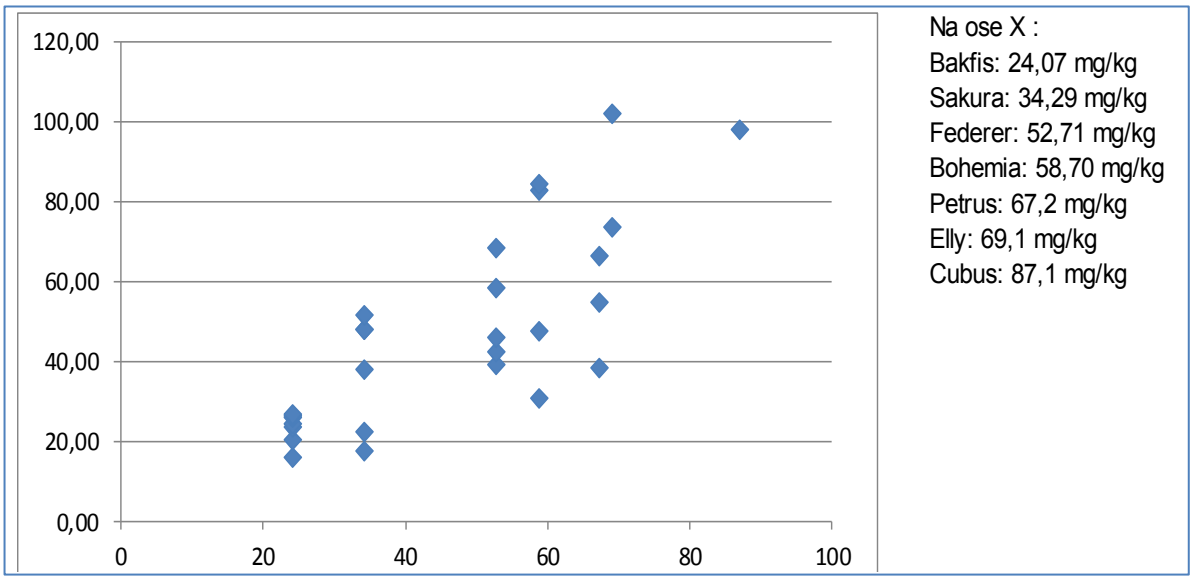
Poznatky vycházejí ze 4 nezávislých pokusů uskutečněných v Praze – Ruzyni, kdy bylo hodnoceno 28 kříženců F1 generace získaných v polovičním dialelním systému 8 x 8: Sakura/Federer, Sakura/Bakfis, Sakura/Petrus, Sakura/Elly, Sakura/Bohemia, Sakura/Biscay, Cubus/Sakura, Federer/Bakfis, Federer/Petrus, Federer/Elly, Federer/Bohemia, Federer/Biscay, Federer/Cubus; Petrus/Bakfis, Bakfis/Elly, Bakfis/Bohemia, Bakfis/Biscay, Cubus/Bakfis; Petrus/Elly, Petrus/Bohemia, Petrus/Biscay, Petrus/Cubus; Bohemia/Elly, Biscay/Elly, Cubus/Elly; Biscay/Bohemia, Cubus/Bohemia, Cubus Biscay). Spolu s kříženci byly hodnoceny rodičovské odrůdy. Po infekci byl sledován rozvoj napadení v klasu (% napadených klásků v klase) a po sklizni byl stanoven obsah DON v zrnu metodou ELISA.

Na základě získaných výsledků jsme dospěli k následujícím závěrům:

- Ve všech pokusech se projevil silný negativní heterózní efekt vzhledem k průměru rodičů. Zjištěný obsah DON byl ve všech případech s výjimkou jednoho kříženců (Cubus/Bohemia) nižší než očekávaný obsah DON. Toto zjištění se jeví jako perspektivní z hlediska odolnosti hybridní pšenice k fuzarióze klasu. Poučné je rovněž porovnání stanoveného obsahu DON kříženců s průměrným obsahem DON lepšího rodiče. Graf 1 ukazuje vyrovnaně nízký obsah DON u kříženců s odrůdou Bakfis (bod 24,1 mg/kg na ose x), zatímco podstatně vyšší variabilitu v obsahu DON u kříženců s obdobně mírně rezistentními odrůdami Sakura, Federer nebo Petrus. Obsah DON všech 7 kříženců s odrůdou Bakfis se pohyboval v rozmezí 16,0-26,8 mg/kg (celkový průměr kříženců byl 47,2 mg/kg). Toto zjištění je možno považovat za velmi závažné a podložené i výsledky analýz kombinačních schopností.

