národní
úložiště
šedé
literatury

**Metodika testování rezistence pšenice k původcům hnědých listových skvrnitostí v polních podmínkách**

Šíp, Václav; Chrpová, Jana; Palicová, Jana; Hanzalová, Alena; Čejka, Lubomír

2014

Dostupný z http://www.nusl.cz/ntk/nusl-181086

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

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

Datum stažení: 02.05.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní nusl.cz .

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

# Metodika testování rezistence pšenice k původcům hnědých listových skvrnitostí v polních podmínkách

METODIKA PRO PRAXI

**Ing. Václav Šíp, CSc.**

**Ing. Jana Chrpová, CSc.**

**Mgr. Jana Palicová, Ph.D.**

**Mgr. Alena Hanzalová, Ph.D.**

**Ing. Lubomír Čejka**

**Dedikace**

Metodika je výstupem řešení projektu MZe ČR QJ1210189, z kterého byly získány potřebné finanční prostředky.

Metodika je určena pro šlechtitelskou a zemědělskou 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 097712/2014).

**Odborný oponent**: Prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc., Česká zemědělská univerzita, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Praha 6 – Suchdol.

**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, 2014

ISBN: 978-80-7427-163-2

# Metodika testování rezistence pšenice k původcům hnědých listových skvrnitostí v polních podmínkách

METODIKA PRO PRAXI

**Ing. Václav Šíp, CSc.**

**Ing. Jana Chrpová, CSc.**

**Mgr. Jana Palicová, Ph.D.**

**Mgr. Alena Hanzalová, Ph.D.**

**Ing. Lubomír Čejka**

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

2014

**Metodika testování rezistence pšenice k původcům hnědých listových skvrnitostí v polních podmínkách**

Na základě zkušeností získaných při provádění kruhových testů rezistence ozimé a jarní pšenice k hnědým listovým skvrnitostem v období 2002-2014, dostupných literárních údajů a speciálních pokusů s braničnatkou pšeničnou v rámci výzkumného projektu QJ 1210189 byly získány nové závěry a doporučení týkající se jak obecných hledisek (biologických a genetických zvláštností jednotlivých původců hnědých listových skvrnitostí, struktury jejich populací, vztahu hostitel – patogen, průběhu infekce, škodlivosti aj.), tak především vlastní metodiky testování v polních podmínkách, speciálně výběru izolátů pro inokulace, uspořádání a vedení pokusů, přípravy inokula a provádění inokulace, jakož i hodnocení stupně napadení (projevu infekce). Pozornost se soustředila na tři hlavní původce, kterými jsou v České republice *Mycosphaerella graminicola* anam. *Septoria tritici, Pyrenophora tritici – repentis* anam. *Drechslera tritici-repentis* a *Phaeosphaeria nodorum* anam. *Stagonospora nodorum.* Předložená metodika obsahuje komplex opatření směřujících ke zvýšení přesnosti testů rezistence k těmto listovým chorobám pro potřeby šlechtění, zkoušení odrůd i racionalizaci ochranných opatření v pěstitelské praxi.
**Klíčová slova**: pšenice, šlechtění a zkoušení odrůd, braničnatka pšeničná, braničnatka plevová, helmintosporiová skvrnitost, testování rezistence, optimalizace postupů.

**Methodology of testing wheat resistance to brown leaf spot diseases under field conditions**

This handbook brings new conclusions and recommendations concerning mainly the field resistance tests - the choice of fungal isolates, design of experiments, inoculum preparation and inoculation technique, as well as evaluation of disease symptoms and tolerance to the disease. Attention was paid to the pathogens *Mycosphaerella graminicola* anam. *Septoria tritici, Pyrenophora tritici – repentis* anam. *Drechslera tritici-repentis* and *Phaeosphaeria nodorum* anam. *Stagonospora nodorum* that showed frequent occurrence in the examined territory. The presented findings are based on experience gained from the ring tests of disease resistance performed in the period 2002-2014, available literature and special experiments with *Septoria tritici* performed within the research project QJ QJ 1210189 This methodology is mainly aimed at increasing precision of tests of resistance to these diseases which will favourably impact on resistance breeding, variety testing, as well as on adequacy of plant protection measures taken in agricultural practice.
**Key words:** wheat, breeding and variety testing, leaf blotch, glume blotch, tan spot, methodology of resistance tests.

**OBSAH**

I. Cíl metodiky ..... 4
II. Vlastní popis ..... 4
1. Úvod ..... 4
1.1. Monitoring výskytu hnědých listových skvrnitostí na území ČR ..... 4
1.2. Obecná charakteristika jednotlivých patogenů ..... 5
1.3. Genetika rezistence, šlechtění na rezistenci ..... 8
2. Rozbor dostupných metod a popis doporučeného postupu ..... 9
2.1. Metody testování rezistence a možnosti jejich uplatnění ..... 9
2.2. Výběr izolátů pro polní infekční testy ..... 10
2.3. Kultivace patogenů a příprava inokula ..... 16
2.4. Uspořádání polních pokusů s umělou inokulací a její technika ..... 17
2.5. Hodnocení stupně napadení a redukce výnosových znaků ..... 19
III. Srovnání novosti přístupů a metodická doporučení pro testování rezistence k hnědým listovým skvrnitostem ..... 25
IV. Popis uplatnění certifikované metodiky ..... 27
V. Ekonomické aspekty ..... 27
VI. Seznam použité literatury ..... 28
VII. Seznam publikací, které předcházely metodice ..... 30

## I. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je navrhnout na základě výsledků pokusů, které proběhly v rámci řešení projektu QJ 1210189, jakož i nejnovějších literárních poznatků efektivní postup testování rezistence pšenice k hlavním původcům hnědých listových skvrnitostí v polních podmínkách pro potřeby šlechtění a odrůdového zkušebnictví – optimalizaci pěstebních technologií odrůd. Metodika zohledňuje specifika tří hlavních původců hnědých listových skvrnitostí a detailně se zaměřuje na testování rezistence k braničnatce pšeničné (*Septoria tritici*), jejíž význam na našem území trvale narůstá a problémy jsou vzhledem k prokázání specifických odrůdových reakcí zvláště aktuální. Cílem metodiky bylo také navrhnout vhodné varianty testovacích postupů pro použití v různých etapách procesu šlechtění a zkoušení odrůd.

## II. VLASTNÍ POPIS

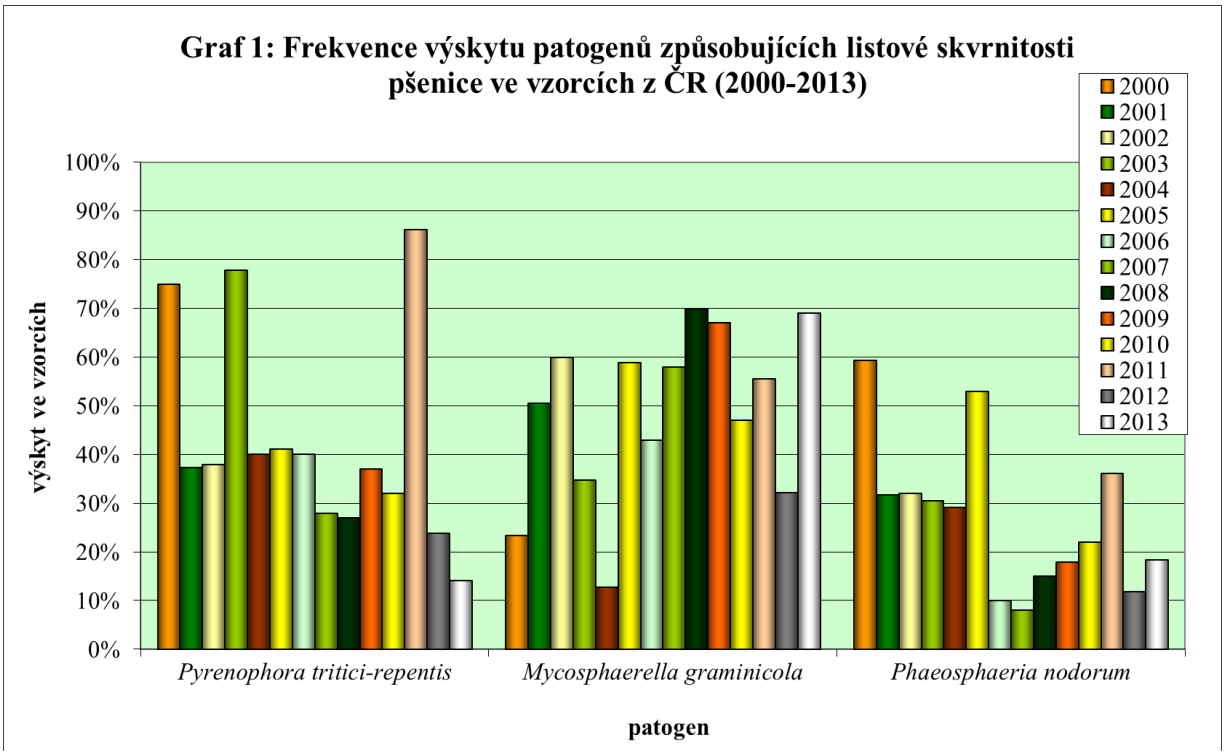
# 1. Úvod

### 1.1. Monitoring výskytu hnědých listových skvrnitostí na území ČR

Hnědé listové skvrnitosti patří k významným chorobám pšenice. Identifikace jednotlivých původců hnědých listových skvrnitostí je v terénních podmínkách obtížná, proto se často v polních podmínkách popisují a hodnotí jako jeden komplex. Skvrny na listech obilnin mohou být způsobeny různými patogeny, hlavními původci listových skvrnitostí u nás i v ostatních evropských státech jsou braničnatka pšeničná (*Mycosphaerella graminicola,* anam. *Zymoseptoria tritici* dříve *Septoria tritici)*, braničnatka plevová (*Phaeosphaeria nodorum,* anam. *Parastagonospora nodorum,* dříve *Stagonospora nodorum=Septoria nodorum*) a helmintosporiová skvrnitost *(Pyrenophora tritici-repentis,* anam. *Drechslera tritici-repentis).* Na listech se objevují i další původci houbových chorob, *Cochliobolus sativus* (anam. *Bipolaris sorokiniana*) a *Didymella exitialis* (anam. *Ascochyta* sp.). Na nekrotických skvrnách odumřelého listového pletiva se ještě během vegetace mohou vyskytovat také saprofytické druhy rodů *Alternaria, Cladosporium, Epicoccum, Stemphylium* a dalších.

Ve VÚRV, v.v.i. je dlouhodobě (v letech 2000 - 2013) prováděn průzkum listových vzorků pšenice z celého území ČR. Smyslem tohoto průzkumu je zjistit výskyt a významnost původců listových skvrnitostí, ukázat změny v jejich rozšíření a změny v jejich populacích v souvislosti se skladbou pěstovaných odrůd. Byly každoročně zpracovávány vzorky ozimé a jarní pšenice získané ze šlechtitelských stanic, zemědělských podniků, ze zkušebních pokusů ÚKZÚZ a z vlastních sběrů z různých lokalit České republiky. Výzkum potvrdil velký význam braničnatky pšeničné *(Mycosphaerella graminicola)* v našich podmínkách (**graf č.1**). *M. graminicola* byla od roku 2005 (s výjimkou r. 2011) nejhojnějším patogenem způsobujícím listové skvrnitosti pšenice v ČR. Původce světle hnědé skvrnitosti pšenice (*Pyrenophora tritici-repentis*) převládal v letech 2000, 2003, 2004 a 2011, v posledních dvou letech byl jeho výskyt nižší. *Phaeosphaeria nodorum* se vyskytovala ze sledovaných patogenů nejméně, avšak její výskyt přesto nelze pominout. V letech 2000 a 2005 byla zjištěna ve více než 50 % vzorků. Frekvence výskytu jednotlivých patogenů byla ovlivněna průběhem počasí v jednotlivých letech a na jednotlivých lokalitách a také obdobím sběru vzorků. V jarním období většinou v porostech převládala *Mycosphaerella graminicola*, teprve později se v případě příznivých klimatických podmínek rozvinula infekce *Pyrenophora tritici-repentis* a *Phaeosphaeria nodorum*. Obecně lze říci, že tyto tři patogenní druhy převládají i v jiných evropských státech.

**Z těchto dlouhodobých šetření vyplývá, že v současné době je v České republice, podobně jako v západní Evropě, nejškodlivějším původcem listových skvrnitostí braničnatka pšeničná, a to na úkor dříve široce rozšířené braničnatky plevové, která měla u nás největší význam v osmdesátých letech minulého století, zejména ve vyšších polohách. Výsledky průzkumu však také ukazují na značné kolísání v zastoupení nejzávažnějších patogenů v jednotlivých ročnících, a tudíž na potřebu modifikovat ochranná opatření s ohledem na dominantní výskyt patogena v určitém roce a zaměřit šlechtění na získání rezistence ke komplexu původců hnědých listových skvrnitostí.**




## 1.2. Obecná charakteristika jednotlivých patogenů

### <u>Taxonomie</u>

*Mycosphaerella graminicola*, *Pyrenophora tritici-repentis* i *Phaeosphaeria nodorum* jsou taxonomicky řazeny do třídy *Dothideomycetes*. Na základě molekulárních studií (Suetrong *et al*., 2009) je tato třída dělena na dvě podtřídy: *Dothideomycetidae*, kam patří rod *Mycosphaerella*, a *Pleosporomycetidae*, tam je řazen rod *Pyrenophora* i *Phaeosphaeria*. Podobnost obou braničnatek je tedy pouze morfologická, tvorba pyknid, symptomů na listech apod.

Rod *Septoria* historicky zahrnoval fytopatogenní druhy na širokém okruhu hostitelů. Quaedvlieg *et al*. (2011, 2013) studovali tento rod pomocí molekulárních metod a na základě fylogenetického stromu oddělili některé zástupce do příbuzných rodů. *Septoria tritici* je tedy nově *Zymoseptoria tritici*, *Stagonospora nodorum* (dříve *Septoria nodorum*) je nově *Parastagonospora nodorum*. V této práci je však většinou použito dosud i v použité literatuře převládající označení *Septoria tritici* a *Stagonospora nodorum*.

## Toxiny

*Pyrenophora tritici-repentis* produkuje hostitelsky specifické toxiny, které jsou odpovědné za tvorbu nekróz či chloróz. V současné době jsou popsány 3 Ptr toxiny (Ptr ToxA, Ptr ToxB, Ptr ToxC), které hrají důležitou roli v patogenezi (Strelkov & Lamari, 2003). Geny zodpovědné za syntézu těchto toxinů jsou vzájemně nezávislé. Pro toxiny Ptr ToxA a Ptr ToxB, které jsou proteinové povahy, byly již charakterizovány geny ToxA a ToxB. Lokus ToxA byl objeven i u *Phaeosphaeria nodorum* (SnToxA) a dokonce se předpokládá horizontální přenos genu z *P. nodorum* do *P. tritici-repentis* (Stukenbrock & McDonald, 2007).

