

Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský
Holovousy s.r.o.
oddělení ochrany rostlin

PROTOKOL

IN VIVO SKLENÍKOVÉ TESTY CITLIVOSTI VENTURIA INAEQUALIS K ÚČINNÉ LÁTCE PYRIMETHANIL
(ANILINOPYRIMIDINY)

Cíl pokusu: Potvrdit sníženou citlivost populace strupovitosti jabloně (*Venturia inaequalis*) k fungicidům Mythos 30 SC (úč. l. pyrimethanil)

Úvod:

Anilinopyrimidiny (AP fungicidy) jsou fungicidy účinné proti širokému spektru houbových patogenů. Z této chemické skupiny jsou v České republice využívány proti *V. inaequalis* účinné látky pyrimethanil (Batalion 450 SC, Gladius 450 SC, Minos, Minos Forte, Mythos 30 SC, Pyrus 400 SC a kombinovaný přípravek Faban) a cyprodinil (Chorus 50 WG, Vedette). Tyto látky účinkují preventivně i kurativně, působí kontaktně a hloubkově nebo lokálně systémově. AP fungicidy mají nižší účinnost na inhibici klíčivosti askospor a hůře zabráňují pronikání klíčivého vlákna do kutikuly listu ve srovnání s klasickými kontaktními fungicidy s účinnou látkou captan. Výhodné je využít jejich lokálně systemického účinku a dobré účinnosti za nižších teplot v průběhu chladného deštivého jara. Důvody lepší účinnosti AP fungicidů za těchto podmínek je pomalejší vývoj patogenu a omezení výparu, což prodlouží období ochrany díky jejich reziduální účinnosti. Cílovým místem účinku těchto fungicidů je syntéza aminokyselin a proteinů. Konkrétně mechanismus účinku spočívá v inhibici biosyntézy methioninu a v inhibici sekrece hydrolytických enzymů patogenu. Anilinopyrimidiny vykazují v rámci své chemické skupiny křížovou rezistenci, ale nevykazují křížovou rezistenci s jinými skupinami fungicidů, jako jsou triazoly (DMI fungicidy) a strobiluriny (QoI fungicidy). Existuje střední riziko rezistence u *V. inaequalis* k AP fungicidům. Potenciální příčinou rezistence k AP fungicidům je mutace v regulaci biosyntézy methioninu, zatím ale nebyly zjištěny konkrétní mutace v cílových genech (*cb1*, *cgs*).

Metodika:

Byl testován fungicid **Mythos 30 SC** (úč. l. pyrimethanil 300 g/kg; BASF SE; aplikovaná dávka 0,75–1 L/ha). Pro pokus byly použity semenáčky jabloně odrůdy 'Golden Delicious'. Tyto testy vycházejí z metodiky FRAC (Fungicide Resistance Action Committee): VENTIN *in vivo*-AP (BASF, 2006 V1). Rostliny byly preventivně ošetřeny fungicidem Mythos 30 SC v odstupňovaných koncentracích účinné látky pyrimethanil: 0 ppm; 100 ppm; 300 ppm. Pro každou variantu koncentrace účinné látky bylo použito 20–24 rostlin. Po 24 hodinách od ošetření

byly semenáčky inokulovány suspenzí konidií. Rostliny byly inkubovány ve tmě v klimatizované komoře při 90% relativní vzdušné vlhkosti a 18 °C po dobu 48 hodin. Jako inokulum byly použity suspenze konidií smyté z infikovaných listů. Koncentrace konidií v inokulu byla spočítána v Bürkerově komůrce a byla upravena na rozmezí 5–15 x 10⁴ konidií v jednom ml. Pro kontrolu životaschopnosti konidií bylo vyhodnoceno procento klíčivosti konidií po 24 hodinách. Výsledky byly porovnány s neošetřenou kontrolou a citlivou populací *V. inaequalis* z lokality Miletín. Tato referenční kontrolní citlivá populace pochází z domácí zahrady, ze stromu, který nebyl fungicidně ošetřován a je vzdálen od nejbližších od produkčních výsadeb jabloní více než 5 km. Vyhodnocení pokusu bylo provedeno po cca 4 týdnech od inokulace, kdy byly pozorovány sporulující léze. Intenzita napadení listů semenáčků původcem strupovitosti byla spočítána dle Townsend-Heubergerova vzorce a dle stupnice uvedené níže, vždy bylo hodnoceno 3–5 plně rozvinutých listů od vrcholku semenáčku. Celkem bylo vyhodnoceno vždy 50 listů na variantu. Následně bylo spočítáno celkové procento napadení listů. U skleníkových testů metodika FRAC uvádí, že výskyt sporulujících lézí *V. inaequalis* na testovaných rostlinách u varianty koncentrace 300 ppm, udává sníženou citlivost vzorku populace *V. inaequalis* k účinné látce pyrimethanil.

