

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA AGROBIOLOGIE, POTRAVINOVÝCH A PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ

MAZLAVÁ SNĚŽ PŠENIČNÁ (*Tilletia caries*)

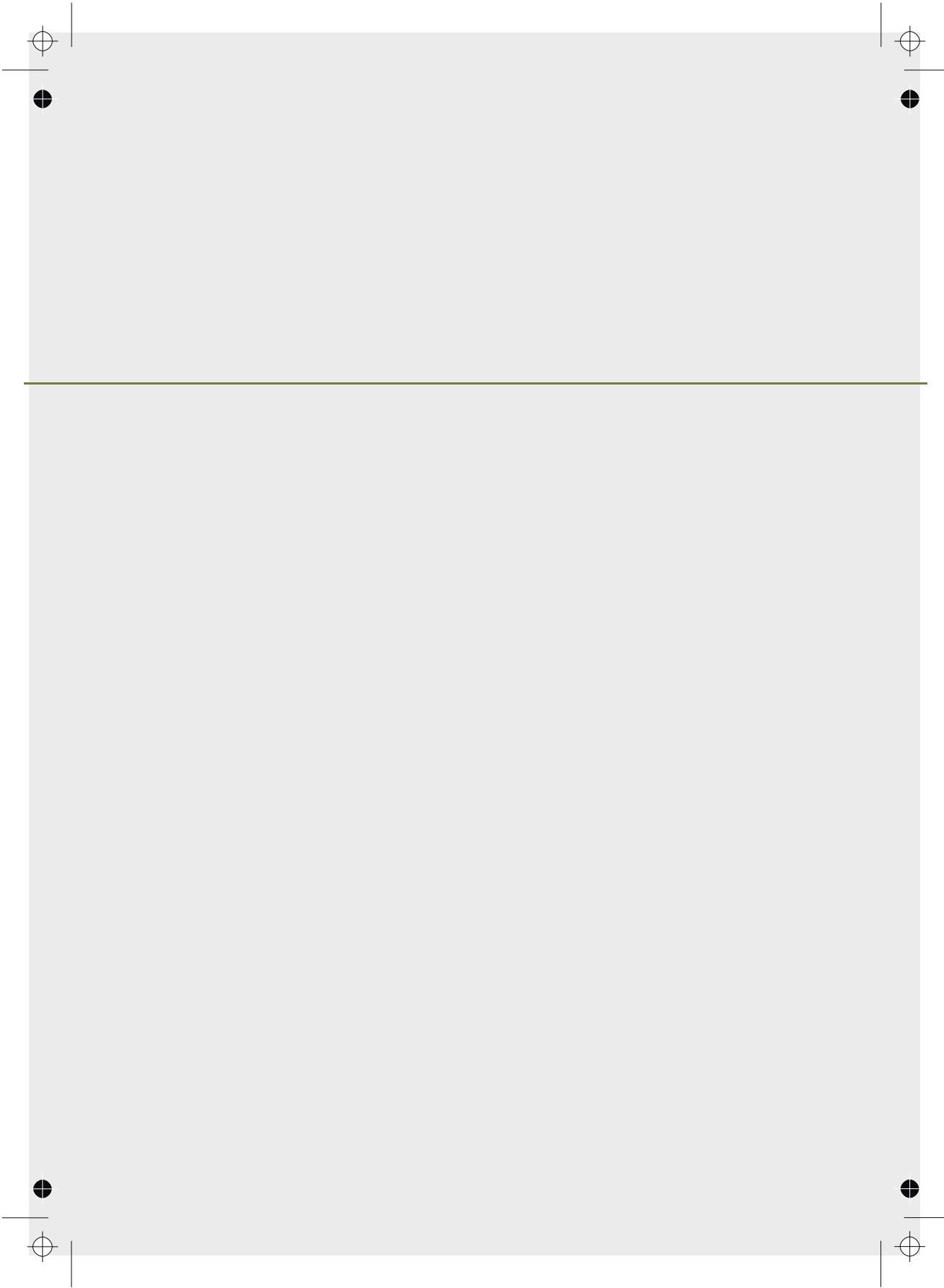
A ZAKRSLÁ SNĚŽ PŠENIČNÁ (*Tilletia controversa*)

V ČESKÉ REPUBLICE

2011

Evženie Prokinová a kolektiv





Česká zemědělská univerzita v Praze

**Mazlavá sněť pšeničná (*Tilletia caries*) a zakrslá sněť pšeničná (*Tilletia controversa*)
v České republice**

Evžen Prokinová a kol.

2011

Autoři:

Evženie Prokinová¹

Miloslav Zouhar¹

Jana Mazáková¹

Marie Váňová²

Lenka Štočková³

¹Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

²Agrotest fyto, s. r. o.

³Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.

Fotografie:

Doc. Ing. Evženie Prokinová, CSc.

Návrh obálky:

Anna Prokinová, Lukáš Rais

Recenze:

RNDr. Ivana Polišenská, PhD.

Ing. Prokop Šmirous, CSc.

Za jazykovou správnost odpovídají autoři.

Publikace vznikla díky finanční podpoře Národní agentury pro zemědělský výzkum jako výstup řešení projektu NAZV QH71105 „*Tilletia* spp. na ozimé pšenici“.

Obsah:

1. SOUHRN	5
SUMMARY.....	6
2. ÚVOD	9
3. POSTAVENÍ HUB RODU <i>TILLETIA</i> V KLASIFIKACI ORGANISMŮ	10
4. PŮVOD A ROZŠÍŘENÍ <i>TILLETIA CARIES</i> A <i>T. CONTROVERSA</i>	11
5. HOSTITELSKÝ OKRUH <i>TILLETIA CARIES</i> A <i>T. CONTROVERSA</i>	12
6. PŘÍZNAKY NAPADENÍ <i>TILLETIA</i> SPP. NA PŠENICE.....	13
7. DETEKCE PATOGENA	18
7. 1. DETEKCE NA ZRNU	18
7. 2. DETEKCE V ROSTLINĚ.....	18
7. 3. DETEKCE V PŮDĚ	19
8. DETERMINACE DRUHŮ	24
9. VÝZNAM NAPADENÍ POROSTU <i>TILLETIA</i> SPP.	30
10. VÝZNAM SOUČASNÉHO NAPADENÍ KLASŮ <i>TILLETIA CARIES</i> A <i>FUSARIUM</i> SPP.....	31
11. VÝSKYT <i>TILLETIA CARIES</i> A <i>TILLETIA CONTROVERSA</i> V ČESKÉ REPUBLICE	38
12. PŘÍČINY ROZŠÍŘENÍ <i>TILLETIA CONTROVERSA</i> A <i>TILLETIA CARIES</i> A RIZIKO DALŠÍCH VÝSKYTŮ ..	45
12. 1. OSIVO JAKO ZDROJ INFEKCE	45
12. 2. PŮDA JAKO ZDROJ INFEKCE	46
13. ÚČINNOST DOPORUČOVANÝCH OCHRANNÝCH OPATŘENÍ.....	47
13. 1. VÝZNAM ODRŮDY	47
13. 2. CITLIVOST ODRŮD K <i>TILLETIA CARIES</i>	49
13. 3. CITLIVOST ODRŮD K <i>TILLETIA CONTROVERSA</i>	51
13. 4. VÝVOJ METOD HODNOCENÍ ODOLNOSTI ODRŮD K <i>TILLETIA</i> SPP.....	57

13. 5. CERTIFIKOVANÉ OSIVO	58
13. 6. OŠETŘENÍ OSIVA	59
13.6.1. NECHEMICKÉ OŠETŘENÍ OSIVA	61
13. 7. OSEVNÍ SLED	63
 <u>14. NAVRHOVANÁ OPATŘENÍ.....</u>	<u>63</u>
 <u>15. NEVYŘEŠENÉ OTÁZKY TÝKAJÍCÍ SE <i>TILLETIA</i> SPP. JAKO PŮVODCE VÝZNAMNÉ CHOROBY</u>	
<u>PŠENICE.....</u>	<u>65</u>
 <u>SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY</u>	<u>68</u>

1. Souhrn

V publikaci, která je určena široké odborné veřejnosti, pracovníkům odpovědných institucí i studentům zemědělských škol, jsme se snažili přístupnou formou sdělit souhrn dosavadních informací a poznatků získaných při řešení projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum č. QH 71105 „*Tilletia* spp. na ozimé pšenici”.

Snětivost pšenice vyvolávaná druhy rodu *Tilletia* patří stále mezi významné, téměř celosvětově rozšířené choroby a naším cílem bylo mimo jiné shromáždit údaje o aktuálním stavu výskytu onemocnění v České republice. Jsou uvedeny výsledky monitoringu od roku 2001, ze kterých vyplývá, že výskyt onemocnění se rozšířil do všech oblastí pěstování pšenice v ČR.

Podle našich zjištění může být rizikem pro vznik primárního zamoření pozemků i množství spor *Tilletia* spp. na osivu, povolené vyhláškou 369/2009Sb., ve znění 289/2010 Sb., 168/2011 Sb., která povoluje kontaminaci ve výši až 10 spor na jedno zrn.

V souvislosti se snahou získat možnost přehledu o zamoření pozemků jsme úspěšně ověřili popsanou metodu detekce spor *Tilletia* spp. v půdě a ověřili, že pokud postačí pouze zjištění přítomnosti spor bez jejich kvantifikace, je možné metodu zkrátit a snížit tak její časovou náročnost. Ze všech zatím dostupných informací o původcích a patogenezi snětivosti vyplývá, že nejefektivnější metodou ochrany pšenice proti *Tilletia* spp. je odolnost odrůdy. V této souvislosti jsme se snažili najít korelaci mezi množstvím mycelia patogena ve vzrostných vrcholech mladých rostlin pšenice a výslednou četností napadených klasů v době zralosti. Za tímto účelem byla vyvinuta metoda Real-Time Polymerase Chain Reaction. Předpokládali jsme, že pokud by uvedená souvislost existovala, bylo by možné ji účinně využít pro zkrácení procesu hodnocení odolnosti odrůd. Souvislost zatím nebyla potvrzena, výsledky jsou značně variabilní. Ukazují na nutnost podrobnějšího výzkumu procesu průběhu infekce.

Velmi častým jevem je napadení rostlin příležitostnými patogeny, které preferují oslabené rostliny. K takovým patogenům patří i houby rodu *Fusarium*. Protože druhy rodu *Fusarium*, které napadají obilniny, mohou produkovat toxiny nebezpečné konzumentům, je jim celosvětově věnována značná pozornost. Jedním z našich cílů bylo posoudit, do jaké míry může napadení obligátním patogenem *Tilletia* spp. ovlivnit míru napadení klasů pšenice houbami rodu *Fusarium* a následnou míru kontaminace fuzáriovými toxiny. Hypotéza o

možnosti významu primárního napadení pšenice obligátním biotrofním patogenem *T. caries* jako biotického stresoru, který disponuje rostlinu k napadení fakultativními patogeny *Fusarium* spp. se nepotvrdila, nebyla prokázána přímá vazba mezi napadením *T. caries* a napadením *Fusarium* spp. Nebyla zjištěna žádná prokazatelná vazba mezi napadením *T. caries* a obsahem deoxynivalenolu. Průměrné čtyřleté výsledky ale ukazují, že napadení původci sněti může pravděpodobně ovlivnit produkci zearalenonu a T-2 toxinu. Čím větší množství klasů bylo napadeno snětivostí, tím vyšší byl zjištěn obsah zearalenonu.