## Biologie hub, podmínky šíření a škodlivost

**Tečkovaná listová skvrnitost pšenice – původce braničnatka pšeničná**
**(*Mycosphaerella graminicola,*** anam. ***Zymoseptoria tritici***, dříve ***Septoria tritici)***

Braničnatka pšeničná může v období s vyššími srážkami a nižšími průměrnými teplotami způsobit až 60% ztráty na výnosu. Choroba zapříčiněná touto houbou způsobuje předčasné stárnutí listových tkání. Na listech se vytvářejí oválné, zprvu šedozelené a později hnědnoucí ve středu světlejší skvrny, které se vyvíjejí do nepravidelných lézí. Na nich se tvoří světlé až tmavě hnědé pyknidy, z nichž se uvolňují pyknospory. Ty se na kratší vzdálenosti šíří rozstřikováním dešťovými kapkami. Pyknidy se většinou tvoří v řadách paralelních s nervaturou listu. Houba se při vhodných podmínkách může objevit již na podzim na vzcházejících ozimech. Zdrojem inokula mohou být kromě pšenice i jiné náchylné druhy (ječmen, tritikale, žito či plané druhy trav). Zdrojem primární infekce jsou posklizňové zbytky, na nichž na podzim dozrávají pseudothecia. Z nich se uvolňují askospory, které se dostávají na pšenici. Na podzim se choroba vyskytuje zejména na velmi časně setých porostech pšenice. Na jaře se tvoří na listech pyknidy s konidiemi. Infekce probíhá na listech, na nichž se udržuje vlhkost dostatečně dlouhou dobu (nejméně 20 hodin). Optimální teplota pro infekci je 20-25°C. Fungicidní ochrana se provádí podle signalizace od BBCH 37 do BBCH 51 většinou jako součást ochrany proti komplexu chorob.

Za epidemické šíření v jarním a letním období bývají zodpovědné asexuální pyknospory (konidiospory), rozšiřované dešťovými kapkami během vegetace. Na listech se vytvářejí hnědnoucí, ve středu světlejší skvrny, které často splývají, listy žloutnou a odumírají. V lezích se objevují za příznivých podmínek tmavohnědé až černé pyknidy, které bývají uspořádány v řadách podél žilnatiny. Vysoké teploty ve vegetačním období zpomalují růst mycelia; optimální teplotní rozmezí pro jeho růst je 17-20°C. Sucho a vysoké teploty na napadených rostlinách způsobují rychlejší nekrotizaci listů, úbytek asimilační plochy a odumírání rostliny.

Fungicidní ochrana se provádí podle signalizace od BBCH 37 do BBCH 51, většinou jako součást ochrany proti komplexu chorob. Pro řízení ochrany proti braničnatce pšeničné je velmi podstatné, že tzv. inkubační doba (období mezi proniknutím patogenního zárodku do rostlinného pletiva a prvním objevením se příznaků) je u tohoto patogena dlouhá 15–21 dní, u některých odrůd i 28 dní, zatímco u braničnatky plevové jen 7–14 dní. Závažným problémem je správné načasování fungicidního ošetření, s čímž souvisí potřeba identifikace meteorologických podmínek a časového momentu, kdy hrozí propuknutí epidemie. Při řešení fungicidní ochrany je také nezbytné respektování pravidel antirezistentní strategie, neboť byl v řadě zemí potvrzen výskyt populací rezistentních ke strobilurinům.

**Světle hnědá skvrnitost pšenice - Helmintosporiová skvrnitost**
***(Pyrenophora tritici-repentis* - PTR** anam. ***Drechslera tritici-repentis* - DTR**)

V posledních patnácti letech se u nás šíří světle hnědá skvrnitost působená touto houbou. Její celosvětové rozšíření na obilninách je přičítáno především nedodržování agrotechnických opatření jako je např. zaorávání posklizňových zbytků, střídání plodin, ale také zavádění bezorebných technologií. Této chorobě je věnována velká pozornost především v USA a Kanadě, kde je již řadu let vážným problémem. V Evropě nabývá *P. tritici-repentis* na významu teprve v posledních cca 15 letech. Poprvé byla u nás choroba zjištěna na Českomoravské vrchovině. V současné době je původce této choroby zvané anglicky "tan spot" (snědá skvrnitost), u nás poměrně hojným patogenem pšenice na celém území. K šíření choroby přispívá i široký hostitelský okruh patogena. Na skvrnách se tvoří konidiofory, které uvolňují asexuálně vznikající konidie, jimiž se patogen šíří. Patogen vytváří fyziologické rasy lišící se reakcemi na testovacím sortimentu. Rasy se identifikují podle toho, zda vytvářejí na testovacích odrůdách chlorózy, nekrózy nebo obojí. Fungicidní ošetření se provádí ve stádiu sloupkování až metání přípravky na bázi triazolů, strobilurinů aj.

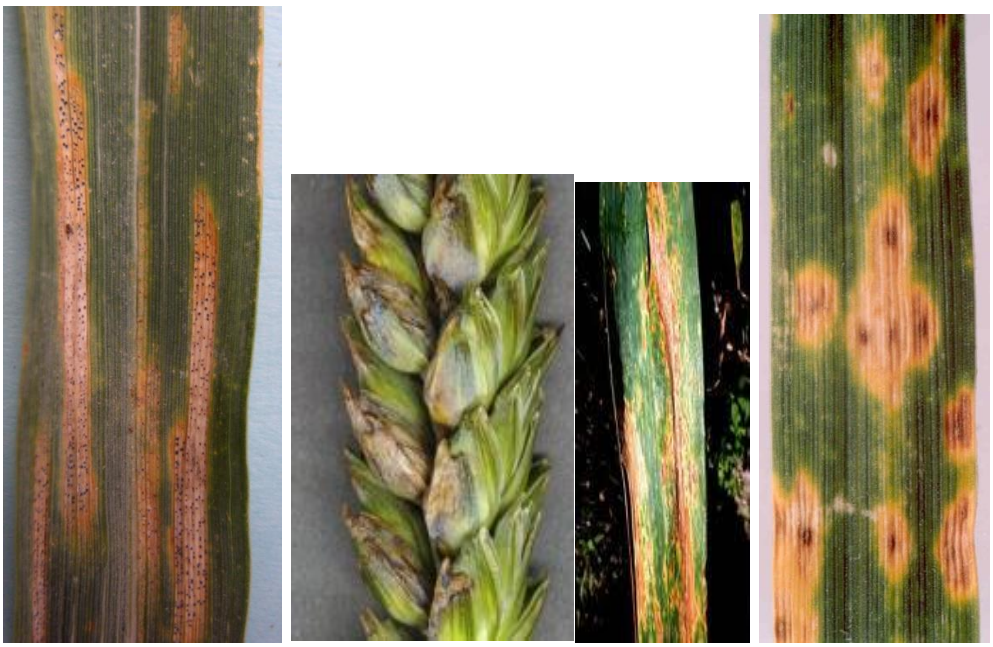
**Tečkovaná plevová a listová skvrnitost pšenice – původce braničnatka plevová**
(***Phaeosphaeria nodorum***, anam. ***Parastagonospora nodorum***, dříve ***Stagonospora nodorum, Septoria nodorum*)**

Zastoupení braničnatky plevové v posledních letech v celkovém napadení obilnin listovými skvrnitostmi klesá. Největší rozšíření této houby bylo u nás zaznamenáno v osmdesátých letech, a to zejména ve vyšších polohách s vyšší průměrnou vlhkostí vzduchu. Pro výskyt choroby je příznivé chladné jaro a vlhké teplé období v době tvorby zrna. Houba může napadat všechny zelené části rostliny. Charakteristické je napadení plev, podle kterého dostal patogen své jméno. Na jaře se na listech vyskytují nepravidelné světle hnědé skvrny zpravidla s chlorotickým okrajem. Chlorotické skvrny nekrotizují a splývají. Na starších listech jsou skvrny větší a mohou se na nich objevit pyknidy. Při vysoké vzdušné vlhkosti a optimální teplotě (18-22°C) se pyknospory tvoří již za 6 dnů po infekci. Pro infekci je nutné nejméně 20 hodin trvající ovlhčení listů. Patogen je přenosný i osivem, ale hlavním zdrojem infekce jsou posklizňové zbytky. Jako ochranné opatření proti přenosu osivem se doporučuje setí certifikovaného mořeného osiva. Fungicidní ošetření se provádí podle signalizace zpravidla od fáze BBCH 37 do fáze BBCH 61.

**<u>Výnosové ztráty působené těmito listovými patogeny</u>**

Za neextrémních podmínek se procentní redukce hmotnosti zrn na klas (HZK) působené těmito listovými patogeny v průměru pohybují v našich podmínkách kolem 16 % (Horčička *et al*., 2001; Šíp *et al*., 2003). Na základě nejnovějších zde popisovaných pokusů byly průměrné redukce HTZ po umělé inokulaci braničnatkou pšeničnou 14,4 % a redukce HZK 29,6 %. Značné rozdíly v redukci HTZ i HZK byly zjištěny mezi rezistentní odrůdou Arina (6,1 %, resp. 18,2 %) a náchylnou odrůdou Bakfis (22,7 %, resp. 36,5 %). Oproti udávané průměrné redukci HZK 16 % lze tak při dosažení mírné rezistence (Arina) snížit ztráty na 9,6 % (o více než 40 %). U náchylných odrůd lze očekávat přibližně 20% redukci.

**Obr. 1.** Typické příznaky nákazy třemi u nás nejrozšířenějšími patogeny působícími hnědé listové skvrnitosti



***Septoria tritici*** ***Stagonospora nodorum*** ***Pyrenophora tritici-repentis***

### 1.3. Genetika rezistence, šlechtění na rezistenci

Šlechtění na rezistenci k původcům hnědých listových skvrnitostí je zvláště obtížné vzhledem k polygennímu genetickému založení rezistence a potřebě získat kombinovanou odolnost k hlavním původcům této choroby.

Z četných studií vyplývá, že rezistence je podmíněna jak rasově specifickými geny velkého účinku (izolátově specifická rezistence je „téměř kompletní“ a oligogenně založená), tak nespecifickými geny pro parciální rezistenci. Je také obecně známo, že nespecifická (polygenní) rezistence je trvalejšího charakteru než rezistence rasově specifická, a tudíž šlechtitelsky potřebnější, i když obtížněji dosažitelná.

Bylo detekováno a zmapováno celkem 18 genů (*Stb*) podmiňujících rezistenci k napadení braničnatkou pšeničnou (*M. graminicola*), z nichž zvláště *Stb6* a *Stb15* jsou běžné v sortimentu evropských odrůd pšenice (přítomny např. v testované rezistentní odrůdě Arina). Genetické založení rezistence projevující se u rostlin v dospělosti je však dosud nedostatečně objasněno (Risser *et al*., 2011). V nádobových pokusech i v polních podmínkách byly prokázány specifické interakce mezi odrůdami a různými izoláty *M. graminicola*. Tyto specifické interakce fungují zřejmě na základě mechanismu gen proti genu, ve kterém je pro každý gen řídící rezistenci v hostiteli odpovídající gen pro avirulenci v patogenu. Chartrain *et al*. (2004) pokusně prokázali, že parciální rezistenci k napadení braničnatkou pšeničnou je třeba testovat v dospělosti, neboť vazbu s parciální rezistencí juvenilních rostlin se mnohdy nepodařilo prokázat.

Nejnovější poznatky o genetickém založení rezistence k braničnatce plevové (*S. nodorum*) a k *Pyrenophora tritici – repentis* (PTR) jsou dostupné v publikacích Francki (2013) a Faris *et al*. (2013). Tyto nekrotrofní houby produkují některé ekonomicky významné efektory (hostitelsky specifické toxiny), které jsou předmětem zájmu výzkumu. PTR produkuje toxiny Ptr ToxA, B a C, které jsou v interakci s dominantními geny hostitelské rostliny Tsn1, Tsc2 a Tsc1. Specifické toxiny využívá patogen k podlomení obranných mechanizmů rostliny a vyvolání choroby. Je zajímavé, že byly identifikovány téměř identické ToxA geny pro PTR a *S. nodorum,* podmiňující patogenitu u obou patogenů. Bylo prokázáno,

že interakce mezi *Sn* efektory a rostlinným genem (např. nově SnTox5-*Snn5*) hrají významnou roli ve vývoji choroby.

Obecně platí, že genetické mechanizmy pro tyto typy chorob, jakož i ostatní významné choroby pšenice (rzi, padlí travní, fuzariózy klasu) neumožňují dosažení požadované úrovně rezistence po introdukci jednotlivého genu. Geny rezistence je třeba kumulovat, což značně zvyšuje pracovní a časovou náročnost i náklady. I přes současné možnosti introdukovat detekované geny a QTL s využitím molekulárních technik, šlechtění se dosud hlavně opírá o výběry rezistentního materiálu v polních podmínkách na základě provokačních testů. Přínosem do budoucna může být detekce a výběr společných QTL lokusů (broad spectrum resistance loci) (Miedaner *et al*., 2012).

Polní infekční testy rezistence k hlavním původcům hnědých listových skvrnitostí u nás probíhají v širokém měřítku na specializovaných šlechtitelských pracovištích a každoročně (od roku 2002) je perspektivní šlechtitelský materiál hodnocen na rezistenci v kruhových testech ve 3-5 lokalitách (výsledky jsou detailně popsány v publikacích Šíp *et al*., 2005 a Chrpová *et al*. 2012). Detekovaný rezistentní materiál je bezprostředně zařazován do hybridizačních programů a výsledky jsou také cenným podkladem pro registrační řízení. Přestože posledně zmíněné publikace dokumentují výrazný pokrok, který šlechtění pšenice v tomto směru dosáhlo, testy probíhající odděleně pro jednotlivé původce těchto chorob také dokládají, že kombinování rezistencí je značně obtížné. Pokusy ukázaly (v souladu s prací Gurung *et al*., 2012), že problémem je zvláště kombinovat rezistenci k braničnatkám s rezistencí k PTR. Efektivitu výběru rezistentního materiálu také dosud snižuje značná nesourodost výsledků z různých lokalit, jejíž příčinou mohou být nejen faktory prostředí (především rozdíly v průběhu počasí), ale také nepřesnosti metodického charakteru. **Naším hlavním cílem je proto předložení metodických zásad a postupů, které umožní zvýšení přesnosti pokusů a zvýšení jejich vypovídací hodnoty pro potřeby šlechtění, odrůdového zkušebnictví a optimalizaci pěstebních technologií odrůd.**

# 2. Rozbor dostupných metod a popis doporučeného postupu

## 2.1. Metody testování rezistence a možnosti jejich uplatnění

V základě je možno odlišit metody založené na testování juvenilních (klíčních) rostlin probíhající v laboratorních či skleníkových podmínkách a testy u rostlin v dospělosti, které obvykle probíhají v polních podmínkách. Předmětem této metodiky jsou testy v polních podmínkách, ale součástí metodiky je i základní charakteristika a studium možnosti využití různých dostupných metod a přístupů k testování rezistence k těmto chorobám.