- Po hodnocení vybraných 15 kříženců v generaci F2 (opakovaně ve dvou ročnících) byla prokázána korelace mezi výsledky zjištěnými v generaci F1 a v generace F2. Na základě získaných výsledků byl potvrzen přínos odrůdy Bakfis jakožto donora rezistence. U této odrůdy byla obecná kombinační schopnost pro obsah DON i symptomatické hodnocení (SH) nejvyšší a vysoce významná. Kříženci s odrůdou Bakfis vykazovaly vysoké procento požadovaných odolných materiálů (ve stupních 9, 8 a 7). Jde především o potomstva pocházející z křížení rodičů vykazujících mírnou odolnost (Sakura/Bakfis, Petrus/Bakfis, Federer/Bakfis, Sakura/Petrus), ale 25-30% materiálů této kategorie bylo možno také detekovat u kříženců odrůdy Bakfis s náchylnými odrůdami Cubus a Biscay, u kterých byla prokázána vysoká specifická kombinační schopnost jak pro odolnost k akumulaci DON, tak pro odolnost vůči napadení klasu. Výsledky těchto šetření dokládají opodstatněnost (možnost predikce) analýz v generaci F1.
- Pokusy ukázaly, že pro získání nezkreslených odhadů kombinačních schopností jsou potřebné víceleté výsledky a vysoce důležité je prokázání stability projevu v různém prostředí. Pro tyto účely se ukazují jako zvláště cenné pokusy probíhající v podmínkách silného infekčního tlaku.

Graf 1. Porovnání skutečného obsahu DON (mg/kg) křížence k obsahu DON lepšího rodiče (osa x)



III. SROVNÁNÍ NOVOSTI PŘÍSTUPŮ A METODICKÁ DOPORUČENÍ PRO HODNOCENÍ REZISTENCE K FUZARIÓZE KLASU

Na základě nových poznatků o zastoupení patogenů, metodách infekce a hodnocení rezistence v raných generacích bylo možno formulovat následující doporučení využitelné při hodnocení rezistence k fuzarióze klasu ve šlechtitelském procesu:

- Pro hodnocení rezistence ve šlechtění je vhodné využít pro umělou infekci postřik suspenzí spór do klasů – jedná se o spolehlivou metodu, kterou je možné infikovat velké množství materiálů. Využití závlahy je vždy výhodou. U pokročilých šlechtitelských materiálů je dobré využít i přirozenou infekci nejlépe na lokalitě s dlouhodobě vysokým výskytem fuzarióz, v ideálním případě na poli s využitím minimalizovaného zpracování půdy po předplodině kukuřici. Tímto způsobem je možno zohlednit i přínos *mechanismů pasivní rezistence* (vysoké stéblo, řídký klas).

- Přes opakovaně zjištěnou statisticky významnou korelaci obsahu DON s ostatními znaky charakterizujícími rezistenci (symptomatické hodnocení, % fuzariózou poškozených zrn, redukce výnosových prvků) je stanovení obsahu DON nezbytnou součástí hodnocení rezistence.

- Odrůdy s genem *Rht-D1b* (*Rht 2*) celkově vykazují nižší úroveň rezistence. Bylo zjištěno, že i mezi nositeli tohoto genu lze nalézt odrůdy, které můžeme hodnotit jako odrůdy se střední až mírnou rezistencí.

- Pro umělou infekci ve šlechtění na rezistenci k fuzarióze klasu se jeví jako perspektivní využití směsi různých druhů fuzáriových patogenů (*F. graminearum, F. culmorum, F. poae*, popř. i *F. avenaceum*).

- Volba vhodné rodičovské odrůdy (s vysokou obecnou kombinační schopností) může významně ovlivnit úspěšnost šlechtění na rezistenci k této chorobě. Analýzy kříženců v generaci F1 mají význam zvláště v případě, kdy nemáme k dispozici údaje o rezistenci rodičovských odrůd k fuzarióze klasu. Na základě získaných údajů o rezistenci můžeme posoudit perspektivu kombinace křížení z hlediska rezistence k fuzarióze klasu.

- Zjištění, že v generaci F1 v důsledku heterózního efektu dochází k nižší kumulaci DON v zrnu i k menšímu výskytu symptomů představuje perspektivu pro šlechtění hybridní pšenice.

IV. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika testování rezistence pšenice ke klasovým fuzariózám je určena především šlechtitelským pracovištím. Částečné využití popsaných metod a postupů je možné i v odrůdovém zkušebnictví. Získání co nejpřesnějších údajů o rezistenci odrůd k fuzarióze klasu je nezbytné pro zajištění účinnější ochrany v zemědělské praxi.

V. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Předpokládané ekonomické přínosy a další přínosy jsou obtížně vyčíslitelné. Získané výsledky, tj. detekce rezistentních materiálů se promítnou do tržeb budoucích uživatelů v delším časovém horizontu (až po vyšlechtění a registraci odrůd s rezistencí). Kalkulace je tedy určitým odhadem, který však vychází z reálného předpokladu za současného stavu. Tím je uplatnění odrůd obilnin se zvýšenou rezistencí na 10 % osevních ploch obilovin, tj. na 140 tis. ha. Pěstování rezistentních odrůd představuje ochranné opatření, které zamezí ztrátám na výnosech, které činí v průměru 4,2 %. V porovnání se sortimentem stávajících odrůd lze předpokládat výnos o 4,2 % vyšší než je průměrný výnos. Bereme-li tedy jako základ výnos 5 t/ha, pak dosáhneme výnosu 5,21 t/ha. Při ceně 4 000 Kč za 1 t obilovin lze celkové tržby za 1 rok kalkulovat na 10 % celkové plochy obilovin ve výši 2,9 mld. Kč. Ještě obtížněji ekonomicky zhodnotitelný, ale ve své podstatě nejzávažnější, je přínos pro ochranu zdraví lidí i hospodářských zvířat v souvislosti se snížením akumulace mykotoxinů v zrnu pšenice.

VI. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Bai G., Shanner G. (1994): Scab of wheat: prospects for control. Plant Disease 78: 760-766.

Buerstmayr H., Ban T., Anderson J.A. (2009): QTL mapping and marker-assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat: a review. Plant Breeding 128: 1-26.

Buerstmayr M., Buerstmayr H. (2015): Comparative mapping of quantitative trait loci for Fusarium head blight resistance and anther retention in the winter wheat population Capo × Arina. Theoretical and Applied Genetics 128: 1519-1530.

Covarelli L., Beccari G., Prodi A., Generotti S., Etruschi F., Juan C., Ferrer E., Mañes J. (2015): Fusarium species, chemotype characterisation and trichothecene contamination of durum and soft wheat in an area of Central Italy. Journal of the Science of Food and Agriculture 95: 540-551.

Gilsinger J, Kong L, Shen X, Ohm H (2005): DNA markers associated with low Fusarium head blight incidence and narrow flower opening in wheat. Theoretical and Applied Genetics, 110: 1218-1225.

Hollins T.W., Ruckenbauer P., DeJong H. (2003): Progress towards wheat varieties with resistance to Fusarium head blight. Food Control, 14: 239-244.

Chrpová J., Šíp V., Matějová E. (2008): Resistance of winter wheat varieties to Fusarium head blight under the conditions of natural and artificial infection. Cereal Research Communications, 36 (Suppl. B): 595-596.

Chrpová J., Šíp V., Sedláček T., Štočková L., Veškrna O., Horčička P. (2011): Effectiveness of marker-based selection for Fusarium head blight resistance in spring wheat. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 47 (spec.iss.): 123-129.

Chrpová J., Šíp V., Sumíková T., Salava J., Štočková L., Džuman Z., Hajšlová J. (2015): Occurrence of Fusarium species and mycotoxins in wheat grain collected in the Czech Rep. World Mycotoxin Journal. DOI: http://dx.doi.org/10.3920/WMJ2015.1917

Chrpová J., Šíp V., Štočková L., Milec Z., Bobková L. (2010): Resistance of winter wheat varieties registered in the Czech Republic to Fusarium head blight in relation to the presence of specific Rht alleles. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 46(3): 122-134.

Kubo K., Kawada N., Fujita M., Hatta K., Oda S., Nakajima T. (2010): Effect of cleistogamy on Fusarium head blight resistance in wheat. Breeding Science, 60: 405-411.

Mesterházy Á. (1987): Selection of head blight resistant wheats through improved seedling resistance. Plant Breed., 98: 25-36.

Mesterházy Á. (1995): Types and components of resistance to Fusarium head blight of wheat. Plant Breeding, 114: 377-386.

Mesterházy Á. (2002): Theory and practice of the breeding for Fusarium head blight resistance in wheat. Journal of Applied Genetics, 43A: 289-302.

Mesterházy Á., Bartók T., Kászonyi G., Varga M., Tóth B., Varga J. (2005): Common resistance to different Fusarium spp. causing Fusarium head blight in wheat. European Journal of Plant Pathology, 112: 267-281.

Mesterházy A., Buerstmayr H., Tóth B., Lehoczki-Krsjak Sz., Szabó-Hevér A., Lemmens M. (2007): An improved strategy for breeding FHB resistant wheat must include Type I resistance. Proc. of the 5th Canadian Workshop on Fusarium Head Blight, Delta Winnipeg, 51-66.