V rámci řešení projektu jsme se také snažili vyvinout spolehlivou, na subjektivním hodnocení nezávislou metodu determinace druhů *T. caries* a *T. controversa*. Dosud použité metody neposkytly dostatečně věrohodné výsledky, což je v souladu s dosud publikovanými výsledky jiných autorů.

Závěrem konstatujeme, že ochranná opatření musí být jednoznačně zaměřena na prevenci, především na míru kontaminace osiva a jeho ošetření a především na zařazení odolných odrůd do pěstitelské praxe.

Summary

The purpose of this publication, which is intended for the broad specialized community, employees of responsible institutions and students of schools of agriculture, is to present in a comprehensible form the summary of current information and knowledge gained in the course of the project No. QH71105 “*Tilletia* spp. on winter wheat” of the National Agency for Agricultural Research.

Today, the smuttness of wheat induced by *Tilletia* species still remains one of very significant diseases spread worldwide. Besides others, it was our aim to gather data on the present occurrence of this disease in the Czech Republic. The publication presents monitoring results from 2001; these results indicate that the occurrence of this disease has spread in all wheat growing areas in the Czech Republic.

Based on our findings, a risk of primary contamination of lands may be posed even by the amount of spores of *Tilletia* spp. in the seed stock as permitted by Decree No. 369/2009 Coll., as amended by 289/2010 Coll., 168/2011 Coll., which permits contamination values up to 10 spores per grain.

In connection with our effort to obtain a clear view of contamination of lands, we have successfully verified the described method of *Tilletia* spp. spores detection in soil, confirming that in cases where the determination of spores is sufficient without their exact quantification, the method can be optimized and its time demands can be thus reduced. All the information available at present on the causing agents and pathogenesis of smuttiness indicates that resistance of the variety is the most efficient method of wheat protection against *Tilletia* spp. In this respect, we tried to correlate the amount of the pathogen's mycelia in grown up tops of young wheat plants, and the resulting frequency of invasion of spikes at the time of their ripeness, for various wheat varieties. The method called Real Time Polymerase Chain Reaction was developed for this purpose. We assumed that if the connection mentioned above existed, it could be used efficiently for reducing the evaluation process of resistance of the varieties. No connection has been confirmed yet, and the results show considerable variability, thus indicating the need of more detailed research of the infection process.

Invasion of wheat plants by occasional pathogens that prefer weakened plants is a very frequent phenomenon. Such pathogens also include *Fusarium* fungi. Considerable attention has been paid to these fungi worldwide given that *Fusarium* species that invade grains may produce toxins hazardous for consumers. One of our aims was to assess to what extent the invasion by the obligatory pathogen *Tilletia* spp. may affect the rate of invasion of wheat spikes by *Fusarium* fungi and their subsequent contamination level by *Fusarium* toxins. The hypothesis of any potential meaning of primary invasion of wheat by the obligatory biotrophic pathogen *T. caries* as a biotic stressor that predisposes the plant for invasion by facultative pathogens *Fusarium* spp. was not confirmed, and no direct link between *T. caries* invasion and *Fusarium* spp. invasion was demonstrated, either. No demonstrable link was found between invasion by *T. caries* and deoxynivalenol content. However, 4-year results indicate that invasion by smut may influence the production of zearalenon and T-2 toxin. The more spikes were invaded by smuttiness, the higher was the determined zearalenon content.

As part of the project, we also tried to develop a reliable method to determine *T. caries* and *T. controversa* species that would be independent of subjective evaluation. The methods used until present have not provided sufficiently credible results, which is in accordance with the results of other authors published until now.

In conclusion, it should be noted that protective measures must be clearly focused on prevention, particularly on the seed stock contamination level and its treatment, and especially on incorporation of resistant varieties in the practice of growing.

2. Úvod

Pšenice je jednou z hlavních světových plodin, díky obsahu proteinů, uhlovodanů, vitaminů, minerálů patří k základním složkám lidské výživy a tvoří také základní složku krmiv hospodářských zvířat. Představuje přibližně 27 % celosvětové produkce obilnin. V České republice se zastoupení pšenice pohybuje mezi 50 – 54 % zastoupení ve struktuře osevních ploch, pěstuje se přibližně na 780 tis. hektarech. Napadení porostu jakýmkoli patogenem snižuje výnos a má vliv i na kvalitu sklizeného zrna. Význam napadení pšenice snětivostí závisí na četnosti napadených klasů. Při ojedinělém výskytu napadených klasů nehrozí spotřebitelům žádné nebezpečí, obvykle není onemocnění v porostu ani zpozorováno. Takové ojedinělé výskyty jsou ale možným primárním zdrojem zamoření pozemku. Větší množství napadených klasů znamená především zhoršení kvality sklizně a výrazně horší podmínky pro uplatnění sklizně na trhu. Jen výjimečně dochází v případě snětivosti k napadení tak velkého množství klasů, že dojde i k citelnému snížení výnosu. S takovou mírou napadení se v našich podmínkách setkáváme spíše u soukromých pěstitelů, kteří hospodaří na malých plochách a používají vlastní, neošetřené osivo a převážně v letech, ve kterých je průběh počasí vhodný pro vznik infekce a rozvoj choroby.

Přes veškerou pozornost věnovanou snětem rodu *Tilletia* jako patogenům pšenice (ječmene, tritikale) výzkumnými pracovišti v mnoha státech světa, přes velkou sumu dosud nashromážděných poznatků o jejich vlastnostech, biologii, rozšíření, hostitelském okruhu a o vztahu k hostitelským rostlinám se dosud nepodařilo řadu otázek uspokojivě zodpovědět. To je také hlavní důvod toho, že ačkoli je onemocnění známo už od samých začátků pěstování pšenice, přes 2 000 let, neumíme porosty proti houbám rodu *Tilletia* naprosto spolehlivě ochránit. Velmi účinnou ochranu představuje kvalitní moření osiva, ale především v případě zakrslé sněti pšeničné ani toto opatření nemusí být zcela spolehlivé. Navíc pro systémy ekologického hospodaření není ošetření osiva fungicidní látkou přípustné. Česká republika není v těchto ohledech výjimkou.

V našich podmínkách napadají pšenici převážně dva druhy rodu *Tilletia*, *T. controversa* - původce zakrslé sněti pšeničné a *T. caries* – původce mazlavé sněti pšeničné. Méně časté jsou v současné době výskyty *T. laevis* - původce hladké sněti pšeničné. Snětivost pšenice představuje i u nás vážný problém.

Díky finanční podpoře NAZV jsme měli možnost se problematice snětivosti pšenice věnovat. Pokusili jsme se prohloubit naše znalosti a přispět k tomu, abychom v budoucnu dokázali zavést do praxe skutečně účinnou ochranu proti tomuto onemocnění. V publikaci uvádíme výsledky, které jsme od roku 2007 získali.

3. Postavení hub rodu *Tilletia* v klasifikaci organismů

Sněti rodu *Tilletia* jsou taxonomicky řazeny do říše hub (Fungi, Basidiomycota, Ustilaginomycotina, Exobasidiomycetes, Exobasidiomycetidae, Tilletiales, Tilletiaceae). Jde o velmi zajímavou skupinu stopkovýtrusých hub, které jsou obligátními parazity rostlin (nejsou schopny růst, vyvíjet se a rozmnožovat se mimo hostitelskou rostlinu). Houby rodu *Tilletia* na rozdíl od převážné většiny stopkovýtrusých hub nevytvářejí plodnice. Řád Tilletiales zahrnuje šest rodů (*Conidiosporomyces*, *Erratomyces*, *Ingoldiomyces*, *Neovossia*, *Oberwinkleria* a *Tilletia*). Všichni zástupci řádu Tilletiales parazitují na hostitelích čeledi Poaceae s výjimkou *Erratomyces* spp., jehož druhy napadají bobovité rostliny (Castlebury *et al.*, 2005). V oblasti taxonomického zařazení, charakteristik a příbuznosti jednotlivých druhů rodu *Tilletia* existují dosud nevyjasněné otázky. V databázi (Anonym 1, 2011) je v současné době popsáno 309 druhů rodu *Tilletia*, které napadají různé hostitelské rostliny, ale Castlebury *et al.* (2005) uvádějí, že existuje asi 150 druhů náležejících do řádu Tilletiales.

Tilletia caries (DC.) Tul. & C. Tul. (1847) je aktuálně platné vědecké jméno pro původce mazlavé sněti pšeničné. Ve starších publikacích se lze setkat i se synonymy *Tilletia tritici* (Berk.) Wolf (1874), *Fusisporium inosculans* Berk. (1847), *Lycoperdon tritici* Bjerk. (1775), *Uredo caries* DC. (1815).

Tilletia controversa J.G. Kühn (1874) je ve fytopatologické literatuře známá pouze jako zakrslá sněť pšeničná, ovšem mykologové jí přidělili jméno sněť trpasličí. Jejím synonymem je *Tilletia tritici* var. *controversa* (J.G. Kühn) Kawchuk (1988), které je v současné době akceptováno jako platné. Ve starších publikacích se objevují i další synonyma [*Tilletia brevifaciens* G.W. Fischer (1952), *Tilletia nanifica* (F.Wagner) Savul. (1956), *Tilletia tritici-nanifica* F. Wagner (1950)].

4. Původ a rozšíření *Tilletia caries* a *T. controversa*

Předpokládá se, že druhy rodu *Tilletia* pocházejí z Blízkého východu, z místa původu pšenice. *T. caries* a *T. laevis* (syn. *T. foetida*) se vyskytují celosvětově, převládají v mírném klimatickém pásmu, hlavně v Evropě, v centrální části USA, výskyty jsou známy i z oblastí Číny, Iráku, Iránu a Indie (Wilcoxon, Saari, 1996). Stoupající význam snětivosti v severní Africe a na Blízkém východě uvádí Mamluk (1998). Fakt, že v dané lokalitě nepravidelně v různých letech převažuje jeden nebo druhý druh, dosud nebyl dostatečně objasněn. Vielwerth (1936) uvedl, že na Slovensku se v severní hornaté části vyskytuje především *T. caries*, zatímco v jižní, nížinné části převládá *T. foetida*. Baudyš (1958) píše, že v oblastech s přímořským klimatem převládá *T. caries*, v oblastech s převážně vnitrozemským klimatem převládá *T. foetida*. Různé preference a rozšíření *T. caries* a *T. foetida* popisují Ismail *et al.* (2002), kteří hodnotili jejich výskyt na pšenici v Sýrii. Uvádají, že *T. foetida* převládala v severní části země a napadala hlavně pšenici setou, zatímco *T. caries* byla častější v jižní části země a preferovala pšenici tvrdou. Oproti tomu Mamluk (1998) konstatuje, že na pšenici seté se vyskytuje *T. laevis* (*T. foetida*), zatímco *T. caries* napadá jak pšenici setou, tak pšenici tvrdou.