- **Laboratorní a skleníkové testy**

Využívají se převážně pro charakteristiku ras, produkci toxinů, hodnocení spektra rezistence a virulence, jakož i genetické studie (mapování genů, QTL). V širším měřítku jsou tyto typy testů uplatňovány pro detekci interakcí mezi hostitelem a izoláty patogena (Arraiano & Brown, 2006). Posledně jmenovaní autoři také uvádějí, že z hlediska parciální rezistence jde spíše o doplňkové hodnocení k polním testům, využitelné ve šlechtění také pro výběr rodičů kombinujících různé izolátově specifické geny rezistence. Výhodou je možnost hodnotit velký rozsah materiálu (provádět základní skríning). Běžné však využití těchto metod ve šlechtitelské praxi dosud není.

K disposici jsou především dva přístupy, detailně popsané v literatuře:

***Testy na juvenilních rostlinách- seedling tests***

Ve skleníkových podmínkách tyto testy obvykle probíhají podle metodiky, kterou popsali Brading *et al*. (2002), na 10-15-denních rostlinách (stadium 2 pravých listů), kdy se provádí postřik inokulem patogena (*M. graminicola*). Inkubační podmínky jsou blíže specifikovány např. v publikaci Kema *et al*. (1996). Napadení je obvykle hodnoceno 8-21 dnů po inokulaci na základě procenta listové plochy zasažené chorobou (leze nesoucí pyknidia houby) nebo převodem na 5-bodovou stupnici (1 – rezistentní). Metodika skleníkových testů rezistence k *S. nodorum* a PTR i způsob hodnocení napadení jsou popsány v publikaci Singh *et al*. (2011).

***Testy na listových segmentech- detached seedling leaf assays***

Metodiku pro testování rezistence k *M. graminicola* (anamorph. *S. tritici*) v laboratorních podmínkách (klimaboxech) na listových segmentech 12-14 denních rostlin vypracovali Arraiano *et al*. (2001). Využití této metody pro testování virulence izolátů *M. graminicola* pocházejících z území ČR nejnověji detailně popsali Věchet *et al*. (2013).

- **Polní infekční testy *vs. přirozená infekce***

Testování rezistence u rostlin v dospělosti v polních podmínkách je ve šlechtění i v odrůdovém zkušebnictví nejvíce využíváno, protože zřejmě nejlépe vypovídá o rezistenci či náchylnosti odrůdy při běžném pěstování. Všechny zásadní metodické aspekty jsou podrobně rozebírány v následujících odstavcích. Reakci 24 evropských odrůd pšenice ozimé na inokulaci 4 agresivními izoláty braničnatky pšeničné (*S. tritici*) v 9 různých prostředích hodnotili Schilly *et al*. (2011). Interakce izolát x genotyp byly sice významné, ale tento efekt byl výrazně nižší než efekty odrůdy a prostředí. Dosažení požadované trvalé rezistence je evidentně spojeno se stabilitou projevu v různých podmínkách prostředí. Specificitě reakce na určitý izolát je tak zjevně nadřazen (dominantní) efekt podmínek prostředí, z čehož vyplývá potřeba opakovaného testování v různém prostředí (v různých lokalitách a ročnících). Pro potřeby šlechtění a zkoušení odrůd jsou velmi užitečné i údaje získané v širokém měřítku v podmínkách přirozené infekce. Kombinování údajů z polních infekčních testů po použití agresivního izolátu a z přirozené infekce s navozením silného infekčního tlaku je v současné době využíváno např. pro klasové fuzariózy (Chrpová *et al*., 2008; Seznam doporučených odrůd, obiloviny a luskoviny, 2014, ÚKZÚZ. Tato šetření umožňují posoudit, jak se daná odrůda dokáže vypořádat se silným patogenním tlakem (při extrémní zátěži) a také s diverzitou rasového spektra v podmínkách přirozené infekce.

## 2.2. Výběr izolátů pro polní infekční testy

Výběr izolátů pro testování by měl vycházet ze studia divergence rasového spektra, agresivity, aktuálního výskytu na našem území a rozhodující jsou nepochybně i kultivační schopnosti (sporulace, vitalita, odolnost ke stárnutí apod.). Mezi další závažné sledované a zohledňované vlastnosti patří rezistence ras ke strobilurinovým fungicidům (Drabešová *et al*., 2013) či variabilita v produkci hostitelských toxinů (*S. nodorum*, PTR). Vodítkem pro výběr vhodných izolátů by měly být studie odrůdové reakce na široké spektrum geneticky divergentních izolátů patogena (Šíp *et al*., 2008). Tyto studie jsou však pracovně značně náročné a vyžadují častou aktualizaci vzhledem k proměnlivosti vztahů hostitel-patogen. Inokulace jednotlivými izoláty vykazujícími odlišné vlastnosti evidentně nepřicházejí v úvahu při testování rozsáhlého materiálu. Pro postižení eventuální divergence v odrůdové reakci je možno využít hodnocení v podmínkách přirozené infekce či inokulace směsí geneticky divergentních, v současné době se vyskytujících izolátů (Francki, 2013). Použití vhodně zvolené směsi izolátů *Fusarium graminearum* se ukázalo výhodné pro detekci rezistence či

mírné rezistence k napadení fuzariózami klasu, zatímco náchylný materiál se podařilo úspěšně eliminovat po inokulaci vysoce patogenním, dlouhodobě využívaným izolátem B *F. culmorum* (Šíp *et al*., 2011). Použití směsi izolátů bylo výhodné i v současných pokusech s izoláty braničnatky pšeničné (*S. tritici*), jak je dále doloženo.

***Výsledky studia reakce odrůd pšenice ozimé na infekci vybranými izoláty braničnatky pšeničné (pokusy 2012-2014 na stanovištích Ruzyně a Humpolec)***

Výběr izolátů vycházel z pokusů, které proběhly v roce 2012, a nově byly využity v současné době dostupné sbírky izolátů (na ČZU Praha a ve VÚRV v.v.i. Praha), jakož i údaje převzaté z disertační práce Drabešová (2012) a publikace J. Drabešová *et al.* (2013). Pro výběr izolátů byla rozhodující jejich agresivita, molekulární charakteristiky (klastrová analýza 184 vzorků z různých oblastí ČR popisující populační genetickou strukturu *Mycosphaerella graminicola*), zastoupení různých oblastí ČR, odolnost k fungicidům – strobilurinům a rozhodovala také sporulace a vitalita na kultivačním mediu.

Údaje, které rozhodovaly o výběru izolátu:

**0117** (Ústí n. Orlicí) vysoká redukce HTZ i agresivita v roce 2012, využíván v předchozích testech i ve směsi

**0162** (Praha) relativně nižší agresivita, avšak detekce specifické odrůdové reakce v r. 2012

**0385** (Kroměříž) vysoká agresivita, ale nižší redukce HTZ v pokusech 2012

**1008** (Kroměříž, 2011) rezistence k fungicidům

**1039** (Jihlava, 2011) separátní postavení, odolnost fungicidům

**1040** (Jihlava, 2011) odolnost k fungicidům

**1054** (Opava, Otice 2011) – molekulární charakteristiky

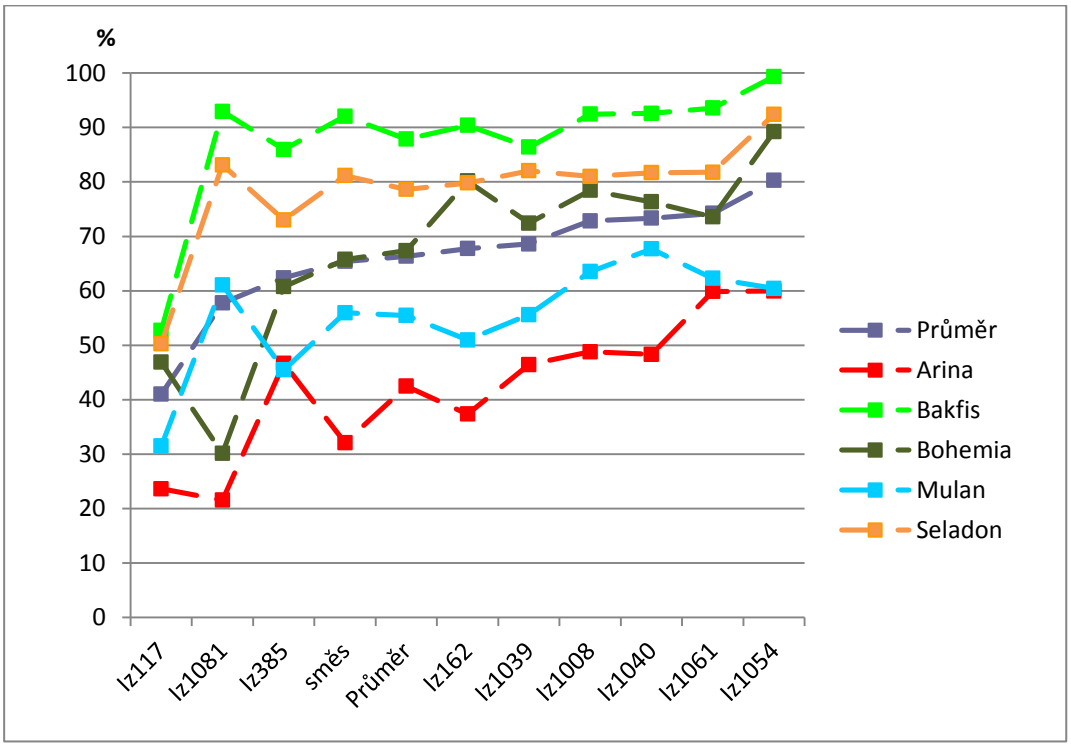
**1061** (Opava, Štěbořice,2011) - molekulární charakteristiky

**1081** (Cheb**,** Hazlov, 2011) – molekulární charakteristiky, lokalita

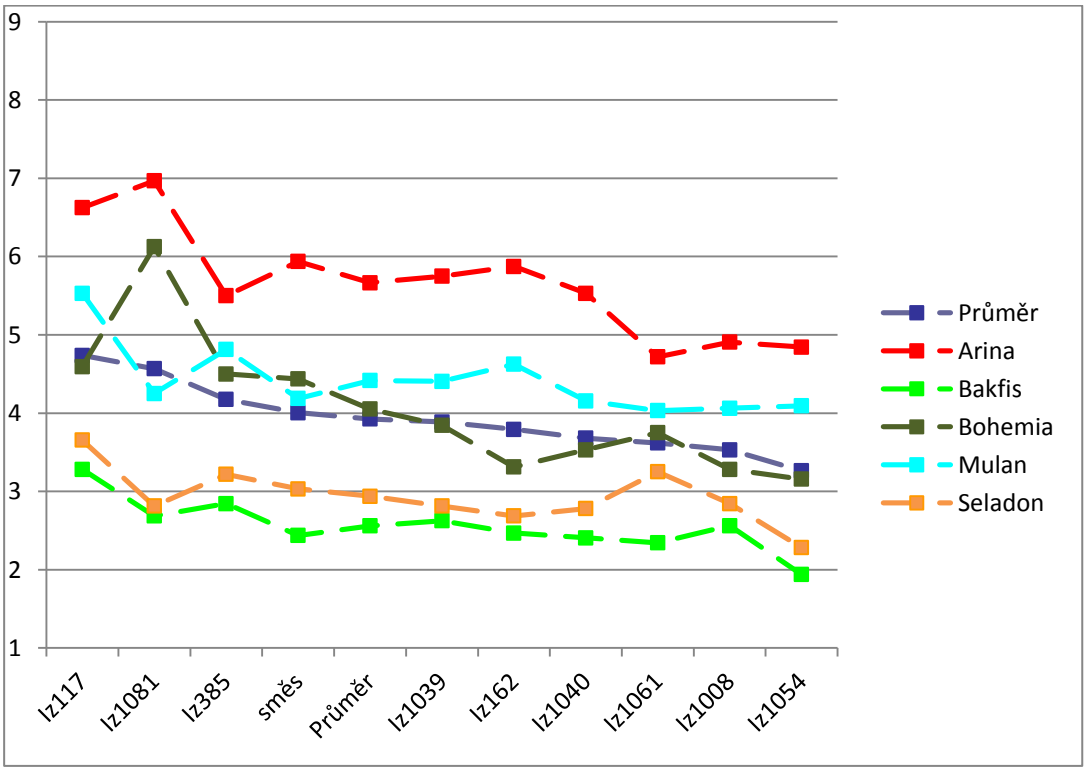
**Směs (0117**-dlouhodobě využíván**, 1039 –** silná agresivita, odolnost k fungicidům**, 1081 –** specifický projev**)**

Jak dokládají **grafy 2 a 3**, pokusy s 5 odrůdami ozimé pšenice lišícími se v rezistenci k napadení braničnatkou pšeničnou (Arina - rezistentní - mírně rezistentní, Mulan- mírně rezistentní, Bohemia – střední odolnost, Bakfis, Seladon – náchylné odrůdy) ukázaly v základě shodu v odrůdové reakci na inokulaci 9 geneticky divergentními izoláty a směsí izolátů získaných z území ČR. Nejnižší stupeň napadení vykázala prakticky ve všech případech odrůda Arina (shodný symptomatický projev pro odrůdy Arina a Mulan byl u podprůměrně patogenního izolátu 385). Rozdíly mezi izoláty je možno spatřovat především v klasifikaci mírné až střední rezistence odrůd Mulan a Bohemia. Nejvíce specifický byl projev relativně méně patogenního izolátu 1081, který se vyznačoval relativně nejvyšší genetickou proměnlivostí **(tabulka 1),** avšak odrůda Mulan byla tímto izolátem klasifikována jako středně odolná a odrůda Bohemia jako rezistentní. Tyto rozdíly v reakci dokládá **obr. 2.** Ve směsi zahrnující izolát 1081 a izoláty 0117 a 1039 se specifičnost reakce neprojevila **(obr. 3**). Jak ukazuje **tabulka 1**, relativně vyšší byl podíl genetické proměnlivosti u symptomatického hodnocení 9-bodovou stupnicí než u % napadení listové plochy, kdy se výrazněji projevil vliv ročníku a lokality. Vedle vysokého podílu genetické proměnlivosti je nepochybně dále žádoucí nízký podíl interakční složky proměnlivosti. Specificky reagující izolát 1081se vyznačoval vysokou hodnotou poměru odrůdové a „interakční“ proměnlivosti a pro symptomatické hodnocení byla nejvyšší hodnota tohoto poměru zjištěna u podobně méně

**Graf 2.** Průměrná suma procentního napadení plochy dvou listů (průměr dvou termínů hodnocení) po inokulaci 5 odrůd ozimé pšenice vybranými izoláty braničnatky pšeničné (pokusy 2013 a 2014 na dvou stanovištích)




**Graf 3.** Průměrné hodnocení (ve dvou termínech) symptomatického projevu (1-9; 9-bez příznaků) po inokulaci 5 odrůd ozimé pšenice vybranými izoláty braničnatky pšeničné (pokusy 2013 a 2014 na dvou stanovištích)



patogenního izolátu 117, který však jednoznačně nevyhovoval pro posouzení % napadení listové plochy (kdy se statisticky nepodařilo prokázat významnost rozdílů mezi odrůdami ve stupni rezistence). Také vysoce patogenní izolát 1054 vykazoval příznivý poměr mezi genetickou a interakční proměnlivostí. Obecně však příznivost použití vysoce patogenního izolátu pro testování rezistence nebyla prokázána (korelace mezi stupněm patogenity a výše zmiňovanými charakteristikami proměnlivosti nebyly signifikantní). Diverzifikace odrůd podle stupně rezistence byla jednoznačná (rozdíly signifikantní) po zahrnutí všech izolátů (Arina > Mulan > Bohemia > Seladon ≥ Bakfis), což je však z technického hlediska ve větším měřítku těžko proveditelné a nezbytný je výběr vhodných izolátů či jejich směsi. Je příznivé, že se po použití většiny izolátů výše zmíněné pořadí odrůd dle stupně jejich rezistence nelišilo (signifikantní byly pouze rozdíly v klasifikaci rezistence odrůd Mulan a Bohemia po použití izolátu 1081). Poměrně časté bylo začlenění odrůd Mulan a Bohemia do stejné homogenní skupiny; podobně se často neprokázala odlišnost odrůd Seladon a Bakfis.