Pětibodová stupnice použitá k hodnocení napadení listů:

0 = bez napadení

1 = 1–2 malé skvrny (napadeno do 25 mm² plochy listu)

2 = 3–4 malé skvrny nebo 1 velká (napadeno do 100 mm² plochy listu)

3 = 5–10 malých skvrn nebo 5 velkých (napadeno do 400 mm² plochy listu)

4 = napadeno nad 400 mm² plochy listu

Varianty: V1 – Lukavec (domácí neošetřovaná zahrada, citlivá populace)

V2 – Ing. Marek Drápal

Výsledky hodnocení:

Tabulka č. 1: Stupeň napadení u varianty 300 ppm, porovnání testované populace s citlivou populací *V. inaequalis*

Lokalita	Pěstitel	inokulum		stupeň napadení [%]		
		koncentrace spor v ml	klíčivost po 48 hod. %	K	Mythos 100 ppm	Mythos 300 ppm

Lukavec	domácí zahrada, citlivá populace	12,4 . 10 ⁴	25,6	18,5	3	0,0
Kokonín	Ing. Marek Drápal	5,8.10 ⁴	7,8	11,0	2,5	0

Komentář:

U skleníkových testů metodika FRAC uvádí, že výskyt sporulujících lézí *V. inaequalis* na testovaných rostlinách u varianty koncentrace 300 ppm, udává vysokou citlivost vzorku populace *V. inaequalis* k účinné látce pyrimethanil. Stupeň napadení u varianty 300 ppm bylo 0 %, tudíž lze populace z testované lokality považovat za citlivé.

DETEKCE MUTACE G143A (REZISTENCE KE QOI FUNGICIDŮM) POMOCÍ METODY REAL-TIME PCR (DLE UŽITNÉHO VZORU Č. 32 547)

Úvod:

QoI fungicidy (Quinone outside Inhibitors) inhibují mitochondriální dýchání a ovlivňují tak tvorbu energie potřebnou pro buňku patogena. Cílové místo účinku fungicidu je dýchací řetězec, kde blokuje elektronový transport v místě oxidace chinolu (tzv. Qo centrum) v cytochromu bc₁ na úrovni komplexu III, kde se váže na ubiquinol oxidoreduktázu, což má za následek sníženou produkci ATP. Chemické skupiny patřící do třídy QoI inhibitorů využívané v ochraně proti strupovitosti v České republice jsou převážně oximino-acetáty, což je přípravek s účinnou látkou kresoxim-metyl: Discus a další přípravek patřící do stejné chemické skupiny, ale s účinnou látkou trifloxystrobin je Zato 50 WG. Do jiné chemické skupiny methoxy-karbamátů náleží kombinované přípravky s účinnou látkou pyraclostrobin: Tercel (+ dithianon), Bellis (+ boscalid) a Flint Plus (+ captan). Tyto přípravky působí preventivně a kurativně, účinkují kontaktně, lokálně systémově a některé i systémově. Křížová rezistence je prokázána mezi všemi fungicidy QoI skupiny. Změna v cílovém místě působení fungicidu, která snižuje citlivost k přípravku, je nejčastěji se vyskytujícím mechanismem rezistence u fytopatogenních hub. Při reprodukci hub dochází ke změnám v jejich DNA (mutacím).