T. controversa zatím nebyla zaznamenána v Číně, Brazílii a Mexiku. Pravidelně se vyskytuje v celé Evropě (Wilcoxon, Saari, 1996), v Severní Africe a na Blízkém východě (Mamluk, 1998). Geografické rozšíření zakrslé sněti pšeničné je vázáno na oblasti s dlouhodobě trvající sněhovou pokrývkou (Wilcoxon, Saari, 1996). To je zatím obecně sdílený poznatek. Priekule (2007) informovala o prvním zaznamenaném výskytu *T. controversa* v Litvě. Jako problematické označují onemocnění polští autoři Kubiak, Weber (2008). O nových výskytech mazlavé sněti pšeničné v Maďarsku informuje Halász (2011). Sumarizace zemí, ze kterých jsou známy výskyty zakrslé sněti pšeničné je uvedena v seznamu „CABI Plant Protection Compendium country list: *T. controversa*“ (Commonwealth Agricultural Bureaux International – Kompendium ochrany rostlin, seznam zemí s výskytem *T. controversa*):

Evropa: Albánie, Rakousko, Bulharsko, Chorvatsko, Česká republika, Dánsko, Francie, Německo, Řecko, Maďarsko, Itálie, Litva, Lucembursko, Moldávie, Polsko, Portugalsko, Rumunsko, Ruská federace, Srbsko, Slovensko, Slovinsko, Španělsko, Švédsko, Švýcarsko, Ukrajina

Afrika: Alžír, Libye, Maroko, Tunis

Asie: Afganistán, Arménie, Azerbajdžán, Gruzie, Irán, Irák, Japonsko, Kazachstán, Kyrgyzstán, Sýrie, Tadžikistán, Turecko, Turkmenistán, Uzbekistán

Severní Amerika: Kanada (British Columbia, Ontario), USA (Colorado, Idaho, Montana, New York, Utah, Washington, Wyoming)

Jižní Amerika: Argentina, Uruguay

Podle dostupných literárních zdrojů musíme konstatovat, že v oblasti Evropy se v posledních letech hospodářský význam snětivosti pšenice vyvolané *Tilletia* spp. zvyšuje a Česká republika není v tomto směru výjimkou.

5. Hostitelský okruh *Tilletia caries* a *T. controversa*

Hostitelský okruh obou snětí popsal podrobně Vánky (1994), který uvádí, že v Evropě napadá ***Tilletia caries*** druhy *Secale cereale* (žito seté), *Triticum aestivum* (pšenice setá), *T. compactum* (pšenice shloučená), *T. dicoccum* (pšenice dvouzrnka), *T. durum* (pšenice tvrdá), *T. monococcum*, (pšenice jednozrnka), *T. polonium* (pšenice polská) a *T. turgidum* (pšenice naduřelá). V databázi na stránkách USDA (Anonym 6, 2011) jsou jako hostitelské rostliny pro *T. caries* mimo pšenici uvedeny také rody *Festuca* (kostřava), *Arrhenatherum* (ovsík), *Secale* (žito), *Bromus* (sveřep) a *Agropyron* (žitňák).

Tilletia controversa je uváděna v Evropě na rodech *Agropyrum* (pýr), *Alopecurus* (psárka), *Bromus* (sveřep), *Elymus* (pýrovník), *Hordeum* (ječmen), *Lolium* (jílek) a dále na družích *Secale cereale* (žito seté), *Triticum aestivum* (pšenice setá), *T. dicoccum* (pšenice dvouzrnka), *T. durum* (pšenice tvrdá) a *T. spelta* (pšenice špalda) (Vánky, 1994). Databáze USDA uvádí i nálezy na *Aegilops* (mnohoštět), *Koeleria* (smělek), *Agropyron* (žitňák), *Festuca* (kostřava) a *Arrhenatherum* (ovsík).

V případě pšenice jsou hostitelskými odrůdami *T. caries* (a *T. laevis*) jak pšenice ozimá, tak jarní. *T. controversa* nebyla dosud na jarní pšenici zaznamenána (Fuentes-Dávila *et al.*, 2002). U nás zatím nebylo pozorováno napadení jarní pšenice v přirozených provozních podmínkách mazlavou snětí pšeničnou, podle dostupných informací napadá jen pšenici ozimou. Také nám není známo, že by u nás bylo zaznamenáno napadení ječmene zakrslou

sněti pšeničnou. Informace o výskytu *T. caries* a/nebo *T. controversa* na planých hostitelích na území ČR nejsou k dispozici.

6. Příznaky napadení *Tilletia* spp. na pšenice

Příznaky napadení jsou po větší část vývoje a růstu rostliny skryté. Někteří autoři popisují i projevy mírné inhibice růstu a žloutnutí listů napadených rostlin, ale takové příznaky jsou nespecifické, mohou mít různé příčiny. Zřetelně viditelné jsou symptomy až ve fázi plně vytvořeného klasu, kdy je v klásku místo obilky hálka vyplněná výtrusy houby (Obr. 1, 2). Přetvořená obilka v klasu je dobře rozpoznatelný příznak, při pozorné prohlídce nelze symptomy zaměnit s jiným onemocněním. Jednotlivé klásky jsou od sebe vzdálenější, doprovodným znakem je obvykle širší úhel postavení klásku vzhledem ke klasovému větvení než u zdravých klasů. U některých odrůd mají napadené klasy modrofialový nádech. Obilky jsou kratší, buclatější než zdravá zrna a většinou částečně vyčnívají z plev (Obr. 1). V době zelené zralosti klasů jsou vytvořené hálky měkké, při rozmáčknutí se objevuje mazlavá, černá hmota. U *T. controversa* dochází obvykle navíc k zakrslosti napadeného stébla, případně celé rostliny. Po dozrání klasu a jeho mechanickém rozrušení se uvolňují hálky (Obr. 3), uvnitř kterých je černohnědý „prach“ – výtrusy houby (Obr. 4). Viditelné příznaky napadení klasu se u jednotlivých snětí neliší, navíc v jednom klasu se mohou vyskytovat současně dva, výjimečně i všechny tři zmíněné druhy rodu *Tilletia*. Na jedné rostlině nemusejí být napadeny všechny klasy. V jednom klasu mohou, ale nemusejí být v hálky přetvořeny všechny obilky. U přezrálých porostů může dojít k rozrušení hálky již v klasu, pak se z ní uvolňují tmavé výtrusy viditelné na povrchu klasu. Tento příznak je ale velmi ojedinělý. Přesto jsme se v praxi setkávali dokonce se záměnou snětivosti za napadení klasů černěmi (Obr. 5, 6).

V případě černí se jedná o saprofytické nebo fakultativně (příležitostně) patogenní houby rodů *Alternaria*, *Ulocladium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, které osidlují senescentní (stárnoucí), odumírající (např. při poranění rostliny) a mrtvé rostlinné pletivo. Houby uvedených rodů mají většinou tmavé mycelium a všechny mají černohnědé výtrusy. To je příčinou příznaku, který se jeví jako sazovité povlaky na povrchu klasu. Napadení *Tilletia* spp. se projevuje přetvořením zrna v hálku, tzn. příznak je uvnitř klasu. Samozřejmě je možné, především v letech s deštivým počasím v období žní, že jsou klasy napadeny jak

snětí, tak černěmi. V takovém případě je nápadnějším příznakem čern, snětivost by bylo možné při povrchní prohlídce přehlédnout.

Obr. 1. Zdravý klas pšenice vlevo, klasy pšenice napadené *Tilletia* spp. vpravo.



Obr. 2. Hálky sněti v klasu pšenice.



Obr. 3. Háčky sněti mezi zdravými zrnny pšenice.



Obr. 4. Černohnědé výtrusy (spory) uvolňující se z hálek.



Obr. 5. Příznaky černě na klasu pšenice.



Obr. 6. Porovnání příznaků napadení klasů pšenice.

Zleva: napadení rzí pšeničnou (drobná ložiska zimních, tmavých výtrusů), černě, prašná sněť, mazlavá sněť.



7. Detekce patogena

7. 1. Detekce na zrn

Symptomaticky není možné určit druh původce sněti. Nejobvyklejší, nejlevnější, poměrně rychlé je mikroskopické hodnocení suspenze spor. Suspenze se získá vložím 50 g zrn do 50 ml nejlépe destilované (není podmínka) vody a vzorek se 10 minut protřepává. Získaná suspenze se přelije do kyvet a umístí na 8 – 10 minut do centrifugy při otáčkách 1 800 za minutu. Pro mikroskopické vyšetření se používá získaný sediment. Pro získání věrohodného údaje se připravuje z jednoho průměrného vzorku šest navážek. Z každého opakování je potřeba prohlédnout alespoň 40 preparátů. Touto metodou je možné ověřit přítomnost/nepřítomnost výtrusů sněti ve vzorku. V případě potřeby kvantifikovat množství spor lze použít hodnocení sedimentu v Bürkerově komůrce a následný přepočet. Tuto metodu používáme na našich pracovištích. Pro diagnostické laboratoře, které mají za úkol hodnotit zdravotní stav osiv, je závazná filtrační metoda, která používá opakované protřepávání vzorku zrn v horké vodě, následnou filtraci přes celulózo-nitrátový filtr a mikroskopické vyhodnocení přítomnosti výtrusů na vysušeném filtru (Anonym 4, 2004). Pro detekci minimálního množství spor ve vzorku zrna, kdy je značně snížena pravděpodobnost úspěšnosti výše popsané metody, je možné využít metodu PCR (Polymerase Chain Reaction - polymerázová řetězová reakce), která je velmi citlivá a vysoce spolehlivá. Vzhledem k náročnosti metody na vybavení laboratoře, kvalifikaci pracovníků a také vzhledem k finanční náročnosti není tato metoda v současné době vhodná pro běžné využití v praxi, např. ve výkupních organizacích. V odůvodněných případech by bylo možné ji využít pro testování zdravotního stavu osiva – např. v případě pochybností, arbitrážních sporů apod. V budoucnu ale jistě najde uplatnění při běžném testování zdravotního stavu osiv.

7. 2. Detekce v rostlině

Jak už jsme uvedli, je detekce původce choroby v rostlině symptomaticky možná teprve po plném vytvoření klasu. To vedlo ke snaze ověřit vznik infekce a zjistit přítomnost

patogena v rostlinných pletivech již v raných fázích vývoje rostliny. Takovou metodu popsal např. Swinburne (1963). Princip metody spočívá ve fixaci částí rostliny ve směsi formalínu s propanolem a následné dehydrataci ve směsi etanolu s t-butanolem. Takto připravené části rostlin byly řezány na ultratenké řezy pomocí mikrotomu, řezy byly obarveny bavlníkovou modří a fixovány v kanadském balzámu. Takto připravené preparáty byly vyhodnoceny mikroskopicky. U infikovaných rostlin je možné touto metodou pozorovat mycelium patogena v rostlinných pletivech. Uvedená metoda je ale velmi pracná a její vyhodnocení může být ovlivněno i subjektivně, v závislosti na kvalitě připravených preparátů a na erudici příslušného pracovníka.