**Tabulka 1.** % podíl variability vlivem odrůdy (O) a vlivem prostředí (P) pro jednotlivé izoláty z analýz rozptylu na základě hodnocení symptomatického projevu (1-9) a % napadení plochy dvou horních listů. Izoláty jsou řazeny vzestupně podle stupně jejich patogenity.

| **Symptomatické hodnocení** | **Průměr** (patogenita) | **Odrůda** | **prostředí** | **Interakce O x P** | **Odrůda/ interakce OxP** |
|---|---|---|---|---|---|
| **IZ 117** | 4,74 | 58,49 | 32,65 | 5,51 | **10,62** |
| **IZ 1081** | 4,57 | 80,52 | 7,42 | 10,40 | **7,74** |
| **IZ 385** | 4,18 | 43,48 | 38,43 | 15,83 | **2,75** |
| **IZ směs** | 4,01 | 54,62 | 27,83 | 15,09 | **3,62** |
| **IZ1039** | 3,89 | 56,82 | 32,73 | 9,35 | **6,07** |
| **IZ 162** | 3,79 | 77,62 | 8,00 | 12,35 | **6,28** |
| **IZ 1040** | 3,68 | 70,80 | 13,41 | 12,93 | **5,47** |
| **IZ1061** | 3,62 | 71,69 | 4,41 | 16,71 | **4,29** |
| **IZ 1008** | 3,53 | 63,39 | 10,14 | 18,53 | **3,42** |
| **IZ1054** | 3,26 | 77,66 | 9,15 | 8,68 | **8,95** |
| **Průměr** | **3,93** | **66,29** | **18,42** | **13,32** | **5,40** |
| **Průměrné % napadení horních 2 listů** | **Průměr** (patogenita) | **Odrůda** | **prostředí** | **Interakce O x P** | **Odrůda/ interakce OxP** |
| **IZ 117** | 41,01 | 9,35 | 85,91 | 4,02 | **2,33** |
| **IZ 1081** | 57,77 | 49,02 | 45,00 | 4,48 | **10,94** |
| **IZ 385** | 62,37 | 17,71 | 75,81 | 5,91 | **2,99** |
| **IZ směs** | 65,40 | 24,67 | 67,91 | 6,15 | **4,01** |
| **IZ 162** | 67,74 | 32,65 | 57,92 | 7,77 | **4,20** |
| **IZ1039** | 68,59 | 14,96 | 81,18 | 3,33 | **4,50** |
| **IZ 1008** | 72,84 | 31,29 | 57,42 | 9,29 | **3,37** |
| **IZ 1040** | 73,32 | 19,39 | 73,57 | 5,10 | **3,80** |
| **IZ1061** | 74,21 | 20,88 | 69,75 | 6,47 | **3,23** |
| **IZ1054** | 80,28 | 28,21 | 64,97 | 5,72 | **4,93** |
| **Průměr** | **66,35** | **22,82** | **67,95** | **5,76** | **3,99** |

Závažná pro výběr izolátu je nepochybně shoda s průměrnou reakcí (stabilita reakce) posuzovaná na základě regresní analýzy podle lineárního regresního koeficientu (b) a

průměrných čtverců odchylek od regrese ($MS_{dev}$)(Eberhart & Russell, 1966) či koeficientu determinace $R^2$ (Šíp *et al*., 2009). Po regresi na průměrný projev odrůdy v různém prostředí je nepochybně žádoucí, aby (1) regresní koeficient b byl pro testovaný izolát větší nebo roven jedné ($b \geq 1$), což umožňuje dobře separovat odrůdové vlivy v určitém prostředí. Dále (2) je požadováno co nejvyšší $R^2$ (nejnižší $MS_{dev}$) vypovídající o shodě s průměrným projevem. Výsledky těchto šetření obsažené v **tabulce 2** ukázaly nejlepší vlastnosti u použité směsi izolátů, jakož i u izolátů 1039 a 117 tvořících směs. Třetí komponenta směsi, izolát 1081 ve shodě s předchozími zjištěními vykazoval nadprůměrnou diverzitu reakce, ale nejvyšší specifičnost (nejnižší hodnotu $R^2$). **Regresní analýza jednoznačně dokládá opodstatněnost použití vhodně zvolené směsi izolátů pro inokulace.**

**Tabulka 2.** Výsledky analýzy regrese na průměrný projev odrůdy v různém prostředí (n = 5 x 4 = 20) po infekci 10 izoláty braničnatky pšeničné).

| **Izolát** | **Symptomatické hodnocení** | | **Průměrné % napadení 2 horních listů** | |
|---|---|---|---|---|
| | **b** | **$R^2$** | **b** | **$R^2$** |
| **1008** | **0,719*** | **0,818** | **0,726*** | **0,810** |
| **1039** | **1,107** | **0,908** | **1,156*** | **0,947** |
| **1040** | **0,956** | **0,913** | **0,981** | **0,949** |
| **1054** | **0,866** | **0,862** | **0,892** | **0,896** |
| **1061** | **0,634*** | **0,823** | **0,800*** | **0,974** |
| **1081** | **1,293** | **0,769** | **1,058** | **0,775** |
| **117** | **1,161** | **0,911** | **1,067** | **0,909** |
| **162** | **1,035** | **0,863** | **0,996** | **0,902** |
| **385** | **1,027** | **0,793** | **1,087** | **0,964** |
| **Směs izolátů** | **1,202*** | **0,920** | **1,236*** | **0,977** |

* Regresní koeficient ´b´ odchylný od jedničky ($P<0,05$).

**Obr. 2.** Specifická reakce testovaných odrůd ozimé pšenice na inokulaci izolátem 1081 braničnatky pšeničné **(tento projev byl shodný v obou letech a v obou lokalitách)**

Arina Bohemia Mulan Seladon

**Obr. 3.** Reakce testovaných odrůd ozimé pšenice na inokulaci směsí izolátů (1039, 117 a 1081) braničnatky pšeničné (silnější projev nákazy)

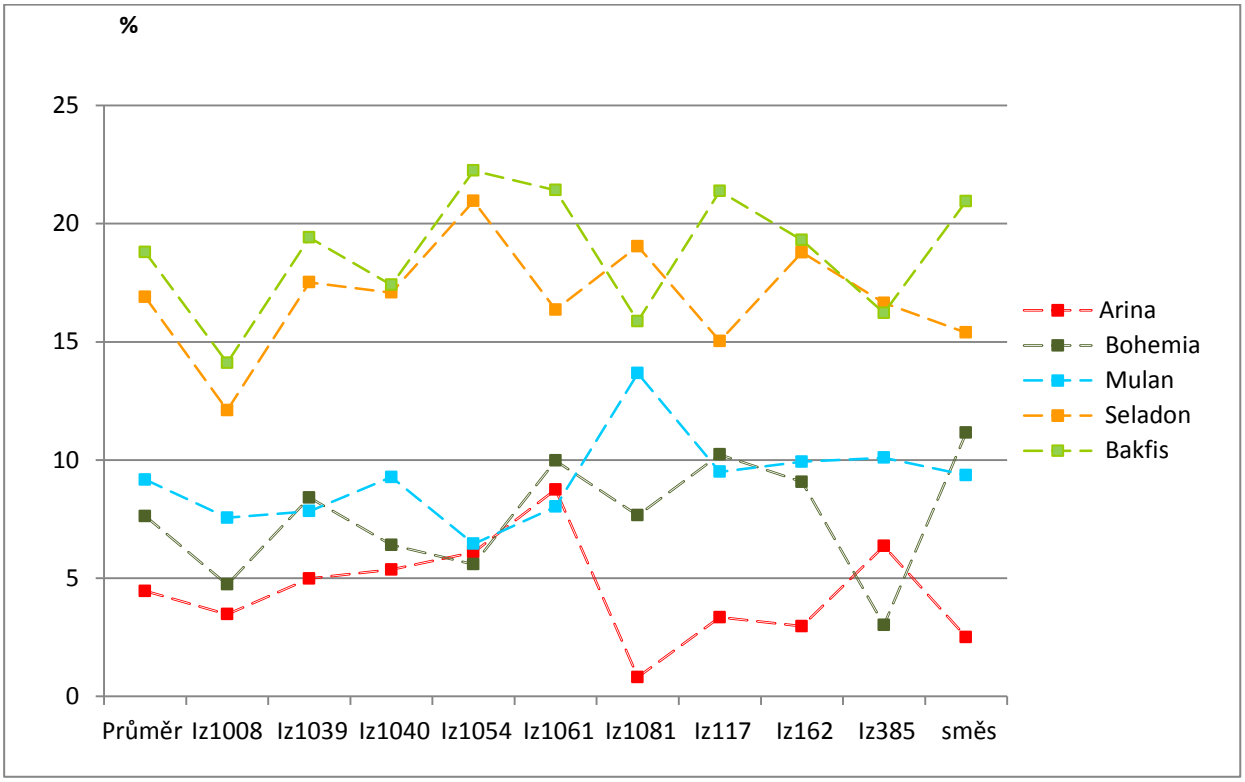
Arina Mulan Bohemia Seladon

Zjišťování redukce výnosových znaků hmotnost zrn na klas (HZK) a HTZ již nová kritéria pro výběr izolátů nepřineslo. Statisticky nebylo možno prokázat diference mezi izoláty v redukci těchto výnosových znaků. Rozpětí zvláště v průměrné redukci HZK bylo mezi izoláty podstatně menší (24,4 % - 28,9 %) než mezi odrůdami (17,3 %: Arina - 34,7 %: Bakfis); pro redukce HTZ 8,4 % - 12,9 % (mezi odrůdami 4,5 %: Arina - 18,8 %: Bakfis).

Na základě redukce HTZ bylo možno při použití všech izolátů prokázat náchylnost odrůd Seladon a Bakfis; klasifikace ostatních odrůd (odolné-středně odolné) však jednoznačná nebyla **(graf 4).** Středně odolná odrůda Bohemia vykázala v průměru nižší HTZ-R (7,6 %) než mírně odolná odrůda Mulan (9,2 %); u odrůdy Bohemia však byla relativně nejvyšší redukce počtu zrn na klas (26,2 %; Mulan pouze 13,2 %). HZK-R byla u odrůdy Bohemia dokonce 30,9 %, zatímco 20,9 % u odrůdy Mulan.

**Výsledky těchto pokusů a poznatky získané z dostupné literatury (*S. tritici* -** Schilly *et al.,* 2011**; *S. nodorum* –** Francki, 2013 **a *PTR*** – Tadesse *et al.,* 2008) **vedou k závěru, že testy rezistence by se měly opírat o izoláty vyvolávající vysoce převládající hostitelskou reakci. Specifické reakce na některý izolát jsou v našem území zřejmě ojedinělé a vhodná směs zahrnující divergentní izoláty by měla šlechtitelské požadavky uspokojit. Podle dostupných literárních údajů** (Eyal, 1999) **je patosystém pšenice – *S. nodorum* považován za méně diverzifikovaný než systém pšenice – *S. tritici*. Izoláty *PTR* jsou podle produkce specifických toxinů členěny do 8 ras. Při testování rezistence na juvenilních rostlinách se většinou pracuje s izoláty samostatně, aby bylo patrné, jak který genotyp hostitele reaguje na konkrétní toxin (Mahto *et al*., 2011; Palicová-Šárová a Hanzalová, 2006). V polních podmínkách je pak připravována směs izolátů patogena, aby byly rovnoměrně zastoupeny všechny rasy dle produkce hostitelsky specifických toxinů (Šárová *et al*., 2002). Spíše než investovat do testování reakce na jednotlivé vybrané izoláty se evidentně vyplatí testování v rozdílných podmínkách prostředí a výběry materiálu vykazujícího stabilitu reakce v rozdílných podmínkách prostředí** (Schilly *et al.,* 2011). **V našich pokusech s vybranými izoláty *S. tritici*, které probíhaly ve 4 typech prostředí, byla také prokázána opodstatněnost použití vhodně zvolené směsi izolátů pro inokulace. Závěry získané z polních infekčních testů je vhodné konfrontovat s výsledky získanými v podmínkách přirozené infekce, kdy se spektrum patogenů může projevit v celé šíři.**

**Graf 4.** Průměrné redukce hmotnosti tisíce zrn (HTZ-R) po inokulaci 5 odrůd ozimé pšenice vybranými izoláty braničnatky pšeničné




## 2.3. Kultivace patogenů a příprava inokula

***Pyrenophora tritici-repentis***

Inokulum pro polní pokusy je připraveno ze směsi dobře sporulujících monosporových izolátů *P. tritici-repentis* získaných z ČR. Izoláty jsou kultivovány na modifikovaném bramborovém agaru (V8-PDA) dle Lamari a Bernier (1989) a zaočkovány do sterilního ovesného zrna. Inokulum je připraveno z dobře narostlých sporulujících kultur na V8-PDA, konidie jsou z Petriho misek opláchnuty sterilní vodou.