Mesterházy Á., Varga M., György A., Lemmens M., Tóth B. (2015): Improvement of variety registration system in wheat: role of FHB traits, inoculation methods and the problem of DON overproduction. In: Fanelli, F., Somma S. (eds.), 13th European Fusarium Seminar. 10-14 May 2015, Martina Franca, Apulia, Italy: 79.

Miedaner T. (2004): Plant breeding as a tool for reducing mycotoxins in cereals. In: Barug, D., van Egmond, H., López-Garcia R., van Osenbruggen, R., Visconti A. (eds.), Meeting of Mycotoxin Menace, pp. 89-111. Wageningen Acad. Publ., The Netherlands.

Polišenská I., Jirsa O., Salava J., Matušinský P., Prokeš J. (2010): Fuzáriové mykotoxiny a patogeny Fusarium v obilovinách sklizně roku 2009. Obilnářské listy, 18: 12-16.

Shaner G., Finney R.E. (1977): The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. Phytopathology 67**:** 1051-1056.

Schroeder H.W., Christensen J.J. (1963): Factors affecting the resistance of wheat to scab caused by Gibberella zeae. Phytopathology, 53: 831-838.

Sýkorová S., Šíp V., Nevrklová M., Sypecká Z., Hajšlová J., Hýsek J. (2003): The survey of Fusarium mycotoxins content in grain of winter wheat cultivars collected from different regions of Czech Republic. In: Pogna, N.E., Romano, M., Pogna, E.A., Galterio, G. (eds.) Proceedings of the10th International Wheat Genetics Symposium. September 1-6, 2003. Paestum, Italy, pp. 1266-1268.

Šíp V., Chrpová J., Sýkorová S. (2008): Assessing resistance to head blight in wheat cultivars inoculated with different Fusarium isolates. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 44: 43-59.

Tvarůžek L., Matušinský P., Vyšohlídová M. (2012): Metodika pro zakládání a hodnocení pokusů s umělou inokulací obilnin fuzáriózami klasů. Agrotest fyto s.r.o. ISBN 978-80-87555-09-5, 16 pp.

Wisniewska H., Stepien L., Waskiewicz A., Beszterda M., Góral T., Belter J. (2014): Toxigenic Fusarium species infecting wheat heads in Poland. Central European Journal of Biology, 9: 163-172.

Yabwalo D.N., Mergoum M., Berzonsky W.A. (2011): Further characterization of the scab resistance of ´Frontana´ spring wheat and the relationships between resistance mechanisms. Plant Breeding 130, 521-525.

Zadoks J.C., Chang T.T., Konzak C.F. (1974): A decimal code for the growth of cereals. Weed Research, 14, pp. 415-421.

VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Chrpová J., Šíp V., Matějová E. (2008): Resistance of winter wheat varieties to Fusarium head blight under the conditions of natural and artificial infection. Cereal Research Communications, 36 (Suppl. B): 595-596.

Chrpová J., Šíp V., Sedláček T., Štočková L., Veškrna O., Horčička P. (2011): Effectiveness of marker-based selection for Fusarium head blight resistance in spring wheat. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 47 (spec.iss.): 123-129.

Chrpová J., Šíp V., Sumíková T., Salava J., Štočková L., Džuman Z., Hajšlová J. (2015): Occurrence of Fusarium species and mycotoxins in wheat grain collected in the Czech Rep. World Mycotoxin Journal. DOI: http://dx.doi.org/10.3920/WMJ2015.1917

Chrpová J., Šíp V., Štočková L., Milec Z., Bobková L. (2010): Resistance of winter wheat varieties registered in the Czech Republic to Fusarium head blight in relation to the presence of specific Rht alleles. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 46(3): 122-134.

Chrpová J., Štočková L., Sumíková T., Veškrna O., Sedláček T., Řehořová K. & Horčička P. (2011): Využití metody imunoafinitní chromatografie pro stanovení obsahu deoxynivalenolu v zrnu obilovin, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 10 pp.

Šíp V., Chrpová J., Sýkorová, S. (2008): Assessing resistance to head blight in wheat cultivars inoculated with different Fusarium isolates. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 44: 43-59.

Autoři:
Ing. Jana Chrpová, CSc. (40%)
Ing. Václav Šíp, CSc. (20%)
Ing. Lenka Štěrbová, Ph.D. (20%)
Mgr. Taťána Sumíková, Ph.D. (10%)
Mgr. Jana Palicová, Ph.D. (10%)

Název: Metodika hodnocení rezistence pšenice ke klasovým fuzariózám v polních podmínkách

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně

Redakce: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně

Náklad: 60 výtisků

Vydáno bez jazykové úpravy

Metodika poskytnuta bezplatně

Kontakt na autora: chrpova@vurv.cz

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha 6 – Ruzyně, 2015

ISBN 978-80-7427-186-1