Pracnost, časová náročnost a diskutabilní spolehlivost metody vedla výzkumníky ke snaze najít jinou, rychlejší, citlivou a spolehlivou metodu detekce mycelia *Tilletia* spp. v rostlině před tím, než jsou viditelné typické příznaky. K tomuto účelu využili různí autoři novější diagnostické metody. Metodu PCR pro detekci druhů rodu *Tilletia* v pletivu pšenice popsali Josefsen, Christiansen (2002). Eibel *et al.* (2005) pracovali s metodou ELISA (Enzyme-Linked Imunosorbent Assay) a také s metodou PCR. Také na našem pracovišti byla vyvinuta metoda a navrženy primery pro detekci *Tilletia* spp. v pletivech rostlin pšenice (Kochanová *et al.*, 2004).

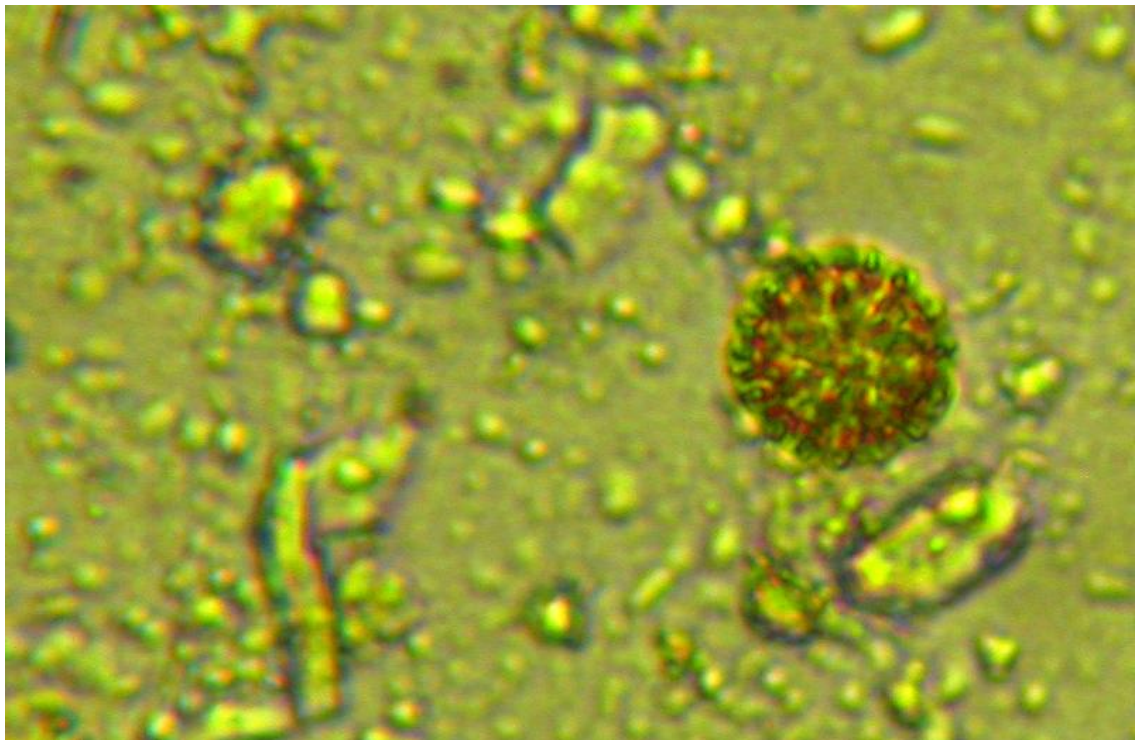
7. 3. Detekce v půdě

Metoda detekce spor patogenů v půdě, která využívá promývání vzorků půdy na sítích a separaci výtrusů v sacharózovém roztoku, je známá poměrně dlouhou dobu (Buczacki, Ockendon, 1978; Daniels, Skipper, 1982). Babadoost, Mathre (1998) vyvinuli metodu detekce a kvantifikace teliospor *Tilletia indica*, *T. controversa* a *T. barclayana* v půdě. Pracovali s různými půdními druhy a nejprve se známým množstvím spor *Tilletia* spp. Metoda používá množství 10 g půdního vzorku, které se vpraví do 200 ml vody s přidáním kapky Tween 20. Suspenze se opakovaně promývá na sítích. Získaná suspenze se filtruje na speciálních filtrech. Sediment z filtrů se smyje do kyvet a umístí do centrifugy. Supernatant se po centrifugaci odlije a uschová (pro opakované zpracování), k peletě se přidá sacharózový roztok a opět se umístí do centrifugy. Poslední tři operace se několikrát opakují. Zjištění přítomnosti spor *Tilletia* spp. se provádí mikroskopickým vyšetřením sedimentu, pro zjištění výtěžnosti spor se používá odpočet v počítací komůrce. Tuto metodu

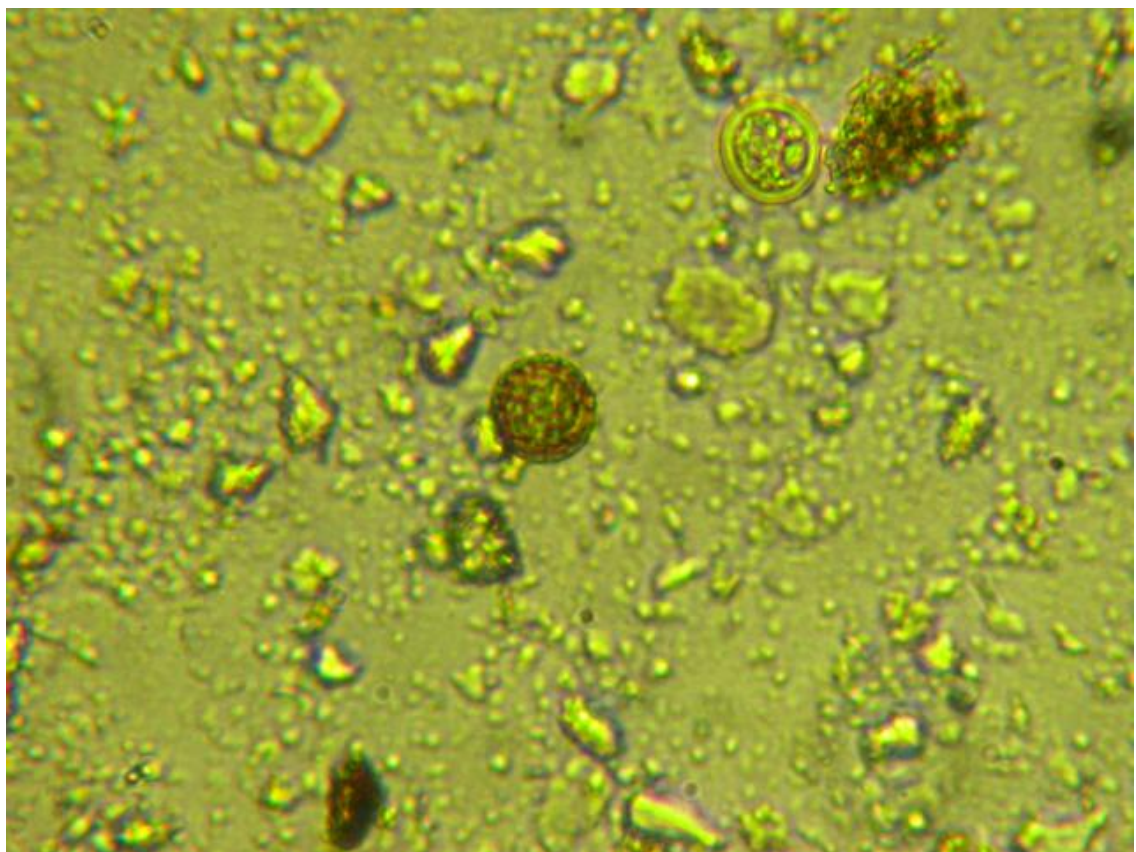
jsme úspěšně použili i v naší laboratoři a v uměle kontaminované zemině jsme spory úspěšně detekovali. Ze vzorku kontaminovaného počtem 10^2 teliospor jsme zpět získali 17 % spor, ze vzorku kontaminovaného 10^5 teliospor pak 69 % spor (Tab. 1). Procento zjištěných spor odpovídá výsledkům uveřejněným autory Babadoost, Mathre (1998), kteří detekovali 19,3 % spor při kontaminaci suspenzí 10^2 spor a 73,8 % spor při kontaminaci zeminy suspenzí 10^5 spor *T. controversa*. Pro určení množství spor, které jsme detekovali v přirozeně zamořených vzorcích zeminy, byly použity vzorky z pozemků s ověřeným výskytem sněti v posledních patnácti letech (Tab. 2). Vzorky byly dodány pracovištěm Agrotest fyto, s. r. o. (region Vsetínska) a Státní rostlinolékařskou správou (region Vsetínska a Příbramsko) a zpracovány popsanou metodou. Mikroskopické hodnocení bylo provedeno prověřením 1 ml získaného sedimentu. Determinace *Tilletia* spp. byla provedena na základě mikroskopických morfologických znaků. Takto bylo zpracováno čtrnáct vzorků, každý ve třech opakováních. Počet spor byl zjišťován také zkrácenou metodou (vynechání opakování dvou filtrací a následné centrifugace). Potvrdilo se, že i zkrácená metoda (úspora času 8 – 10 hodin) je dostatečná pro prokázání přítomnosti teliospor *Tilletia* spp. v daném vzorku zeminy. Vyšší pravděpodobnost úspěšnosti je samozřejmě při úplném dodržení popsání postupu.

Při používání metody je nutné počítat s velmi dobrou kvalifikací hodnotitele a samozřejmě s dostatečně kvalitním mikroskopem, aby vzhledem k řadě nečistot v půdní suspenzi nedošlo k přehlédnutí spory nebo záměně za jiný útvar (obr. 7, 8, 9). Při nedostatečné pozornosti a přesnosti pozorování je možná i záměna za výtrus jiného druhu rodu *Tilletia*, případně za *Epicoccum purpurascens* či cysty prvoků (a to i přes značnou rozdílnost ve velikosti objektů). Nevýhodou metody je kromě rizika subjektivní chyby i její poměrná časová náročnost. Při přesném dodržení postupu trvá zpracování jednoho vzorku tři až čtyři dny. Při zpracování více vzorků současně je nutné mít k dispozici i přiměřený dostatečně chráněný prostor, ve kterém je možné nechat vysychat sedimenty na filtrech. Proto se domníváme, že především z kapacitních důvodů nebude možné popsání postup využívat pro hodnocení zamoření pozemků plošně. Podle našeho názoru není ani nezbytně nutné plošnou kontrolu zamořenosti pozemků provádět. Metoda je ale bezesporu vhodná pro ověření zamoření pozemků určených např. pro množitelské porosty a pozemků v systému ekologického hospodaření, případně i pro ověření zamořenosti jiných pozemků na základě žádosti pěstitele.