***Mycosphaerella graminicola***

Sporulující izoláty *M. graminicola* jsou trvale uloženy na silikagelu při -20 °C. Při přípravě inokula jsou nejprve vyočkovány na bramboro-dextrózový agar (PDA), dále zaočkovány do Erlenmayerových baněk na kvasnico-sladinový bujón (YM) a umístěny na 5 dní na rotační třepačku při teplotě 17-20 °C, denní světlo (Věchet *et al.*, 2013). Hustota inokula se upraví na $1x10^6$spor/ml a inokulum je aplikováno postřikem na listy.

***Phaeosphaeria nodorum***

Izoláty *P. nodorum* dobře sporulují na V8-PDA. Petriho misky s cca 14 dní starou sporulující kulturou jsou opláchnuty sterilní vodou a je připraveno inokulum k postřiku na listy (hustota $1x10^6$spor/ml).

## 2.4. Uspořádání polních pokusů s umělou inokulací a její technika

- **Systémy výsevu rostlin**

V základě se nabízí možnost využití jak řádkových, tak hnízdových výsevů rostlinného materiálu. Předností řádkových výsevů je možnost využití dostupných mechanizačních prostředků k výsevu materiálu a v případě přesného setí i posouzení rozdílů v reakci na individuální rostlinné bázi - k využití především pro výběry rezistentního materiálu ze štěpících, hybridních generací. Nevýhodou je silnější ovlivnění reakce sousedními řádky a rostlinami (tyto efekty lze snížit použitím víceřádkových výsevů), také zřejmě vyšší spotřeba inokula a obtížnější vytvoření mikroklimatu potřebného pro rozvoj choroby. Nejčastěji jsou používány dvouřádkové výsevy o ploše 0,42 x 1 m s přibližně 40-60 zrny na řádek (Schilly *et al.*, 2011; Risser *et al.*, 2011).

Široké uplatnění ve šlechtitelské praxi pro hodnocení odolnosti odrůd a liniového materiálu získal hnízdový výsev (přijatý též v kruhových testech probíhajících od roku 2002), který umožňuje vytvořit příznivější mikroklima pro rozvoj choroby (zřejmě lépe odpovídající projevu choroby v normálně zahuštěných porostech) a také ovlivnění sousedními členy je nižší (obvyklý spon hnízd je 40x40 cm). Doporučený počet zrn na hnízdo je 30-40. Technicky snadno proveditelné je i případné zakrytí inokulovaných rostlin plastikovými sáčky pro podporu infekce.

Pokus by měl mít nejméně dvě opakování se znáhodněním pokusných členů a pro inokulace více izoláty se doporučuje systém dělených dílců (split-plots). Do pokusů je třeba začlenit kontrolní odrůdy, které se na základě dlouhodobých šetření liší ve stupni rezistence. Dále je závažná izolace (náležité oddělení) jednotlivých pokusných variant (materiálů inokulovaných jednotlivými původci hnědých listových skvrnitostí či jinými patogeny). Pro tyto účely je zřejmě nejvýhodnější použití triticale (avšak pozor na nebezpečí polehnutí) či vysoké odrůdy pšenice s pevným stéblem rezistentní k původcům sledovaných chorob. Požadován je nejméně dvouřádkový obsev tímto izolačním materiálem.

***Popis systému, který byl použit v pokusech 2012-2014 s braničnatkou pšeničnou na stanovištích Ruzyně a Humpolec***

Pokusy měly dvě opakování a použit byl dříve osvědčený výsev do hnízd ve sponu 40x40 cm po 30-40 zrnech na hnízdo. Infekce byla na základě výsledků získaných v roce 2012 (viz redakčně upravená zpráva 2012 projektu QJ 1210189) bezprostředně po inokulaci podpořena zakrytím plastikovými sáčky po 24 hod. **(foto).** Při zakrývaní plastikovými sáčky (24-48 hod.) je třeba mít na zřeteli možnost popálení horních pater listů, což by mohlo významně negativně ovlivnit hodnocení stupně napadení. Při použití tohoto opatření je proto nezbytné věnovat náležitou pozornost vývoji počasí. Pro podpoření infekce byla také k dispozici mikrozávlaha. Jednotlivé pokusné varianty (bloky infikované jednotlivými izoláty braničnatky pšeničné) byly chráněny neinfikovaným obsevem. Na stanovišti v Ruzyni byla použita středně odolná, vysoká a nepoléhavá odrůda ozimé pšenice Bohemia; na stanovišti Humpolec nepoléhavá odrůda triticale.

- Technika inokulace

Inokulace braničnatkami (*S. tritici* a *S. nodorum*) je prováděna postřikem; k inokulaci PTR je používán rozhoz infikovaného osiva (nákazu PTR je však možno též podpořit postřikem inokulem – používáno zvláště u jařin). U braničnatek i PTR se do suspenze přidává smáčedlo Tween 20 (1 kapka/100 ml).

***Inokulace S. tritici a S. nodorum***

**U obou patogenů je doporučováno provádění postřiku od fáze BBCH 37** (objevení praporcového listu). Postřik by měl být důkladný, prováděný ze všech stran, aby byla zasažena celá listová plocha. Postřik je obvykle opakován po 10-14 dnech a v případě zhoršených podmínek pro rozvoj choroby se doporučuje postřik opakovat 3x. Opakování postřiků umožňuje také snížit vliv rozdílů v ranosti. Materiály výrazně se lišící v ranosti by měly být pěstovány odděleně a inokulovány v jiných termínech. Na základě dlouhodobých zkušeností však za normálních podmínek a při nevýrazných rozdílech v ranosti postačuje provádění dvou postřiků. **Obecně je doporučováno provádění inokulací v termínu BBCH 39-55** (Schilly *et al*., 2011).

**U braničnatky plevové (*S. nodorum*),** kde se odděleně hodnotí napadení listů a klasů touto chorobou, je evidentně zapotřebí (a může být problematické) docílit dostatečně silné napadení jak listů, tak klasů. Aby byl podpořen rozvoj choroby v klasech, je třeba inokulace dokončit v **BBCH 50-55** (objevení klasu – počátek kvetení; fáze 10.1. – 10.5. podle Feekese), což také umožňuje minimalizovat ovlivnění délkou rostliny a raností kvetení (Francki, 2013). Ze šlechtitelského hlediska je potřeba dosažení rezistence jak k napadení listové plochy, tak k napadení klasů; rezistence listů a klasů není dle literárních údajů podmíněna stejným souborem genů. Na základě vlastních šetření v kruhových testech na 3-5 stanovištích v období 2007-2013 však převládaly mezi napadením listové plochy a klasů braničnatkou plevovou významně pozitivní korelace a vysoká odlišnost v napadení listů a v napadení klasů byla spíše výjimečná. Při normálním průběhu infekce (výrazných rozdílech ve stupni napadení) se korelace mezi hodnocením napadení listů a klasů na základě průměrů 3-5 stanovišť pohybovaly v rozmezí 0,57-0,74 a byly vždy vysoce statisticky významné ($P<0,001$).

Nevýznamnost korelací se vyskytovala v prostředích, kde se výrazně lišilo průměrné napadení listové plochy od průměrného napadení klasů (napadení klasů bylo nízké)! **Volba správných termínů inokulace a podpoření infekce listů i klasů jsou pro správné postižení rezistence k původcům těchto chorob nepochybně velmi závažné.**

***Inokulace PTR (Pyrenophora tritici – repentis)***

Inokulace ozimé pšenice PTR je prováděna na podzim - konec listopadu, začátek prosince – kdy zkoušené porosty už zčásti pokrývají povrch půdy. **Inokulace se provádí rozhozem infikovaných obilek infikovaných nejlépe směsí izolátů patogena.**

Pro dosažení požadovaného stupně napadení je rozhodující inokulace na podzim, neboť houba během podzimu pokračuje ve vývoji a během zimy vytvoří askospory. Uvolněné askospory na jaře infikují mladé rostliny. Na nich houba pokračuje ve vývoji. Další šíření infekce je podpořeno i konidiemi, které jsou nově vytvářeny v čerstvých skvrnách na listech rostlin. **Na přelomu listopadu a prosince je provedena první inokulace ozimé pšenice, v březnu až dubnu pak druhá (1-1,2 kg/ar sušeného materiálu nebo dvojnásobek čerstvého materiálu)** (Raymond *et al.,* 1985). **Jarní pšenice je inokulována suspenzí o hustotě 2000-3000 spor/ml postřikem přímo na listy.**

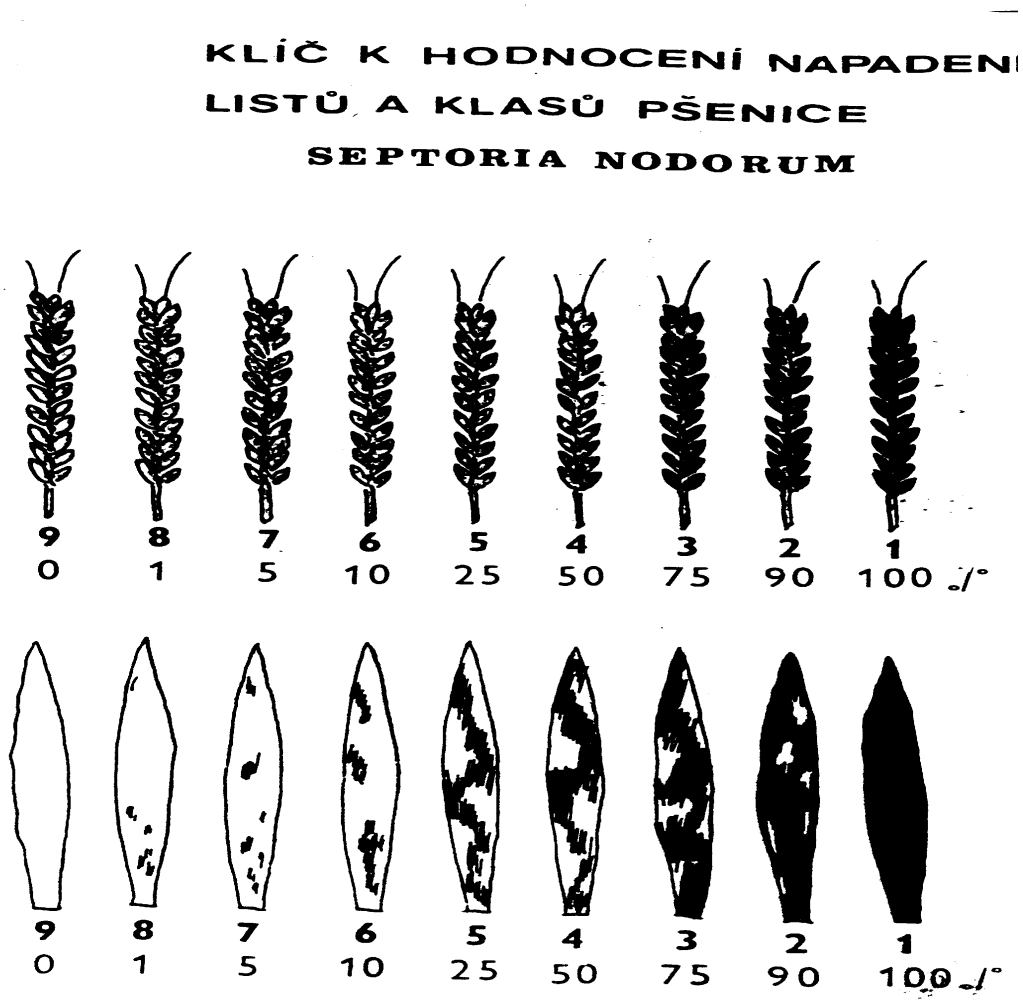
## 2.5. Hodnocení stupně napadení a redukce výnosových znaků

***Termíny hodnocení příznaků nákazy***

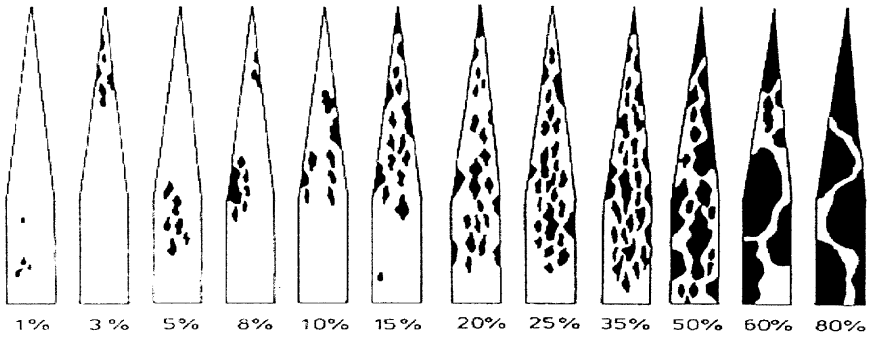
Hodnocení stupně napadení začíná po objevení zjevných symptomů nákazy a trvá přibližně 30 dnů po inokulaci. Obvyklé je hodnocení ve 3 termínech (v 4-7denních intervalech), přičemž za rozhodující jsou považovány termíny představující vrchol a konec vývoje choroby (Risser *et al.,* 2011). Stupeň rezistence je obvykle posuzován na základě aritmetického průměru 2-3 měření (1. termín umožňuje podchytit genotypy s rychlým počátečním startem infekce). Ve šlechtitelské praxi i v dostupné literatuře týkající se hodnocení stupně rezistence k těmto listovým chorobám je jednorázové zjišťování stupně poškození listové plochy obvyklejší než zjišťování AUDPC (area under the disease progress curve) v různých termínech po inokulaci (Cowger & Murphy, 2007). Stanovení AUDPC (popsáno detailně v četné literatuře zaměřené na choroby rostlin; originálně: Shaner & Finney, 1977) je obvykle využíváno ve speciálních pokusech zaměřených na detailní ovlivnění vývoje choroby různými faktory.

***Způsoby hodnocení stupně napadení, bonitační stupnice***

Pochopitelně nejpřesnějším jednorázovým ukazatelem je procento listové plochy postižené skvrnitostí vyvolanou těmito původci (skvrn nesoucích pyknidy, skvrn typických pro napadení PTR), které se provádí obvykle vizuálně za pomoci klíčů. Níže jsou poskytnuty klíče běžně dostupné pro hodnocení napadení klasů a listů patogenem *S. nodorum,* využitelné i pro *S. tritici* a PTR (*Pyrenophora tritici-repentis*).