Existují mutace spojené s rezistencí ke QoI fungicidům. Byly zjištěny tři substituce aminokyselin v genu cytochromu b, jsou to: změna z glycinu na alanin v pozici 143 (G143A), změna z fenylalaninu na leucin v pozici 129 (F129L) a změna z glycinu na arginin v pozici 137 (G137R). Izoláty patogenu nesoucí mutaci G143A vytváří kompletní rezistenci. Tudíž úplnou ztrátu kontroly nad patogenem, lze vždy pozorovat v

populacích patogena, u kterých je dominantní mutace G143A, vyskytuje se většinou v případech, kde jsou QoIs fungicidy aplikovány samostatně. Izoláty patogenu s mutací F129L nebo G137R vytváří mírnou (částečnou) rezistenci.

Metodika:

Pro detekci přítomnosti wild type (WT) a rezistentní mutované (MUT) varianty G143A mitochondriálního genu *cytb* byla ze směsi konidií *V. inaequalis* izolována celková DNA pomocí soupravy Exgene Plant SV mini (GeneAll), detailní postup izolace je popsán v návodu od výrobce kitu. Izolace byla provedena optimálně ze vzorku populace *V. inaequalis* o počtu 10 miliónů konidií. Některé vzorky nedosahovali takové koncentrace konidií, proto byl jejich počet pro izolaci upraven. Připravené vzorky DNA byly použity jako templát pro real-time PCR reakci s následujícími reakčními podmínkami: 2 µl směs standardů; 1x PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); 2,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP každý; 1U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); 500 nM primery každý; 1x EvaGreen (interkalační barvivo, Biotium). Každý vzorek byl v oddělených zkumavkách otestován na přítomnost sekvence WT a MUT sekvence G143A mitochondriálního genu *cytb*. Real-time PCR reakce probíhá v zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; cyklování 94 °C/20 s, 58 °C/2 s, 72 °C/10 s (50x), s odečtem fluorescence v HRM kanálu. Pro kvantitativní vyhodnocení jsou do real-time PCR běhu přidány čtyři standardy pro WT sekvenci a čtyři standardy pro mutovanou sekvenci G143A mitochondriálního genu *cytb* o známé koncentraci v desítkovém ředění pro sestavení kalibrační křivky. Po ukončení běhu se pomocí Rotor-Gene Q softwaru sestrojí kalibrační křivky pro absolutní kvantifikaci varianty WT a MUT varianty mitochondriálního genu *cytb* v testované populaci *V. inaequalis*. Z absolutních koncentrací jednotlivých variant se po provedení normalizace vypočte zastoupení WT a MUT varianty G143A mitochondriálního genu *cytb* jako procento v testované populaci *V. inaequalis*.

Tabulka č. 2: Procentuální zastoupení mutované varianty ve vzorku

číslo vzorku	LMB kód	datum odběru	Lokalita	pěstitel	typ výsadby	odrůda	postřikový sled	Počet konidií v izolaci DNA [milióny]	% MUT varianty genu <i>cytb</i>
1	Vi201	18.6.2020	Kokonín	Ing. Marek Drápal	ekologická	jadernička	-	5,8	5,4

Komentář:

Vzorek lze považovat za **citlivý ke strobilurinům**. 5,4% mutované varianty genu *cytb* ve vzorku 5,8 milionů konidií. Rezistence k těmto přípravkům po vyloučení selekčního tlaku dlouhodobě přetrvává, pokud se přípravky znovu začnou používat, dochází k obnovení úrovně

rezistence. Rezistentní jedinci mají totiž vysokou fitness (konkurenceschopnost) a úspěšně přežívají v populaci strupovitosti. Nejlépe tyto přípravky nepoužívat nebo velmi omezeně v souladu s antirezistenční strategií.

K základním principům antirezistentní strategie patří následující zásady:

- 1) **důsledně střídat přípravky z jiných chemických skupin v rámci postřikového sledu.** Pro snazší orientaci pěstitele při volbě přípravku byla každá účinná látka dle místa působení v buňce patogena zařazena do skupiny, skupinám je přiřazeno číslo (tzv. FRAC kód). V příloze v tabulce č. 8 je uvedený seznam účinných látek a jejich FRAC kódy. Tyto kódy pomáhají vybírat do postřikového sledu přípravky tak, aby se střídaly skupiny účinných látek s odlišným mechanismem účinku.
- 2) u přípravků s rizikem vzniku rezistence **upřednostnit před sólo aplikacemi aplikace v kombinaci** s vhodnými partnery s jiných chemických skupin (v případě strobilurinů aplikovat výhradně v kombinacích)
- 3) přednostně využívat **preventivní aplikace před kurativními**
- 4) účinné látky ze stejné chemické skupiny ohrožené rizikem rezistence použít během sezóny maximálně 4x, ať už samostatně v sólo aplikaci nebo v kombinaci (doporučení VŠÚO Holovousy – v případě strobilurinů maximálně 2x, v případě SDHI fungicidů je rovněž vhodnější počet aplikací za sezónu omezit)
- 5) **dodržovat ha dávky**
- 6) látky ze stejné chemické skupiny ohrožené rizikem rezistence aplikovat v bloku max. 2x (doporučení VŠÚO Holovousy - raději se blokovým aplikacím vyhnout úplně, zejména v případě strobilurinů a SDHI fungicidů)
- 7) jako partnera **do kombinací vybírat raději kontaktní přípravky**, než partnera z chemické skupiny, u které je rovněž vysoké riziko vzniku rezistence.

Tabulka č. 3: Přehled účinných látek fungicidů a jejich zařazení dle FRAC kódu

FRAC kód (číslo skupiny)	Účinná látka	Příklad komerčního přípravku	Poznámka
7	fluopyram fluxapyroxad isopyrazam penthiopyrad boscalid	Luna Experience, Luna Care Sercadis Emrelia Fontelis Bellis	Riziko rezistence vysoké (ev. střední až vysoké)

11	pyraclostrobin kresoxim-methyl trifloxystrobin	Bellis, Tercel Discus Zato 50 WG, Flint, Flint Plus,	Vysoké riziko rezistence Křížová rezistence mezi všemi strobilurinovými látkami
9	cyprodinil	Chorus 50 WG, Vedette	Střední riziko rezistence (ev. nízké až střední)
	pyrimethanil	Mythos 30 SC, Pyrus 400 SC, Scala, Faban, Batalion 450 SC, Gladius 450 SC, Pomax	
12	fludioxonil	Geoxe 250 WG, Pomax	Riziko rezistence nízké až střední
3	difenoconazole	Score 250 EC, Difcor 250 EC, Vigofun 250 EC, Difenzone, Rekin 250 EC, Mavita 250 EC, Novadifen, Atos, Embrelia, Minos Forte,	Riziko rezistence střední
	myclobutanil	Talent	
	penconazole	Topas 100 EC, Topenco 100 EC	
	tebuconazole	Luna Experience,	
	tetraconazole	Alcedo, Domark 10 EC	
P07 (dříve 33)	Fosetyl-Al	Aliette 80 WG, Luna Care	Nízké riziko rezistence

U 06	cyflufenamid	Cyflamid	Střední riziko rezistence (nalezeno u <i>Sphaeroteca</i>)
U 12	dodine	Syllit 400 SC	Nízké až střední riziko rezistence
M 01	Měď a soli	Kuprikol.....Airone SC, Badge WG, Cobran, Coprantol Duo, Defender, Funguran Progress, Funguran PRO, Champion 50 WG, Kocide 2000, Flowbrix...	Nejsou ohroženy rezistencí
M 02	Síra	Kumulus,WG, Sulfolac 80 WG, Síra BL, Sulfurus, Thiovit Jet...	Nejsou ohroženy rezistencí
M 03	mancozeb	Dithane DG Neotec, Manfil 75 WG, Manzate 75 WG, Mastana SC, Penncozeb 75 DG	Nejsou ohroženy rezistencí
	metiram	Polyram WG	
M 04	captan	Captan 80 WG, Merpan 80 WG, Scab 480 SC, Flint Plus, Ventur 80 WG	Nejsou ohroženy rezistencí
M 09	dithianon	Delan Pro, Delan 700 WDG, Faban, Tercel	Nejsou ohroženy rezistencí
BM 02 (dříve 44)	Bacillus subtilis	Serenade	Rezistence není známá

Poznámka: Červeně označené přípravky nejsou registrované pro použití proti strupovitosti jabloně v České republice. Platnost použití a registrace přípravků pro sezónu 2021 je třeba před jejich aplikací zkontrolovat, současně je třeba ověřit i platnou indikaci.