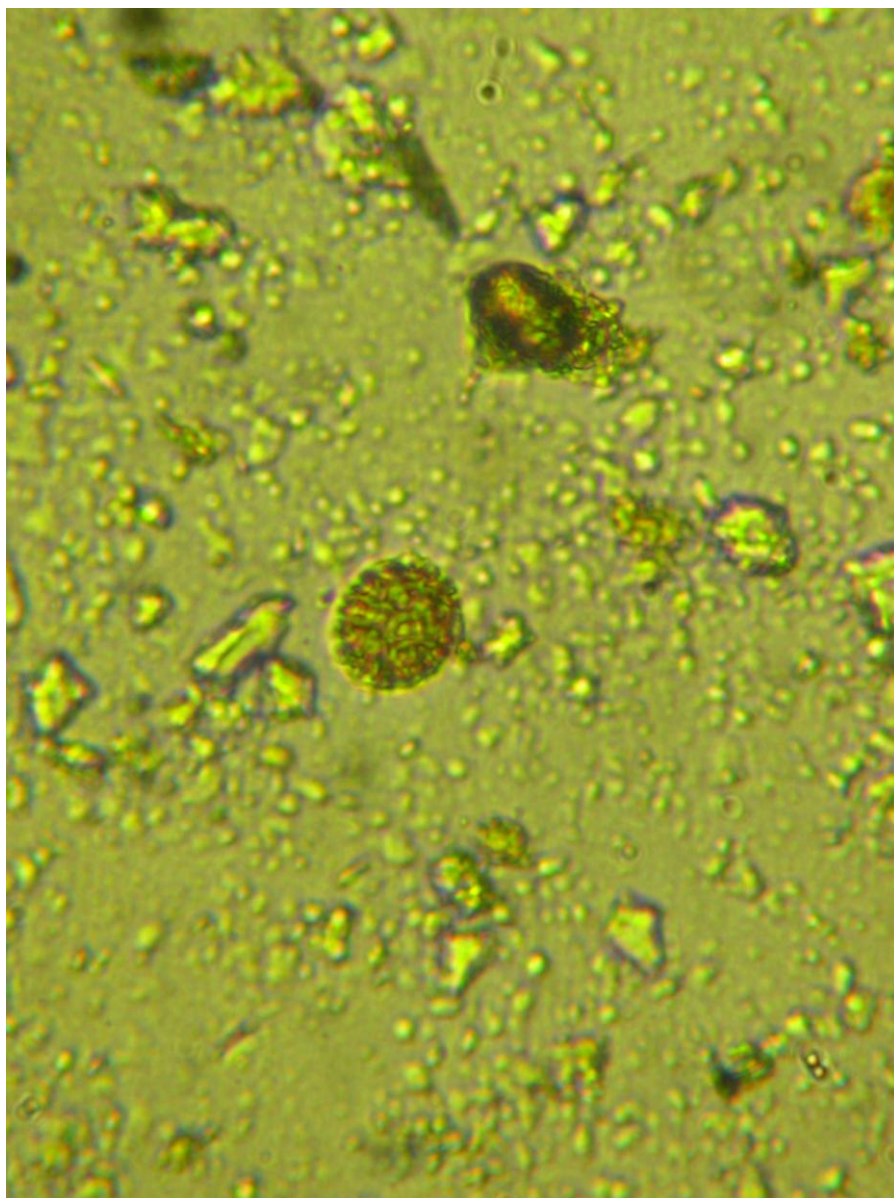
Obr. 7. Spora *T. controversa* v půdní suspenzi.



Obr. 8. Spora *T. caries* v půdní suspenzi.



Obr. 9. Spora *Tilletia* spp. a půdní nečistoty.



Tab. 1. Detekce *T. controversa* v uměle kontaminované zemině.

množství vpravených spor	0	10^2	10^5
procento zjištěných spor	0	17 %	69 %

Tab. 2. Detekce *Tilletia* spp. v přirozeně kontaminované zemině.

vzorek č.	počet teliospor <i>Tilletia</i> spp. zjištěných v 1 ml sedimentu	zjištěný druh
1	2	<i>T. controversa</i>
2	2	<i>T. controversa</i>
3	1	<i>Tilletia</i> sp.
4	0	-
5	2	<i>Tilletia</i> sp.
6	11	<i>T. controversa</i>
7	2	<i>T. controversa</i>
8	3	<i>T. controversa</i>
9	2	<i>Tilletia</i> sp.
10	2	<i>Tilletia</i> sp.
11	3	<i>T. controversa</i>
12	0	-
13	1	<i>Tilletia</i> sp.
14	0	-

Dhingra, Sinclair (1995) popsali metodu tzv. vitálního barvení, pomocí které lze rozlišit živé výtrusy hub od mrtvých. Barvení akridinovou oranží s následným vyhodnocením pomocí fluorescenčního mikroskopu popsali jako metodu vhodnou ke zjištění životnosti spor *Tilletia indica* v půdě Thinggaard, Leth (2003). V naší laboratoři jsme tuto metodu zkoušeli použít pro ověření životnosti spor *T. caries*. Metoda je funkční, ale velmi pracná a časově náročná. Podle našeho názoru není vhodná pro běžné rutinní hodnocení životnosti výtrusů. Mnohem lépe se nám osvědčila metoda kultivace spor na živné půdě (vodní agar, případně Czapek – Dox medium). Náročnější na jemnost a pečlivost je jen manipulace s nalezenými výtrusy při jejich přemísťování na živnou půdu. Je také nutné přesně dodržet podmínky vhodné pro inkubaci spor jednotlivých druhů *Tilletia* spp. (Vliv podmínek a živné půdy na klíčení spor *Tilletia* spp. je podrobněji zmíněn v následující kapitole „Determinace druhů“.) V případě *T. controversa* je doba počátku klíčení výtrusů tři až pět týdnů. Případná detekce patogena v půdě a posouzení životnosti výtrusů by tak muselo být prováděno s dostatečným předstihem před výsevem ozimé pšenice. Domníváme se ale, že vzhledem k časové náročnosti metody není vhodné uvažovat o jejím širokém využití. Doporučujeme ji, stejně jako vlastní metodu detekce *Tilletia* spp. v půdě, k použití ve specifických případech – nejistota přítomnosti patogena na pozemcích množitelských porostů, na pozemcích v režimu ekologického hospodaření.

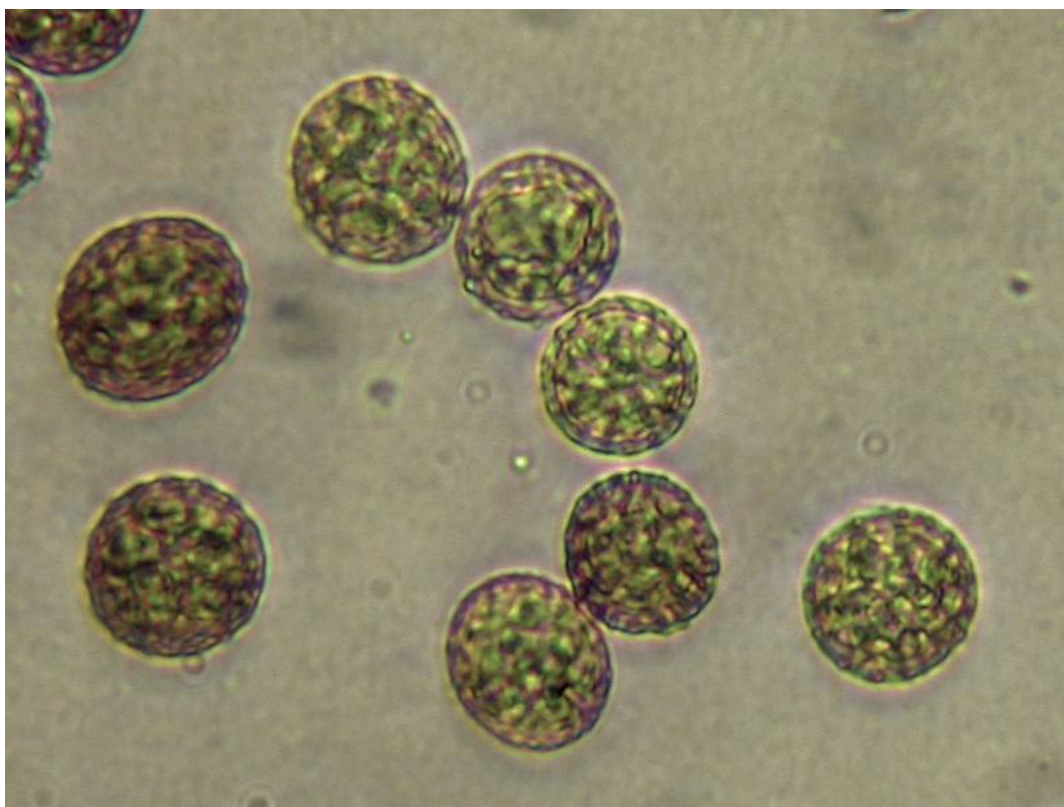
8. Determinace druhů

Pro rozlišení jednotlivých druhů rodu *Tilletia* slouží nejčastěji mikroskopické morfologické znaky spor (teliospor). *T. laevis* má hladké, světle až tmavě olivově hnědé, 14 – 22 μm velké výtrusy. *T. caries* má „sítovité“ výtrusy, 14 – 23,5 μm velké, jejichž hloubka lišt tvořících „sít“ je 0,5 – 1,5 μm . *T. controversa* má výtrusy velké 19 – 24 μm , s hloubkou lišt 1,5 – 3 μm (Vánky 1994) (Obr. 10 - 14). U spor *T. controversa* je v optickém mikroskopu často patrný hyalinní obal.