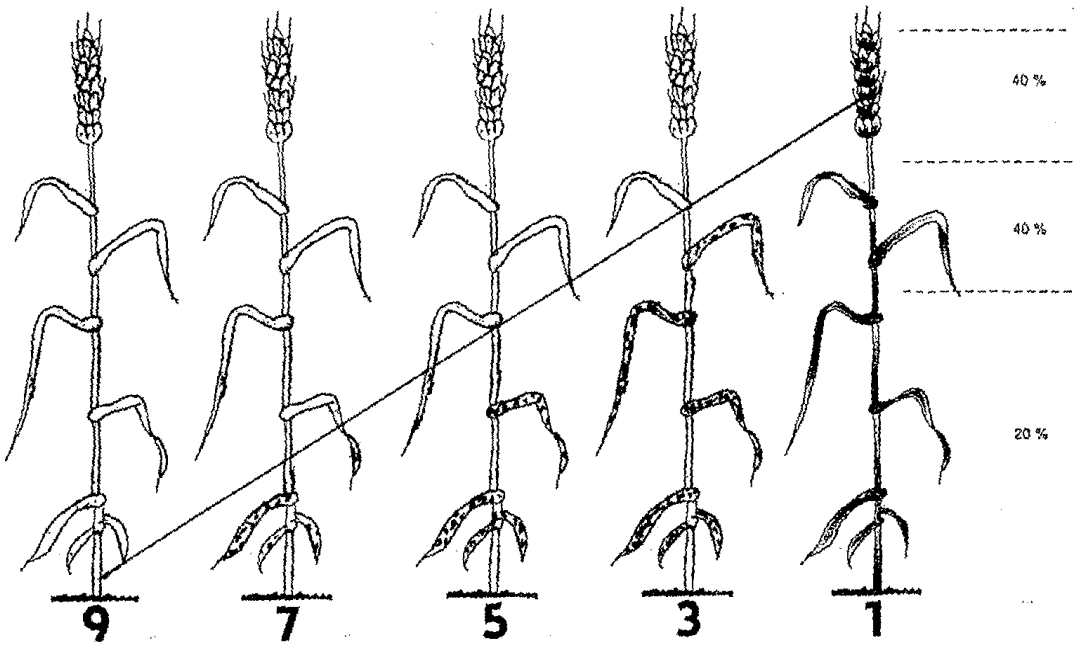

Marker pro hodnocení procentuálního napadení listové plochy podle Jörga a Ellmera (nepublikováno) (Wolf 1991). – Pyrenophora tritici-repentis




Ve šlechtitelské praxi (při hodnocení školek a širšího materiálu) je obvykle využíván 9bodový systém hodnocení. Hodnocení se podobně jako u napadení listového aparátu obvykle provádí ve 3 termínech (v 7-10denních intervalech). Doporučeno bylo použití dvouhodnotového (two-digit) „mexického“ systému, který popsali Eyal *et al.* (1987); u nás Šíp *et al.* (2001). První hodnota vypovídá o tom, do jakých pater rostliny již infekce pronikla (vypovídá o rychlosti šíření infekce); druhá hodnota je odhadem velikosti napadené listové plochy (chlorotických a nekrotických symptomů) obvykle 4 horních listů. Van Beuningen & Kohli (1990) navrhli jako měřítko stupně rezistence koeficient infekce (CI), který je

násobkem obou hodnot (použit též v práci Šíp *et al.*, 2001).

Oba aspekty (tj. rychlost šíření infekce a stupeň poškození listové plochy) je však možno již při bonitaci sloučit do jednoho bodového ukazatele, což je v současné době nejvíce využíváno. Lze např. pohotově využít markér (klíč) doporučený pro hodnocení napadení padlím travním v **metodice ÚKZÚZ, 2005 (obr. 5):**




**Obr. 5.** Systém hodnocení chorob postupujících po rostlině směrem vzhůru (Metodika ÚKZÚZ 2005). Příklad hodnocení: Pokud choroba (zde padlí travní) napadne rostlinu do poloviny výšky, bude hodnocena stupněm 5. Pokud na nemocných listech bude napadeno pouze 15 % plochy - výsledný stupeň bude bod 6. Při napadení 25 % listové plochy zůstane hodnocení na stupni 5 a při vyšším napadení listů než na 25 % bude výsledný stupeň 4. Obdobným způsobem se využívají mezistupně při hodnocení chorob se stupnicí 9, 7, 5, 3, 1.

***Hodnocení redukce výnosových znaků***

V literatuře velmi ojedinělé, ale ekonomicky nejzávažnější, je zjišťování redukce výnosových znaků (hmotnosti 1000 zrn, hmotnosti zrn na klas, eventuálně i počtu zrn na klas) vlivem infekce. Toto šetření je pracovně náročné a vyžaduje minimalizaci ovlivnění jinými faktory (jinými chorobami či lokálními vlivy prostředí). Základem je získání pokud možno co nejpřesnějších údajů o projevu těchto znaků z kontrolní varianty.

**Metodika těchto šetření je upřesněna v následujícím odstavci.**

***Výsledky pokusů se S. tritici ve 4 typech prostředí zahrnujících hodnocení napadení listové plochy, bonitaci na základě devítibodové stupnice a zjišťování redukce výnosových znaků. Posuzována byla reakce 5 odrůd ozimé pšenice na inokulaci různými izoláty braničnatky pšeničné.***

Hodnocení postupu infekce a napadení listové plochy 9bodovou stupnicí ukázalo nejtěsnější relace s ostatními ukazateli při posuzování v termínu, kdy infekce vrcholila (V), jakož i na základě průměrných hodnot „vrchol a konec rozvoje choroby“ – VK9b **(tabulka 3).** Bonitace na začátku rozvoje choroby (P) již výrazně nepřispěla ke zvýšení přesnosti.

**Tabulka 3.** Korelace mezi hodnocením 9bodovou stupnicí a zjišťováním % napadení listové plochy. Všechny korelační koeficienty jsou vysoce statisticky významné (P<0,001; n=200).

| | P9b | V9b | K9b | VK9b | PVK9b |
|---|---|---|---|---|---|
| BONITACE 1-9 | Kor | Kor | Kor | Kor | Kor |
| P9b (počátek infekce) | **** | 0,799 | 0,679 | 0,764 | 0,887 |
| V9b (vrchol infekce) | 0,799 | **** | 0,808 | 0,959 | 0,888 |
| K9b (konec infekce) | 0,679 | 0,808 | **** | 0,941 | 0,933 |
| VK9b (průměr V a K) | 0,764 | 0,959 | 0,941 | **** | 0,956 |
| PVK9b (průměr P, V a K) | 0,887 | 0,888 | 0,933 | 0,956 | **** |
| | 0,747 | 0,855 | 0,809 | 0,888 | 0,916 |
| % NAPADENÍ LISTOVÉ PLOCHY | | | | | |
| V/1L (vrchol infekce, 1.list) | -0,722 | -0,690 | -0,539 | -0,653 | -0,638 |
| V/2L (vrchol infekce, 2. list) | -0,678 | -0,623 | -0,463 | -0,578 | -0,573 |
| V- LP (suma V 1. a 2.list) | -0,722 | -0,682 | -0,524 | -0,642 | -0,630 |
| K/1L (konec inf.,1. list) | -0,731 | -0,805 | -0,724 | -0,808 | -0,715 |
| K/2L (konec inf.,2. list) | -0,623 | -0,768 | -0,740 | -0,794 | -0,728 |
| K-LP (suma K 1. a 2. list) | -0,719 | -0,814 | -0,746 | -0,823 | -0,736 |
| prum V a K1L(prům. V a K 1.listu) | -0,785 | -0,810 | -0,686 | -0,792 | -0,732 |
| prum- V a KLP (prům. V a K list.plochy) | -0,776 | -0,802 | -0,679 | -0,785 | -0,733 |
| | -0,720 | -0,749 | -0,638 | -0,734 | -0,686 |

**Tabulka 4** ukazuje ve všech případech vysokou statistickou významnost (P<0,001) korelačních koeficientů mezi jednotlivými ukazateli symptomatického projevu a redukcí hodnocených výnosových znaků, přičemž relativně těsněji korelovaly hodnocené znaky symptomatického projevu s HTZ-R (redukce hmotnosti 1000 zrn) než s HZK-R (redukce hmotnosti zrn na klas). Procento napadení listové plochy v l. termínu (vrchol infekce – V-LP) bylo v těsnější korelaci s HTZ-R než v 2. termínu (konec vývoje choroby – K-LP). Při silném projevu infekce zřejmě postačuje zjišťovat jen % napadení praporcového listu, nejlépe na základě % napadení 1. listu v termínech V a K (vrchol a konec rozvoje choroby) - ukazatel označený ´prum V a K1L´. Symptomatický projev hodnocený na základě 9bodové stupnice byl v relativně těsnější korelaci s redukcí výnosových znaků při hodnocení v terminu zakončení vývoje choroby (K9b). Evidentně je také zřejmě výhodné vycházet z průměrných hodnot V a K (VK9b).

**Tabulka 4.** Korelace jednotlivých měřených ukazatelů symptomatické reakce s HTZ-R (redukce hmotnosti 1000 zrn) a HZK-R (redukce hmotnosti zrn na klas)

| | HTZ-R (n= 200) | | HZK-R (n=200) | |
|---|---|---|---|---|
| | Kor | Pravd | Kor | Pravd |
| **HTZ-R** | **** | **** | **0,620** | 0,0000 |
| **HZK-R** | **0,620** | 0,0000 | **** | **** |
| **% NAPADENÍ LISTOVÉ PLOCHY** | | | | |
| **V/1L (vrchol infekce, 1.list)** | **0,620** | 0,0000 | **0,543** | 0,0000 |
| **V/2L (vrchol infekce, 2. list)** | **0,579** | 0,0000 | **0,530** | 0,0000 |
| **V- LP (suma V 1. a 2.list)** | **0,636** | 0,0000 | **0,565** | 0,0000 |
| **K/1L (konečné hodnocení,1. list)** | **0,543** | 0,0000 | **0,550** | 0,0000 |
| **K/2L (konečné hodnocení,2. list)** | **0,542** | 0,0000 | **0,526** | 0,0000 |
| **K-LP (suma K 1. a 2. list)** | **0,558** | 0,0000 | **0,560** | 0,0000 |
| **prum V a K1L(prům. V a K 1.listu)** | **0,618** | 0,0000 | **0,579** | 0,0000 |
| **prum- V a KLP (prům. V a K list.plochy)** | **0,627** | | **0,587** | |
| **BONITACE 1-9** | | | | |
| **V9b (vrchol infekce)** | **-0,670** | 0,0000 | **-0,528** | 0,0000 |
| **K9b (konec infekce)** | **-0,717** | 0,0000 | **-0,689** | 0,0000 |
| **VK9b (průměr V a K)** | **-0,725** | 0,0000 | **-0,633** | 0,0000 |

**Tabulka 5.** Odrůdová reakce na infekci *S. tritici* na základě jednotlivých měřených ukazatelů symptomatické reakce, jakož i na základě redukce výnosových znaků (průměr šetření přes lokality a izoláty; LSD test; P<0,05)

| **P9b** (počátek infekce)(1-9) | | | **V/1L** (vrchol infekce, 1.list) (%) | | | **K-LP**(suma K 1. a 2. list)(%) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Arina** | 6,99 | a | **Arina** | 9,28 | a | **Arina** | 64,90 | a |
| **Mulan** | 6,56 | ab | **Mulan** | 13,03 | a | **Mulan** | 82,32 | b |
| **Bohemia** | 6,41 | b | **Bohemia** | 21,00 | b | **Bohemia** | 94,89 | c |
| **Seladon** | 5,14 | c | **Seladon** | 31,85 | c | **Seladon** | 103,61 | c |
| **Bakfis** | 5,05 | c | **Bakfis** | 36,07 | c | **Bakfis** | 117,86 | d |
| **V9b** (vrchol infekce)(1-9) | | | **V/2L** (vrchol infekce, 2. list) (%) | | | **Prum V a K1L**(prům. V a K 1.listu)(%) | | |
| **Arina** | 6,41 | a | **Arina** | 22,07 | a | **Arina** | 22,47 | a |
| **Mulan** | 4,91 | b | **Mulan** | 31,90 | ab | **Mulan** | 29,68 | b |
| **Bohemia** | 4,75 | b | **Bohemia** | 38,65 | bc | **Bohemia** | 39,06 | c |
| **Seladon** | 3,33 | c | **Bakfis** | 44,60 | d | **Seladon** | 46,84 | d |
| **Bakfis** | 2,98 | c | **Seladon** | 44,67 | d | **Bakfis** | 56,03 | e |
| **K9b** (terminální hodnocení)(1-9) | | | **V-LP** (suma V 1. a 2.list)(%) | | | **Prum V a KLP**(prům. V a K list.plochy)(%) | | |
| **Arina** | 4,93 | a | **Arina** | 20,05 | a | **Arina** | 42,48 | a |
| **Mulan** | 3,93 | b | **Mulan** | 28,59 | ab | **Mulan** | 55,45 | b |
| **Bohemia** | 3,36 | c | **Bohemia** | 39,85 | b | **Bohemia** | 67,37 | c |
| **Seladon** | 2,54 | d | **Seladon** | 53,64 | c | **Seladon** | 78,62 | d |
| **Bakfis** | 2,14 | e | **Bakfis** | 57,83 | c | **Bakfis** | 87,84 | d |
| **VK9b** (průměr V a K)(1-9) | | | **K/1L**(konečné hodnocení,1. list)(%) | | | **HTZ-R (%)** | | |
| **Arina** | 5,67 | a | **Arina** | 35,65 | a | **Arina** | 4,46 | a |
| **Mulan** | 4,42 | b | **Mulan** | 46,33 | b | **Bohemia** | 7,62 | b |
| **Bohemia** | 4,05 | c | **Bohemia** | 57,12 | c | **Mulan** | 9,17 | b |
| **Seladon** | 2,94 | d | **Seladon** | 61,82 | c | **Seladon** | 16,89 | c |
| **Bakfis** | 2,56 | d | **Bakfis** | 75,99 | d | **Bakfis** | 18,79 | c |
| **PVK9b** (průměr P, V a K)(1-9) | | | **K/2L**(konečné hodnocení,2. list)(%) | | | **HZK-R (%)** | | |
| **Arina** | 5,97 | a | **Arina** | 59,97 | a | **Arina** | 17,29 | a |
| **Mulan** | 4,79 | b | **Mulan** | 73,78 | b | **Mulan** | 20,87 | b |
| **Bohemia** | 4,52 | b | **Bohemia** | 77,44 | b | **Seladon** | 28,51 | c |
| **Seladon** | 3,32 | c | **Seladon** | 85,67 | c | **Bohemia** | 30,85 | c |
| **Bakfis** | 2,97 | c | **Bakfis** | 85,84 | c | **Bakfis** | 34,70 | d |

Poučné bylo také posouzení významnosti odrůdových rozdílů pro jednotlivé měřené znaky **(tabulka 5).** Odrůdové rozdíly v rezistenci k *S. tritici* detekované na základě dlouhodobého šetření (Arina > Mulan > Bohemia > Seladon ≥ Bakfis) byly nejlépe postižitelné pomocí K9b (terminální hodnocení 9bodovou stupnicí) a VK9b (průměr hodnocení v termínech vrchol a konec rozvoje choroby – V a K). Ze znaků vypovídajících o % napadení listové plochy tomuto požadavku nejlépe vyhovovalo zjišťování průměru napadení plochy 1. listu v termínech V a K (prum V a K1L), jakož plochy dvou horních listů ve stejných dvou termínech (prum V a KLP). Hodnocení na základě aritmetického průměru napadené plochy 1. listu ve druhém a konečném termínu použili také Schilly *et al*. (2011) pro posuzování stability rezistence evropských odrůd ozimé pšenice k napadení braničnatkou pšeničnou na základě regresní analýzy. Rezistence odrůdy Arina byla dobře prokázána i podle redukce výnosových znaků HZK a HTZ. Evidentní je však rozdílnost ovlivnění projevu výnosových znaků HTZ a počet zrn na klas vlivem infekce mezi odrůdami. Zvláště odrůda Bohemia byla velmi rozdílně klasifikována na základě HTZ-R (mírně odolná) a HZK-R (náchylná). Zjišťování tolerance k nákaze by se zřejmě nemělo zaměřovat jen na zjišťování HTZ-R. I přes silnější ovlivnění HZK-R jinými, negenetickými faktory (u tohoto znaku byl zjištěn 17,4% podíl chybové složky na celkové proměnlivosti; u HTZ-R 8,2%) má zjevně i zjišťování redukce hmotnosti zrna na klas (HZK-R), eventuálně i počtu zrn na klas, své opodstatnění.