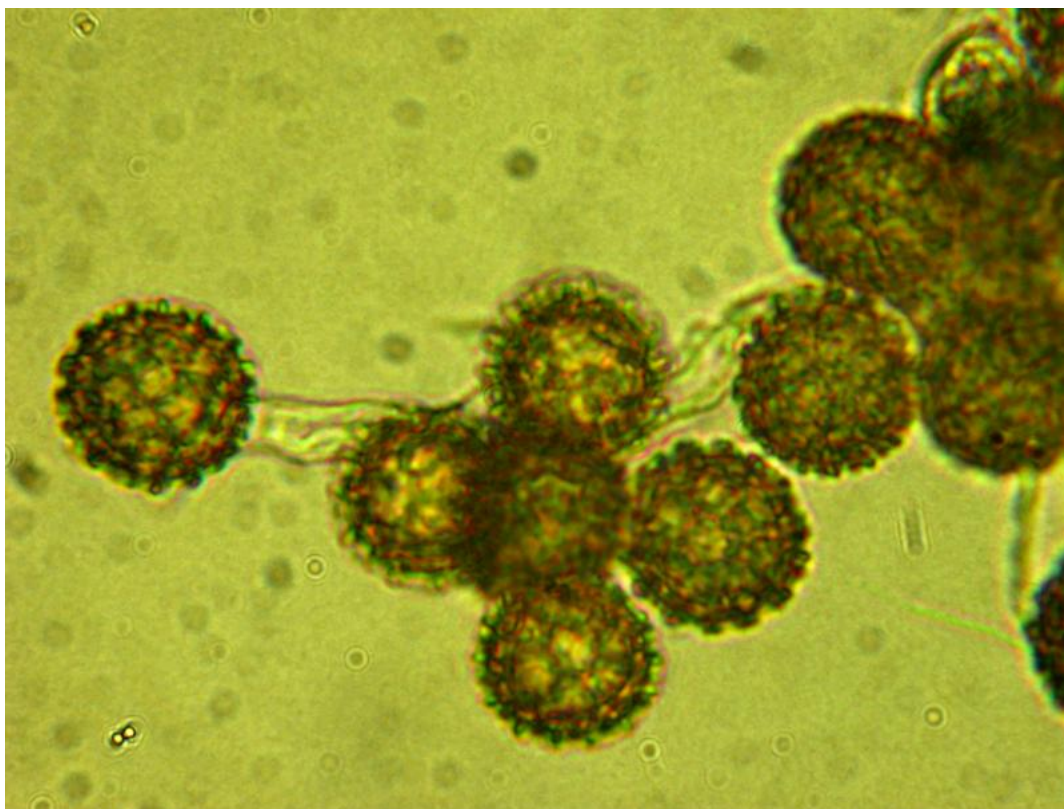
Obr. 10. Spory *Tilletia caries*.



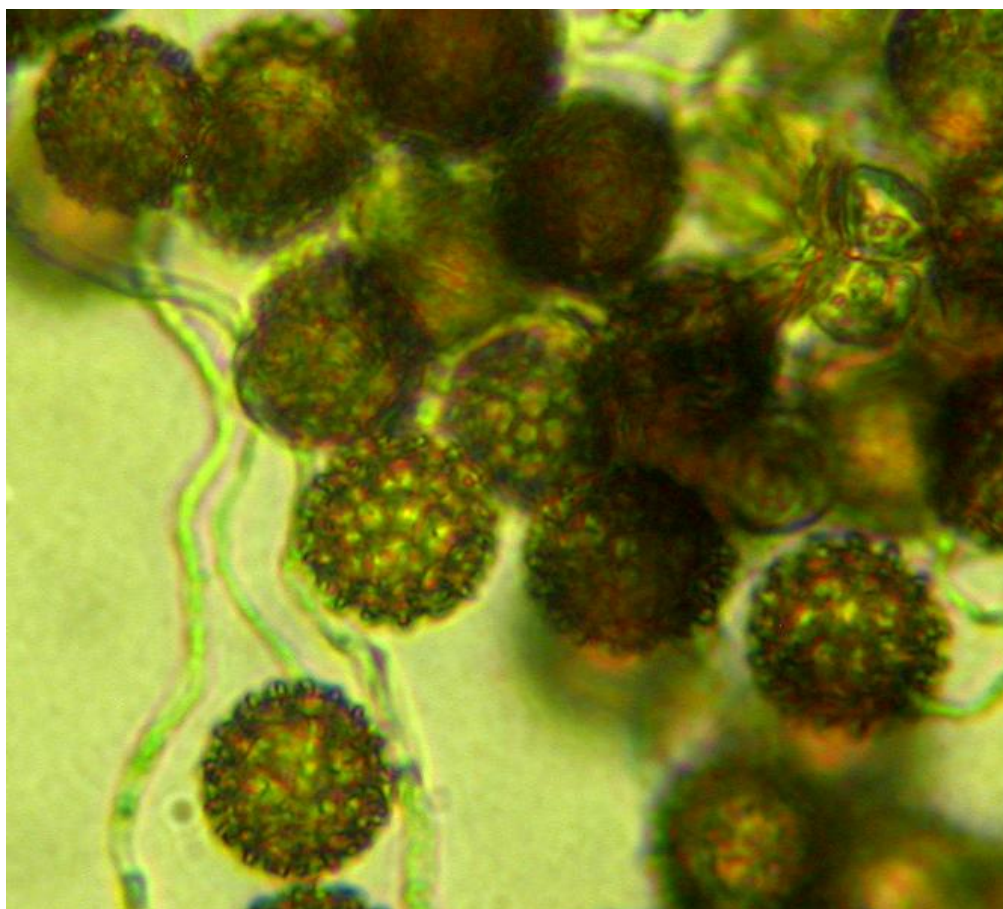
Obr. 11. Spory *Tilletia caries*.



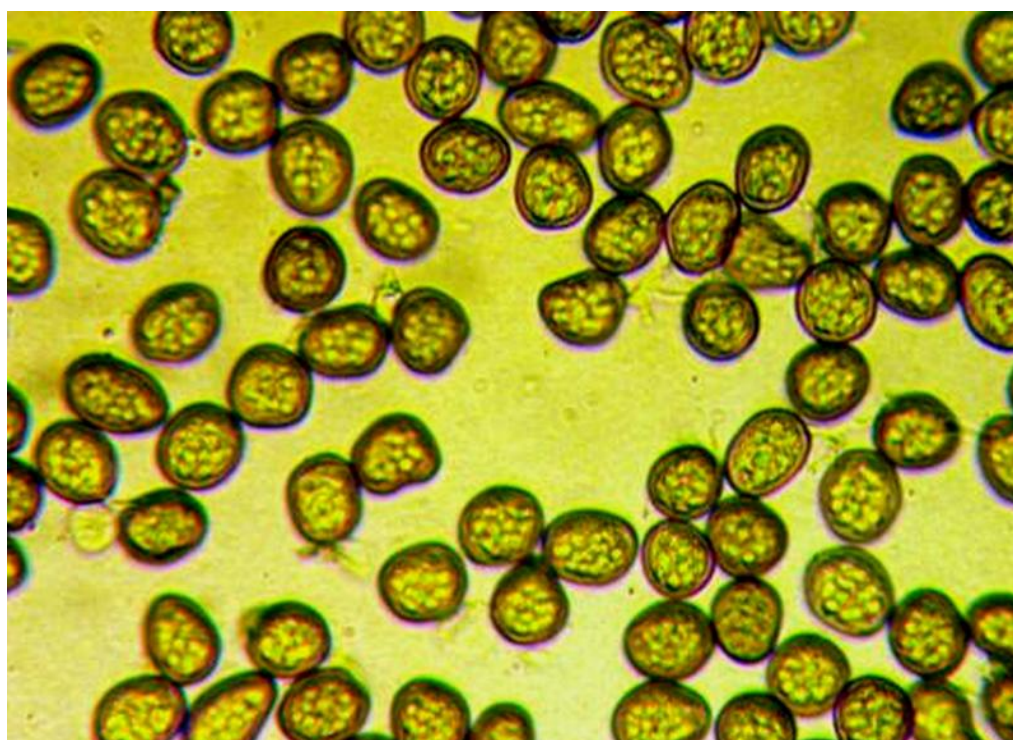
Obr. 12. Spory *Tilletia controversa*.



Obr. 13. Spory *Tilletia controversa*.



Obr. 14. Spory *Tilletia foetida*.



Pro mikroskopické hodnocení se používá sediment získaný metodou popsanou v části „detekce na znu“, resp. „detekce v půdě“. Nutno ale přiznat, že mikroskopické hodnocení je, jak už jsme se zmínili, do značné míry závislé na kvalitě používaného mikroskopu a především na kvalifikaci pozorovatele. Vzhledem k tomu, že výtrusy jsou variabilní, ne všechny jsou plně vyvinuté, nemusejí být popsány znaky zcela zřetelné. Navíc bylo prokázáno, že druhy rodu *Tilletia* jsou schopny se i křížit (Baudyš, 1958; Carris, Gray, 1994), a vzniklé výtrusy pak také nemají charakteristické znaky jednoho z uvedených druhů. Trail, Mills (1990) popsali pokus, ve kterém na základě umělé inokulace jarní pšenice přírodními a geneticky značenými izoláty *T. caries* a *T. controversa* a následným vyhodnocením napadení klasů prokázali možnost křížení mezi oběma druhy. Možnost křížení druhů rodu *Tilletia* v přirozených podmínkách připouští na základě svého výzkumu i Shi *et al.* (1996). V pokusech s využitím umělé infekce prokázali schopnost křížení *T. controversa* s *T. laevis* a s *T. bromi* také Pimentel *et al.* (2000). Pak je velmi obtížné určit pomocí světelného mikroskopu druhovou příslušnost spor i pro zkušeného pozorovatele. Ve světle novějších poznatků je obecně rozlišování do druhu pouze podle mikroskopických morfologických znaků diskutabilní, v oblasti taxonomického třídění jsou v případě *Tilletia* spp. značné rozpory a nejasnosti. Castlebury *et al.* (2005) navrhuje na základě fylogenetických studií příbuznosti mezi druhy zavedení pouze jednoho rodu řádu Tilletiales a to rodu *Tilletia*. Ve své práci dokládají, že morfologické znaky dosud používané pro determinaci druhů nejsou pro zařazení do druhu dostatečným kritériem.

Další možností rozlišení spor *T. caries* a *T. controversa* je pozorování degradace buněčné stěny při umístění výtrusů do imersního oleje (Goates, 1996). Spory *T. controversa* svůj tvar nemění, zatímco spory *T. caries* se deformují. Obdobně působí i bezvodý propylalkohol (Trione, Krygier, 1977).

Relativně jednoduché, ale časově náročné a současně nejednoznačné je určení druhu podle doby, za kterou začnou spory sněti klíčit na živné půdě. Pro klíčení se většinou používá vodní agar, je ale možné použít i jiné živné médium. V naší laboratoři se poměrně dobře osvědčil bramboro-dextrózový agar.

Tilletia caries klíčí již po několika dnech i při vyšší teplotě (15 – 18 °C). Ale např. Baudyš a kol. (1958) udávají, že spory klíčí až za 20 – 30 dnů při optimální teplotě 15 – 18 °C. Rovněž však uvádějí, že houba může klíčit již při teplotě 2 – 3 °C a maximální teplota pro klíčení je v rozmezí 27 – 29 °C. Všichni autoři se shodují na tom, že mazlavá sněť pšeničná klíčí bez ohledu na osvětlení. Rozpory v době nutné pro vyklíčení výtrusů *T. caries* mohou

souviset s pravděpodobnou dormancí výtrusů, ale také s různými podmínkami prováděných pokusů i s různými vlastnostmi jednotlivých izolátů. Trione (1977) konstatuje, že pouhý vodní film na povrchu živné půdy účinně zabrání klíčení, zatímco spory na suchém povrchu kultivačního média klíčí bez problémů. Uvádí také, že na 2% agaru klíčí výtrusy mazlavé a zakrslé sněti bez problémů, ale pokud živné médium obsahuje jen 1 % nebo méně agaru, dochází k inhibici klíčení. Autor také zjistil, že ve vodě rozpustné látky obsažené ve sporách mají inhibiční vliv na jejich vlastní klíčení.

Dobu klíčení *Tilletia controversa* většina autorů udává v délce 30 – 40 dní. Fuentes-Dávila *et al.* (2002) uvádějí, že spory *T. controversa* klíčí až po 3 – 6 týdnech při teplotě 5 °C a s nutností světelného režimu. Popisovaná doba potřebná k vyklíčení výtrusů *T. controversa* na kultivačním médiu je podle dostupných údajů nejméně tři týdny. Podle naší zkušenosti byla doba potřebná pro vyklíčení výtrusů zakrslé sněti pšeničné minimálně čtyři týdny při teplotě 5 °C a při světelném režimu 12 hodin tma, 12 hodin světlo.

Jak už jsme se zmínili, ani tato metoda není zcela spolehlivá. Klíčivost může ovlivnit i složení kultivačního média. Wilcoxon, Saari (1996) doporučují 2% živný agar, nám se osvědčil 2% vodní agar. Boyd, Carris (1998) ověřili, že přidání aktivního uhlíku (carbon agar) významně zlepšilo klíčivost *T. bromi*, *T. controversa* a *T. fusca* a také zkrátilo dobu nutnou pro vyklíčení výtrusů ve srovnání s kultivací na vodním agaru. Obdobně působil i další adsorbent - BSA (bovine serum albumin - hovězí sérový albumin).

Další metody, které byly vyvinuty různými autory a je možné je použít (fluorescenční a elektronová mikroskopie) jsme blíže popsali již dříve (Kochanová, Prokinová, 2004). Nepovažujeme je však za vhodné pro běžné praktické použití vzhledem k náročnosti na čas, na vybavení laboratoře a na kvalifikaci personálu.

Protože žádná z výše uvedených metod není pro rozlišení druhů zcela spolehlivá, zabývá se řada výzkumníků hledáním jiné, spolehlivé metody, nezávislé na subjektivním posouzení viditelných znaků. Kawchuk *et al.* (1988) porovnávali polypeptidy spor *T. laevis*, *T. tritici* (syn. *T. caries*) a *T. controversa*. Uvádají, že nenalezli žádnou korelaci mezi některým polypeptidem a morfologickými či fyziologickými znaky spor. Nezjistili ani žádnou korelaci s virulencí izolátu. Z výsledků vyvodili závěr, že mezi danými třemi druhy rodu *Tilletia* je mnohem užší genetická příbuznost než odpovídá současnému taxonomickému zařazení a navrhli dokonce zavést pouze jeden rod s třemi varietami (*T. tritici* var. *tritici*, *T. tritici* var. *laevis* a *T. tritici* var. *controversa*). Rozdíly v rychlosti klíčení, schopnost autofluorescence a genetické znaky pro rozlišení druhů *T. caries*, *T. controversa* a

T. foetida ověřovali na souboru monosporových izolátů Russell, Mills (1994) kteří dospěli k závěru, že žádný z hodnocených znaků není dostatečně průkazný. Konstatovali, že i karyotypy různých kmenů populace patogenů jsou shodné pro izoláty jak mazlavé a hladké, tak zakrslé sněti pšeničné. To v podstatě odpovídá názoru Castlebury *et al.* (2005). Jiné výsledky získali Banowetz, Doss (1994), kteří extrahovali ze souboru izolátů *T. caries* a *T. controversa* proteiny, které analyzovali. Označili polypeptid (116 kD), který izolovali ze všech izolátů *T. controversa* a z žádného izolátu *T. caries*. Domnívají se, že tento polypeptid může být biochemickým markerem pro diferenciaci druhů *T. caries* a *T. controversa*. Metodu označovanou jako RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) použili pro studium DNA izolátů *T. caries*, *T. controversa* a *T. foetida* Gang, Weber (1995). Předpokládají, že popsaná metoda umožní studium druhů a ras rodu *Tilletia* a dalších mikroskopických hub s výtrusy s podobnou stavbou. Stejnou metodou porovnávali izoláty *Tilletia controversa*, *T. tritici* (syn. *T. caries*), *T. laevis*, a *T. fusca* var. *bromi-tectorum* Shi *et al.* (1996), kteří na základě statistického vyhodnocení svých výsledků dospěli k závěru, že existuje významný rozdíl mezi zakrslou snětí a skupinou druhů vyvolávajících „obecnou“ (common bunt) snětivost (*T. tritici*, *T. laevis*, a *T. fusca* var. *bromi-tectorum*). Přesto ani tito autoři nenalezli rozdílné znaky mezi *T. controversa* a ostatními testovanými izoláty, které by platily zcela bez výjimek.

Vývojem molekulárních markerů pro determinaci vybraných druhů rodu *Tilletia* se zabývá i naše pracoviště ČZU (kolegové Zouhar a Mazáková). Pro determinaci druhů *T. caries* a *T. controversa* na úrovni nukleových kyselin byly hledány vhodné polymorfní úseky DNA, které by bylo možné využít v praktické diagnostice. V první řadě byla provedena analýza známých sekvencí DNA obou patogenů *in silico*. V databázi NCBI (National Center for Biotechnology Information) bylo nalezeno a následně porovnáno 27 sekvencí *T. caries* a 36 sekvencí *T. controversa*. Výsledky analýzy *in silico* potvrdily položenou vědeckou hypotézu nedostatečné polymorfie známých úseků DNA, zejména rDNA, pro spolehlivou determinaci obou druhů. Bylo tedy přistoupeno k hledání vhodných úseků a to na úrovni SCAR (Sequence Characterized Amplified Region). Za tímto účelem byly získány izoláty mycelia obou druhů (*T. caries* CBS 370.36 a *T. controversa* CBS 121952, rovněž i *T. laevis* CBS 324.32) ze sbírky mikroorganismů Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, Holandsko), aby byla zajištěna pravost analyzovaného mikroorganismu. Izoláty obou patogenů byly namnoženy na živných médiích (PDA – potato dextrose agar, YMA – yeast malt extract agar, MEA – malt extract agar) a z mycelia byla izolována DNA pomocí fenol-

chloroformové izolace s využitím extrakčního pufru CTAB (cetyltrimethylammonium bromide - $((C_{16}H_{33})N(CH_3)_3Br)$). DNA byla kvantifikována pomocí spektrofotometru NanoDrop a naředěna na koncentraci 100 ng/μl. Amplifikovatelnost získané DNA byla ověřena pomocí konvenční PCR a univerzálních primerů FUN 28A a B. Pro hledání vhodných molekulárních markerů bylo použito tří sad náhodných primerů OPA 1-20, OPG 1-20 a OPH 1-20. Pro amplifikaci bylo použito procesivního enzymu s nízkou chybovostí (LA polymeráza - Top Bio, s.r.o., Česká republika). Složení reakční směsi bylo následující: 2,5 μl pufru, 3,0 μl $MgCl_2$, 0,3 μl dNTP (12,5 pmol každého), 1 μl primeru (1 μM), 0,5 μl polymerázy (2,5 U) a 1 μl DNA. Amplifikační reakce probíhaly v termocykléru PTC 200 Biorad dle následujícího programu: 94 °C 2 min, 5 x 94 °C 30 s, 90 s RAMP (0,7 °C/1 s), 35 °C 30 s, 72 °C 30 s, dále pak 35 cyklů 94 °C 30 s, RAMP (0,5 °C/1 s), 55 °C 30 s, 72 °C 30 s a závěrečné polymerace 72 °C 10 min. Každý primer byl nezávisle na sobě testován ve třech různých PCR reakcích připravených v různé dny. Produkty reakce byly separovány pomocí 2% agarózové horizontální elektroforézy značené ethidium bromidem. Pro vizualizaci bylo použito spektrofotometru s vlnovou délkou 340 nm pro omezení mutačního faktoru. Nalezené polymorfní úseky byly vybrány, vyříznuty a DNA izolována pomocí GenGel DNA Extraction Kit (Fermentas - Thermo Fisher Scientific). Z celkového počtu 92 polymorfních bandů bylo vybráno 67 polymorfních úseků (36 úseků charakteristických pro *T. controversa* a 31 pro *T. caries*). Postupováno bylo tak, že ze tří reakcí byly vybrány tři identické (opakované) konkrétní fragmenty DNA a tyto fragmenty byly ligovány a sekvenovány. Na základě získané sekvence byly navrženy vždy tři sady primerů pro konvenční PCR za účelem specifické determinace konkrétního druhu. K optimalizaci konvenční PCR byl použit gradient Alpha PTC 200 (BIO-RAD spol. s r.o., ČR). Byly testovány paralelně annealingová teplota a obsah hořčíku v reakci. Celkem bylo navrženo 51 sad primerů. Ani v jednom z případů však nebylo dosaženo spolehlivé determinace obou patogenů. Je tedy nutné prověřit další fragmenty.

9. Význam napadení porostu *Tilletia* spp.

Houba produkuje páchnoucí látku trimethylamin, takže napadená sklizeň je nepoužitelná pro potravinářské účely a jen omezeně použitelná pro krmné účely. Choroba může způsobit i ztráty až ve výši 50 % výnosu, pokud je přítomen dostatečně silný zdroj infekce a současně nastane odpovídající průběh počasí (Goates, 1996). Veisz *et al.* (2000)

prokázali, že rostliny infikované *T. caries* jsou náchylnější k poškození mrazem než rostliny zdravé.

Spory rodu *Tilletia* patří mezi vzdušné alergenů (Grammer, Greenberger, 2009). Sullivan, Krieger (2001) uvádějí ve své práci, že výtrusy *Tilletia* spp. mohou u pracovníků manipulujících s napadeným obilím vyvolat rýmu a astma. V tomto směru je podle našeho názoru největší riziko při sklizni, kdy se z rozrušených hálek uvolňují do ovzduší miliony výtrusů. Alergickou reakci na spory sněti při zpracovávání silně napadených vzorků z našich pokusů můžeme potvrdit i na základě osobní zkušenosti našich pracovníků (rýma, slzení, otoky očních víček, kašel).

Sněti napadené obilniny mají horší, omezené nutriční zhodnocení v krmných dávkách. Výskyt sněti napadeného obilí v rozsahu do 0,5 % lze ještě zařadit do krmných směsí, tedy i vykupovat. Takto ve větší míře znehodnocené obilniny nejsou vhodné pro březí plemence a pro mladé kategorie skotu (Doležal a kol., 2010).