Pro jednotlivé sledované ukazatele jsme dále vyhodnotili podíl jednotlivých faktorů na celkové proměnlivosti **(tabulka 6).** Vzhledem k relativně nízké chybové složce byla prokázána vysoká statistická významnost většiny faktorů podílejících se na proměnlivosti, avšak rozdíly v F hodnotách pro jednotlivé znaky symptomatického projevu ukazují na rozdíly v podílu jednotlivých složek proměnlivosti na celkové proměnlivosti pro sledovaný znak. Rozhodující význam má hodnocení v termínech V a K (vrchol a konec rozvoje choroby). Při hodnocení na počátku vývoje choroby (P) je obvykle detekována nízká proměnlivost vlivem odrůdy. Jako významné se ukázalo při dostatečném rozvoji infekce zvláště hodnocení napadené plochy 1. listu v terminální fázi K (nízká interakce odrůda x prostředí), případně též stanovení % napadení 1. listu v termínech V a K. Hodnocení napadení listové plochy v termínu V (vrchol infekce) a 2. listu může výrazně zvýšit podíl proměnlivosti vlivem prostředí i interakční složky odrůda x prostředí. **Důležité je správné určení termínů hodnocení s ohledem na vývoj choroby v daném roce či místě - optimální pro posuzování symptomatické reakce je zřejmě vhodně zvolené terminální hodnocení.** Upozornit je však třeba na to, že v pozdějších termínech mohou být výsledky hodnocení ovlivněny ve větší míře zasycháním/ poškozením listů v důsledku jiných vlivů či chorob.

**Tabulka 6.** F hodnoty z analýz rozptylu pro sledované ukazatele symptomatické reakce, jakož i redukce výnosových znaků HTZ a hmotnost zrn na klas. (použité označení znaků, viz tabulka 5)
Všechny F hodnoty jsou vysoce statisticky významné (**P<0,01), s výjimkou vlivu izolátu na HZK-R (P<0,05)

| BONITACE 1-9 | St. vol. | P9b | V9b | K9b | VK9b | PVK9b | HTZ-R | HZK-R |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Odrůda | 4 | 238,74 | 1136,72 | 606,49 | 1010,64 | 1163,88 | 168,11 | 65,23 |
| Izolát | 9 | 25,85 | 42,41 | 78,41 | 69,99 | 72,46 | 3,38 | 2,19 |
| prostředí | 3 | 1009,38 | 619,81 | 95,55 | 298,07 | 386,19 | 206,37 | 65,07 |
| Odrůda × Izolát | 36 | 3,62 | 9,65 | 14,14 | 12,85 | 12,43 | 2,41 | 2,06 |
| Odrůda × prostředí | 12 | 8,09 | 67,57 | 25,46 | 48,93 | 56,26 | 12,63 | 6,04 |
| Izolát × prostředí | 27 | 13,42 | 19,86 | 16,77 | 17,98 | 19,61 | 9,94 | 2,49 |
| Odrůda × Izolát × prostředí | 108 | 3,82 | 3,41 | 2,45 | 2,16 | 2,12 | 2,35 | 1,86 |
| % NAPADENÍ LIST. PLOCHY | V/1L | V/2L | V-LP | K/1L | K/2L | K-LP | Prum V a KLP | Prum V a K1L |
| Odrůda | 262,04 | 247,60 | 362,91 | 393,12 | 426,79 | 520,13 | 801,45 | 581,422 |
| Izolát | 17,76 | 42,89 | 32,24 | 88,28 | 239,77 | 156,89 | 148,54 | 80,645 |
| prostředí | 1177,49 | 3936,04 | 2613,79 | 884,09 | 1097,22 | 1239,40 | 3275,95 | 1774,611 |
| Odrůda × Izolát | 4,56 | 6,57 | 6,62 | 11,16 | 22,04 | 17,17 | 17,59 | 10,941 |
| Odrůda × prostředí | 57,17 | 58,46 | 75,84 | 10,44 | 32,01 | 17,32 | 45,86 | 30,197 |
| Izolát × prostředí | 10,76 | 29,26 | 18,05 | 17,22 | 55,36 | 30,94 | 25,97 | 15,548 |
| Odrůda × Izolát × prostředí | 2,73 | 4,06 | 3,50 | 2,48 | 4,30 | 2,75 | 2,83 | 2,365 |

**Vlastní pokusy s hodnocením stupně napadení po infekci *S. tritici* probíhající v rámci řešení projektu QJ 1310189 jednoznačně prokázaly výhodnost posuzování odrůdové reakce v termínech V a K (vrchol a konec infekce) jako aritmetický průměr těchto stanovení. Korelace s redukcí výnosových znaků HTZ i hmotnost zrn na klas (HZK) byla pro % napadení listové plochy těsnější v termínu, kdy infekce vrcholila a pro bodové hodnocení (stupnice 1-9) při terminálním hodnocení. Zjišťování % napadení dvou horních listů je nepochybně závažným údajem, avšak značně pracovně náročným. Při zajištění silné infekce se lze (bez snížení přesnosti stanovení stupně rezistence hodnocených odrůd) soustředit pouze na napadení plochy praporcového listu. Z praktického šlechtitelského hlediska je velmi přínosné posuzování rychlosti šíření infekce a velikosti napadení listové plochy 9bodovou stupnicí (sloučením do jednoho bodového ukazatele), jak je dokumentováno v tomto odstavci. Nepochybně cenné je také posouzení redukce výnosových znaků HTZ a HZK, což je podmíněno velmi nízkým napadením kontrolní neinfikované varianty. Vyšší vypovídací hodnotu má zřejmě údaj o redukci HTZ, ale své opodstatnění nepochybně má (vzhledem k prokázaným odrůdovým rozdílům v ovlivnění jednotlivých výnosových prvků průběhem infekce) i zjišťování redukce hmotnosti zrna klas (HZK-R), eventuálně též počtu zrn na klas (pozitivní korelace mezi HTZ-R a HZK-R nebyly zjištěny). Údaje o redukci výnosových znaků v důsledku infekce slouží k upřesnění charakteristiky vyšlechtěných odrůd či pokročilého liniového materiálu.**

## III. SROVNÁNÍ NOVOSTI PŘÍSTUPŮ A METODICKÁ DOPORUČENÍ PRO TESTOVÁNÍ REZISTENCE K HNĚDÝM LISTOVÝM SKVRNITOSTEM

Předložená metodika pro praxi se jednak opírá o dlouholeté zkušenosti získané při provádění kruhových testů rezistence k původcům závažných chorob pšenice (testy probíhají

každoročně počínaje rokem 2002). Dále vychází z dostupných literárních údajů a především z výsledků speciálních pokusů s braničnatkou pšeničnou, které proběhly v období 2012-2014 na dvou stanovištích v rámci řešení výzkumného projektu QJ 1210189. Nové závěry a doporučení se týkají jak obecných hledisek (biologických a genetických zvláštností jednotlivých původců hnědých listových skvrnitostí, struktury jejich populací, vztahů hostitel – patogen, průběhu infekce, škodlivosti aj.), tak především vlastní metodiky testování v polních podmínkách, speciálně výběru izolátů pro inokulace, uspořádání a vedení pokusů, přípravy inokula a provádění inokulace, jakož i hodnocení stupně napadení (projevu infekce).

Výsledky monitoringu výskytu hnědých listových skvrnitostí na území ČR za 14leté období (2000-2013) opodstatnily zaměření na tři hlavní původce (*Septoria tritici, Pyrenophora tritici – repentis* a *Stagonospora nodorum*). Prioritou je nepochybně dosažení kombinované rezistence k těmto třem původcům. Zvláště obtížné se ukázalo kombinování rezistence k braničnatkám s rezistencí k PTR (helmitospóriová skvrnitost). Přínosem do budoucna může být detekce a výběr společných QTL (broad spectrum resistance loci).

V našich podmínkách ojedinělé jsou výsledky studia odrůdové reakce na vybrané izoláty braničnatky pšeničné, u které lze na základě literárních údajů předpokládat značně diverzifikovaný systém hostitel/patogen. Zásady výběru izolátů pro testy rezistence byly podrobně specifikovány. Prakticky závažné je především zjištění, že specifické reakce na některý izolát jsou v našem území zřejmě ojedinělé a vhodná směs izolátů zahrnující divergentní izoláty by měla šlechtitelské požadavky uspokojit. Testy rezistence by se měly opírat o izoláty vyvolávající vysoce převládající hostitelskou reakci, stabilní v různých podmínkách prostředí. Směs izolátů *S. tritici* splňující tyto požadavky byla doporučena pro využití ve šlechtění a zkoušení odrůd. Nepochybně prospěšná je také konfrontace výsledků testování s údaji získanými v podmínkách přirozené infekce, kdy se spektrum patogenů může projevit v celé šíři. Metodika pro praxi dále přináší popis a výsledky analýzy regrese na průměrný projev odrůdy v různém prostředí po infekci 10 izoláty braničnatky pšeničné. Tato metoda umožňuje vybrat izoláty vyznačující se především schopností dobře postihnout odrůdové rozdíly v rezistenci a vykázat projev očekávaný v daném prostředí. Regresní analýza slouží rovněž k detekci materiálu se stabilním projevem rezistence v různém prostředí (jak je literárně doloženo). Pokusy vedou obecně k závěru, že zjišťování stability rezistence v různém prostředí lze zřejmě nadřadit zjišťování shody reakce na různé izoláty patogena.

Doporučen je hnízdový výsev materiálu (přijatý též v kruhových testech probíhajících od roku 2002), který umožňuje vytvořit příznivější mikroklima pro rozvoj choroby a také ovlivnění sousedními členy je nižší než při řádkovém výsevu. Dále je pro správné postižení odrůdové reakce na napadení určitým patogenem závažná izolace jednotlivých pokusných variant. Osvědčilo se použití tritikale či vysoké odrůdy pšenice s pevným stéblem a rezistencí k původcům sledovaných chorob.

Detailně jsou popsány techniky kultivace jednotlivých patogenů, příprava inokula, jakož i vlastní inokulace postřikem či rozhozem infikovaných zrn (PTR). Postřik se doporučuje provádět co nejdříve (od fáze BBCH 39), před objevením praporcového listu, nejméně dvakrát (v přibližně 14denních intervalech). Pro zajištění dostatečné nákazy klasů je třeba u braničnatky plevové provádět inokulace též na začátku metání (fáze BBCH 50-59). K těmto zvláštnostem v termínování postřiků u braničnatek se dosud nepřihlíželo, což mělo negativní dopad na výsledky testů. Inokulace PTR *(Pyrenophora tritici – repentis)* rozhozem infikovaných obilek je u ozimů opakována ve dvou termínech (XI-XII; III-IV); u jarní pšenice je obvykle prováděna inokulace postřikem přímo na listy. Významným opatřením pro podporu infekce se ukázalo zakrytí plastikovými sáčky po cca 24 hod.

V neposlední míře je třeba věnovat vysokou pozornost také metodám hodnocení stupně napadení. Jsou přiloženy klíče využitelné jak pro hodnocení % napadení listové plochy a

klasu, tak pro hodnocení postupu infekce devítibodovou stupnicí. Závěry vycházejí především z pokusů 2012-2014 s izoláty braničnatky pšeničné. Tyto pokusy obecně ukázaly nutnost zajištění dostatečného rozvoje infekce. Pro posouzení redukce výnosových znaků v důsledku infekce je třeba zajistit dostatečnou prostorovou izolaci kontrolní neinfikované varianty:

1/ Hodnocení 9bodovou stupnicí vychází z hodnocení rychlosti šíření infekce a stupně poškození listové plochy, obvykle na základě jednoho bodového ukazatele. Tato metoda hodnocení je v současné době ve šlechtění nejvíce využívána a naše pokusy ukázaly, že zvláště zjišťování v termínu zakončení vývoje choroby nejlépe postihovalo odrůdové rozdíly v rezistenci a vykazovalo nejtěsnější korelace s redukcí HTZ i hmotnosti zrn na klas. Doporučit lze průměr měření v termínech V (vrchol infekce) a K (konec infekce).

2/ V termínech V a K se ukázalo také jako velmi přínosné zjišťovat % napadení plochy dvou horních listů. Toto stanovování je pracnější, a proto je především využíváno pro výzkumné studie či odrůdovou charakteristiku. Měření druhého listu však může značně zvyšovat negenetickou proměnlivost, a proto je při zajištění dostatečného rozvoje choroby doporučováno (postačuje) zjišťování % napadení plochy praporcového listu (podpořeno i dostupnou literaturou).

3/ O možnosti omezení výnosových ztrát v důsledku odrůdové rezistence k infekci nejlépe vypovídají co nejpřesněji stanovené údaje o redukci výnosových znaků hmotnost tisíce zrn (HTZ) a hmotnost zrn klas (HZK). Tyto redukce vykázaly statisticky vysoce významné korelace se všemi zjišťovanými ukazateli průběhu infekce a napadení listové plochy.

## IV. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika testování rezistence pšenice k původcům hnědých listových skvrnitostí je určena především šlechtitelským pracovištím. Bezprostřední je ale také využití zde popsaných metod a postupů v odrůdovém zkušebnictví, jakož i v oblastech aplikovaného i základního výzkumu. Získání co nejpřesnějších údajů o rezistenci odrůd je nezbytné pro zajištění účinnější ochrany v zemědělské praxi.

## V. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Předpokládané ekonomické přínosy jsou obtížně vyčíslitelné. V současné době je v České republice stále nejpoužívanější ochranou proti těmto listovým chorobám aplikace fungicidů. Dosažení rezistence odrůd však nabývá na významu s plánovaným zákazem používání některých fungicidních přípravků (účinných látek) – viz. Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2009/128/ES ze dne 21. října 2009. V tomto kontextu se jeví jako důležité dosažení kombinované rezistence ke všem závažným původcům těchto chorob. Správné postižení úrovně rezistence, na což je především zaměřena tato práce, má zásadní význam nejen pro šlechtění, ale též pro předložení optimální pěstební technologie dané odrůdy (především určení, do jaké míry lze bez citelných ztrát omezit náklady na aplikaci chemických prostředků). Pokud zvažujeme přímo ekonomické přínosy, pak pro výpočet zisku musíme vycházet z rozdílu mezi navýšeným výnosem při kombinované rezistenci v důsledku omezení ztrát (5,21 t/ha) a stávajícím výnosem v zemědělské praxi (5 t/ha) (Oerke *et al.*, 1994).

Při pěstování rezistentních odrůd na 10 % ploch činí roční zisk 94 510 tis. Kč (840 Kč je zisk z 1 ha). Výsledky vlastních pokusů indikují i možnost dosažení vyššího výnosu než 5,21 t/ha po introdukci resistence. Udávaná průměrná redukce HZK v důsledku napadení původci těchto listových chorob je 16 %; při dosažení rezistence je to však 9,6 % (tj. o více než 40 % nižší redukce, viz odstavec 1.2.). Na základě těchto údajů pak lze kalkulovat s průměrným výnosem 5,38 t/ha.

Další ekonomicky závažné hledisko je zmíněná úspora finančních prostředků v důsledku omezení aplikace chemických ochranných prostředků po dosažení kombinované rezistence k původcům listových chorob (a to minimálně o jeden postřik). Ekonomicky to představuje finanční úsporu cca 700 Kč na 1 ha. Dosažení vysoké rezistence je také předpokladem pro použití odrůdy v ekologickém zemědělství. Obtížně ekonomicky zhodnotitelný, ale ve své podstatě nejzávažnější, je přínos pro ochranu životního prostředí.

## VI. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY


Arraiano L.S., Brading P.A., Brown J.K.M. (2001): A detached seedling leaf technique to study resistance to *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) in wheat. Plant Pathology **50** (3): 339-346.

Arraiano L.S., Brown J.K.M. (2006): Identification of isolate-specific and partial resistance to septoria tritici blotch in 238 European wheat cultivars and breeding lines. Plant Pathology **55**: 726-738.

Brading P.A., Verstappen E.C.P., Kema G.H.J., Brown J.K.M. (2002): A gene-for-gene relationship between wheat and *Mycosphaerella graminicola*, the Septoria tritici blotch pathogen. Phytopathology **92**: 439-445.

Chartrain L., Brading P.A., Widdowson J.P., Brown J.K.M. (2004): Partial resistance to Septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in wheat cultivars Arina and Riband. Phytopathology **94**: 497-504.

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**: 87-90.

Chrpová J., Šíp V., Bartoš P., Hanzalová A., Palicová J., Štočková L., Čejka L., Bížová I., Laml P., Nováček T., Horčička P. (2012): Results of the Czech National Ring Tests of disease resistance in wheat. Czech J. Genet. Plant Breed. **48** (4): 189-199.

Cowger C., Murphy J.P. (2007): Artificial inoculation of wheat for selecting resistance to Stagonospora nodorum blotch. Plant Dis. **91:** 539-545.

Drabešová J. (2012): Zhodnocení genetické struktury *Mycosphaerella graminicola* a četnost výskytu alely rezistence ke QoI fungicidům v populaci na území České republiky. Disertační práce, ČZU Praha, 80 pp.

Drabešová J., Ryšánek P., Brunner P., McDonald B.A., Croll D. (2013): Population genetic structure of *Mycosphaerella graminicola* and quinone outside inhibitor (QoI) resistance in the Czech Republic. Eur.J.Plant Pathol. **135**: 211-224.

Eberhart S.A., Russell W.A. (1966): Stability parameters for comparing varieties. Crop Sci., **6**: 36-40.

Eyal Z., Scharren A.L., Prescott J.M., Ginkel van M. (1987): The *Septoria* diseases of wheat: concepts and methods of disease management. CIMMYT, Mexico.

Eyal Z. (1999): The septoria tritici and stagonospora nodorum blotch diseases of wheat. Eur.J. Plant Pathol. **105**: 629-641.

Faris J.D., Liu Z., Xu S.S. (2013): Genetics of tan spot resistance in wheat. Theor. Appl. Genet. **126**: 2197-2217.

Francki M.G. (2013): Improving *Stagonospora nodorum* resistance in wheat: A review. Crop Sci. **53**: 355-365.

Gurung S., Hansen J. M., Bonman J.M., Gironella A.I.N., Adhicari T.B. (2012): Multiple disease resistance to four leaf spot diseases in winter wheat accessions from the USDA National Small Grains Collection. Crop Sci. **52** (4): 1640-1650.

Horčička P., Marková O., Hanišová A. (2001): Effects of *Septoria* and *Pyrenophora* on reduction of winter wheat yield. Beitr. Züchtungsforsch.: 55-59.

Kema G.H.J., Annone J.H., Sayoud R.S., Van Silfhout C.H., Van Ginkel M., de Bree J. (1996): Genetic variation for virulence and resistance in the wheat- *Mycosphaerella graminicola* pathosystem. I. Interactions between pathogen isolates and wheat cultivars. Phytopathology **86**: 200-212.

Lamari L., Bernier C.C. (1989): Evaluation of wheat lines and cultivars to tan spot [*Pyrenophora tritici-repentis*] based on lesion type. Can. J. Plant Pathol. **11**: 49-56.

Metodika ÚKZÚZ pro zkoušky užitné hodnoty odrůd. Brno 2005, 37pp.

Mahto B. N., Gurung S., Adhikari Tika B. (2011): Assessing genetic resistance to spot blotch, Stagonospora nodorum blotch and tan spot in wheat from Nepal. Eur. J. Plant Pathol. **131**: 249–260.

Miedaner T., Risser P., Paillard S., Schnurbusch T., Keller B., Hartl L., Holzapfel J., Korzun V., Ebmeyer E., Utz H.F. (2012): Broad-spectrum resistance loci for three quantitatively inherited diseases in two winter wheat populations. Mol. Breeding **29**: 731-742.

Oerke et al.(1994): Crop Production and Crop Protection: Conclusions and Perspectives. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands: 742-769.

Palicová-Šárová J., Hanzalová A. (2006): Reaction of 50 winter wheat cultivars grown in the Czech Republic to *Pyrenophora tritici-repentis* races 1, 3, and 6. Czech J. Genet. Plant Breed. **42** (2): 31-37.

Quaedvlieg W., Kema G.H.J., Groenewald J.Z., Verkley G.J.M., Seifbarghi S., Razavi M., Gohari A.M., Mehrabi R., Crous P.W. (2011): *Zymoseptoria* gen. nov.: a new genus to accommodate *Septoria*-like species occurring on graminicolous hosts. Persoonia **26**: 57-69.

Quaedvlieg W., Verkley G.J.M., Shin H.-D., Barreto R.W., Alfenas A.C., Swart W.J., Groenewald J.Z., Crous P.W. (2013): Sizing up Septoria. Studies in Mycology **75**: 307-390.

Raymond P.J., Bockus W.W., Norman B.L. (1985): Tan spot of winter wheat: procedures to determine host response. Phytopathology **75**: 686-690.

Risser P., Ebmezer E., Korzun V., Hartl L., Miedaner T. (2011): Quantitative trait loci for adult-plant resistance to *Mycosphaerella graminicola* in two winter wheat populations. Phytopathology **101** (10): 1209-1216.

Seznam doporučených odrůd, obiloviny a luskoviny, 2014, ÚKZÚZ Brno. ISBN978-80-7401-089-7.

Schilly A., Risser P., Ebmeyer E., Hartl L., Reif J.C., Würschum T., Miedaner T. (2011): Stability of adult-plant resistance to Septoria tritici blotch in 24 European winter wheat varieties across nine field environments. J. Phytopathol. **159**: 411-416.

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.

Singh P.K., Duveiller E., Singh R.P. (2011): Evaluation of CIMMYT germplasm for resistance to leaf spotting diseases of wheat. Czech J. Genet. Plant Breed. **47** (special issue): S102-S108.

Strelkov S. E., Lamari L. (2003): Host-parasite interactions in tan spot [*Pyrenophora tritici-repentis*] of wheat. Can. J. Plant Pathol. **25:** 339-349.

Stukenbrock E.H., McDonald B.A. (2007): Geographical variation and positive diversifying selection in the host-specific toxin SnToxA. Mol. Plant Pathol. **8** (3): 321-332.

Suetrong S., Schoch C.L., Spatafora J.W., Kohlmeyer J., Volkmann-Kohlmeyer, Sakayaroj J., Phongpaichit S., Tanaka K., Hirayama K., Jones E.B.G. (2009): Molecular systematics of the marine Dothideomycetes. Studies in Mycology **64**: 155-173.

Šárová J., Šíp V., Hanzalová A. (2002): Response of winter wheat cultivars to artificial infection with *Pyrenophora tritici-repentis* in field and greenhouse conditions. Plant Prot. Sci. **38**: 575-579.

Šíp V., Stuchlíková E., Chrpová J. (2001): The response of selected winter wheat cultivars to artificial infection with *Septoria tritici* under field conditions. Czech J. Genet. Plant Breed. **37**: 73-81.

Šíp V., Šárová J., Chrpová J., Sychrová E., Čejka L., Hanišová A. (2003): Breeding wheat for resistance to brown leaf spot diseases in Czech Republic. Proc. EUCARPIA Cereal Section Meeting, (C. Maré, F. Faccioli and A.M. Stanca eds.), 21-25 November, 2002, Salsomaggiore, Italy: 303-306.

Šíp V., Bartoš P., Chrpová J., Hanzalová A., Širlová L., Šárová J., Dumalasová V., Čejka L., Hanišová A., Bobková L., Bížová I., Horčička P. (2005): Theoretical bases and sources for breeding wheat for combined disease resistance. Czech J. Genet. Plant Breed. **41**: 127-143.

Šíp V., Chrpová J., Sýkorová S. (2008): Assessing resistance to head blight in wheat cultivars inoculated with different *Fusarium* isolates. Czech J. Genet. Plant Breed. **44**: 43-59.

Šíp V., Růžek P., Chrpová J., Vavera R., Kusá H. (2009): The effect of tillage practice, input level and environment on grain yield of winter wheat in the Czech Republic. Field Crops Res., **113:** 131-137.

Šíp V., Chrpová J., Štočková L. (2011): Evaluation of resistance to Fusarium head blight in wheat using different sources of inoculum. Czech J. Genet. Plant Breed. **47**: 131-139.

Tadesse W., Hsam S.L.K., Wenzel G., Zeller F.J. (2008): Chromosome location of a gene conferring resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* in Ethiopian wheat cultivars. Euphytica **162**: 423-430.

Van Beuningen L.T., Kohli M.M. (1990): Deviation from the regression of infection on heading and height as a measure of resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat. Plant Dis. **74:** 488-493.

Věchet L., Hanzalová J., Drabešová J., Palicová J., Hanzalová A., Martinek P. (2013): Uplatnění nových poznatků o braničnatce pšeničné (*Mycosphaerella graminicola*) ve šlechtění na rezistenci. Metodika pro praxi, VÚRV v.v.i., Praha, 12 pp.

## VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Chrpová J., Šíp V., Bartoš P., Hanzalová A., Palicová J., Štočková L., Čejka L., Bížová I., Laml P., Nováček T., Horčička P. (2012): Results of the Czech National Ring Tests of disease resistance in wheat. Czech J. Genet. Plant Breed. **48** (4): 189-199.

Šíp V., Stuchlíková E., Chrpová J. (2001): The response of selected winter wheat cultivars to artificial infection with *Septoria tritici* under field conditions. Czech J. Genet. Plant Breed. **37**: 73-81.

Šíp V., Šárová J., Chrpová J., Sychrová E., Čejka L., Hanišová A. (2003): Breeding wheat for resistance to brown leaf spot diseases in Czech Republic. In: Proc. EUCARPIA Cereal Section Meeting, (C. Maré, F. Faccioli and A.M. Stanca eds.), 21-25 November, 2002, Salsomaggiore, Italy: 303-306.

Šíp V., Horčička P., Sychrová E., Chrpová J., Čejka L., Hanišová A. (2003): Breeding wheat for resistance to Septoria tritici blotch in the Czech Republic. In: Proc. of the 6th Internat. Symposium on Septoria/Stagonospora Diseases of Cereals. (G.H.J. Kema, M.van Ginkel and M. Harrabi eds.), 8-12 December 2003, Tunis, Tunisia: 169-170.

Šíp V., Bartoš P., Chrpová J., Hanzalová A., Širlová L., Šárová J., Dumalasová V., Čejka L., Hanišová A., Bobková L., Bížová I., Horčička P. (2005): Theoretical bases and sources for breeding wheat for combined disease resistance. Czech J. Genet. Plant Breed. **41**: 127-143.

Věchet L., Vojáčková M. (2005): Use of detached seedling leaf test to evaluate wheat resistance to Septoria tritici blotch. Czech J. Genet. Plant Breed. **41**: 112-116.

Věchet L., Hanzalová J., Drabešová J., Palicová J., Hanzalová A., Martinek P. (2013): Uplatnění nových poznatků o braničnatce pšeničné (*Mycosphaerella graminicola*) ve šlechtění na rezistenci. Metodika pro praxi, VÚRV v.v.i., Praha, 12 pp.

Autoři:
Ing. Václav Šíp, CSc. (30%)
Ing. Jana Chrpová, CSc. (20%)
Mgr. Jana Palicová, Ph.D. (20%)
Mgr. Alena Hanzalová, Ph.D. (20%)
Ing. Lubomír Čejka (10%)

Název: Metodika testování rezistence pšenice k původcům hnědých listových skvrnitostí 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: 95 výtisků

Vydáno bez jazykové úpravy

Metodika poskytnuta bezplatně

Kontakt na autora: sip@vurv.cz

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha 6 – Ruzyně, 2014

ISBN: 978-80-7427-163-2