U nás stále přetrvává povědomí o tom, že zakrslá sněť pšeničná patří mezi tzv. karanténní organismy, na které se vztahují zvláštní předpisy. V roce 2011 v Evropské unii již *T. controversa* není uvedena ani na jednom seznamu karanténních organismů (Anonym, 2, 2011). Nadále ale zůstává mezi karanténními organismy např. na Novém Zélandu (Anonym 3, 2011), v Číně (Anonym 1, 2011). To může být problematické i pro naše pěstitele při prodeji sklizně do SZIF (Státní zemědělský intervenční fond), protože část jím vykoupeného obilí je určena na vývoz a není předem jasné, do které destinace se prodej uskuteční. Proto SZIF obvykle trvá na tom, aby přítomnost spor *T. controversa* ve vykupované partii byla nulová.

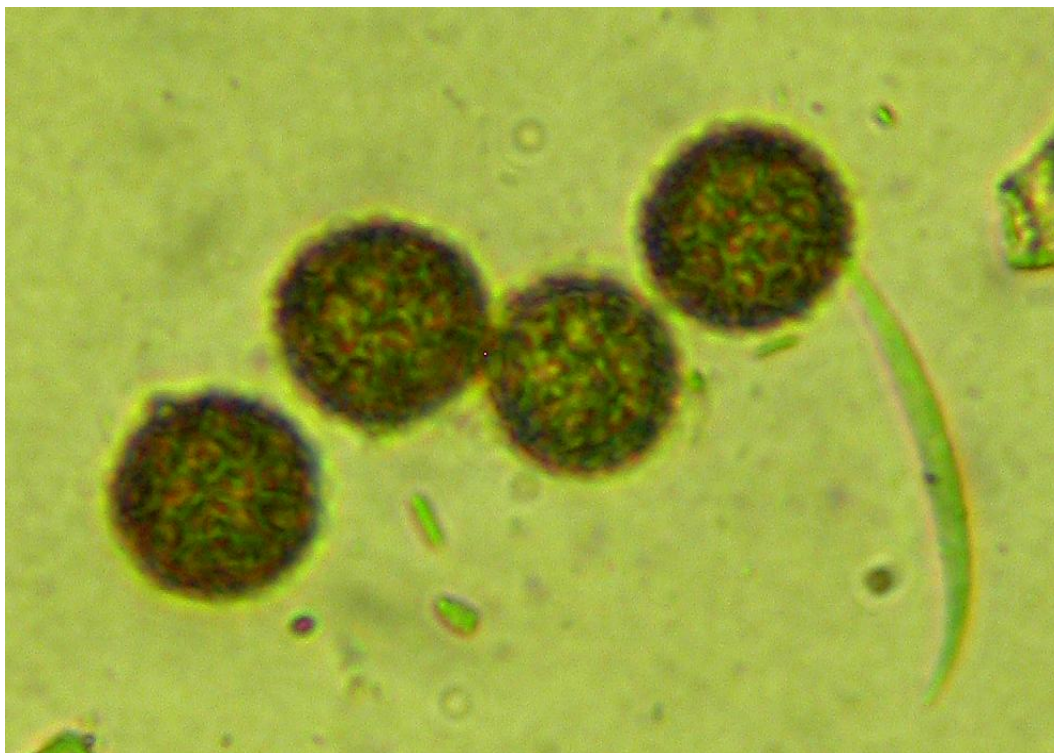
10. Význam současného napadení klasů *Tilletia caries* a *Fusarium* spp.

Při řešení problematiky snětivosti ozimé pšenice a fuzarióz klasů jsme se na našich pracovištích (ČZU a Agrotest fyto, s.r.o.) setkávali s výskytem spor *Fusarium* spp. na povrchu i uvnitř hálek *Tilletia* spp. (obr. 15, 16). Obdobně je častá hojná kolonizace hálek sněti kukuřičné (*Ustilago maydis*) houbami rodu *Fusarium* (obr. 17).

Obr. 15. Oranžová sporodochia *Fusarium* spp. na hálce sněti.



Obr. 16. Společný výskyt výtrusů *Tilletia* spp. a *Fusarium* spp.



Obr. 17. Oranžové povlaky *Fusarium* spp. na hálkách sněti kukuřičné.



Orientační porovnání obsahu fuzáriových toxinů v palicích kukuřice napadených *Ustilago maydis* a palic bez sněti ukázalo v našich výsledcích výrazně zvýšený obsah mykotoxinů ve snětivých palicích (Tab. 3).

Tab. 3. Obsah DON ve snětivých a zdravých palicích kukuřice.

popis	DON (mg/kg)
zdravé palice vzorek 1	<LOQ
napadené palice vzorek 1	2,1
zdravé palice vzorek 2	<LOQ
napadené palice vzorek 2	2,6

Pozn.: < LOQ = pod hranicí detekovatelnosti

LOQ pro DON: 0,2 mg/kg

Fuzarióza klasů patří k celosvětově rozšířeným, často se vyskytujícím chorobám pšenice, resp. obilnin. Napadení touto chorobou vede ke ztrátám kvantitativním i kvalitativním. Toxiny produkované houbami rodu *Fusarium*, původci klasové fuzariózy, kontaminují v různé míře zrna obilnin (Štočková *et al.*, 2008). Tato kontaminace je nežádoucí jak v potravinářské tak v krmné pšenici (Čonková *et al.*, 2003; Creppy, 2002).

Napadení zrn houbami rodu *Fusarium* také výrazně zhoršuje kvalitu osiva (Hershman, 2009). Řada států včetně ČR proto v současné době uplatňuje ve výkupu potravinářské pšenice jako jedno z kritérií obsah deoxynivalenolu (DON) považovaného za marker fuzariových toxinů. Silněji kontaminované partie zrna pak nejsou prodejné vzhledem k výkupu podle stanoveného limitu obsahu zástupce fuzariových toxinů – deoxynivalenolu (DON) – 1250 µg/kg. Cílem pěstitelů je proto dosáhnout minimálního napadení klasů houbami rodu *Fusarium*.

Je známo, že *Fusarium* spp. patří mezi fakultativní patogeny, které obvykle častěji napadají stresované rostliny. Podmínkami vzniku a šíření infekce a faktory, které proces ovlivňují, se zabývá řada prací. Prakticky všechny dostupné práce se zabývají mírou vlivu abiotických činitelů, především významu teploty a vlhkosti (Brennan *et al.*, 2005; Saharan *et al.*, 2004; Polišínská, Salava, 2009). Popsán je i význam předplodiny (Schaafsma *et al.*, 2005) a efekt různých fungicidních látek (Menniti *et al.*, 2003). Některé práce zmiňují i význam primárního napadení škůdci pro vznik infekce klasů houbami rodu *Fusarium* (Bagga, 2004). Vysoký je i počet prací zabývajících se výzkumem rezistence pšenice k patogenům rodu *Fusarium* napadající klasy (Šíp *et al.*, 2010).

Méně pozornosti je již věnováno interakcím mezi mikromycety – původci klasových chorob. Význam zastoupení a vztahů jednotlivých druhů – původců klasové fuzariózy – z hlediska produkce mykotoxinů studovali Xu *et al.* (2007). Informace o případném vztahu sněti rodu *Tilletia* k jiným houbám jsou velmi ojedinělé (např. Willingale, Mantle, 1987).

Společný výskyt fuzarióz a snětivosti vedl k vyslovení hypotézy o možnosti významu primárního napadení pšenice obligátním biotrofním patogenem *T. caries* jako biotického stresoru, který disponuje rostlinu k napadení fakultativními patogeny *Fusarium* spp. Cílem práce tak bylo potvrdit nebo vyvrátit souvislost mezi napadením ozimé pšenice *T. caries* a množstvím fuzariových toxinů ve sklizeném zrně.

V letech 2007 – 2011 byly v Kroměříži (Agrotest fyto, s.r.o.) prováděny maloparcelkové pokusy. Do pokusů bylo zařazeno v jednotlivých letech 26 až 40 odrůd. Ne všechny odrůdy byly do pokusů zařazeny ve všech letech, především kvůli rychlé obměně odrůd na trhu. Přednostně jsme se snažili zařazovat odrůdy nejvíce pěstované a perspektivní pro uplatnění v našich podmínkách. Osivo bylo uměle inokulováno výtrusy *T. caries* v dávce 2 g spor na 1 kg osiva. Inokulum pocházelo z vlastních zdrojů Agrotest fyto, s. r. o. Protože první dva roky ukázaly, že není možné spoléhat pouze na přirozenou infekci houbami rodu *Fusarium*, byla v letech 2009 – 2011 provedena umělá inokulace suspenzí spor *F. culmorum*

a *F. graminearum* v poměru 1: 1 ve fázi počátek kvetení. Hustota inokula byla 10^6 spor v 1 ml suspenze. Izoláty pocházely ze sbírky hub Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Praze – Ruzyni. Každá varianta měla čtyři opakování. Napadení *T. caries* bylo hodnoceno těsně před sklizní symptomaticky, výsledek je udáván v procentech napadení klasů. Vyhodnocení míry napadení klasů fuzariózou bylo prováděno podle následujícího schématu: Většina pšenic pěstovaných v našich agroekologických podmínkách má průměrně 19-20 klásků na klas. Z toho je odvozeno, že jeden napadený klásek představuje 5% napadení, dva klásky 10%, tři klásky 15% napadení. Následující třídy představují snadnější hodnocení proporcí mezi 1/3, 1/2 a 2/3 napadeného klasu. Poslední tři třídy charakterizují stav infekce, kdy zbývá zdravých 3, 2-1 a žádný klásek. Schéma je uvedeno v tab. 4.

Tab. 4. schéma procentického hodnocení napadení klasů fuzariózou

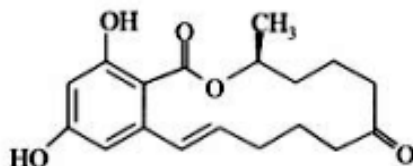
počet napadených klásků	procento napadení
0 klásků	0
1 klásek	5
2 klásky	10
3 klásky	15
1/3 klasu	33
1/2 klasu	50
2/3 klasu	66
3 zdravé klásky	85
2-1 zdravé klásky	90
0 zdravých klásků	100

Stanovení obsahu mykotoxinů zajistilo pracoviště VÚRV. Byl zjišťován obsah tří základních toxinů produkovaných druhu rodu *Fusarium* – zearalenon (ZEA, struktura Obr. 18), deoxynivalenol (DON, struktura Obr. 18) a T-2 toxin (struktura Obr. 18). Každý vzorek byl rozemlet v laboratorním mlýnku. Pro stanovení obsahu deoxynivalenolu byl používán The Ridascreen Fast DON Immunochemical Kit, pro stanovení obsahu zearalenonu Ridascreen Fast Zearalenon a pro T-2 toxin Ridascreen Fast T-2 toxin (R-Biopharm, Německo). Stanovení obsahu mykotoxinů bylo provedeno podle protokolu daného výrobcem komerčních kitů. Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno spektrofotometricky na základě kalibrace pomocí standardů, výtěžnost metody pro DON a ZEA byla vypočtena pomocí certifikovaného referenčního materiálu, pro T-2 toxin pomocí matrice spikované čistým

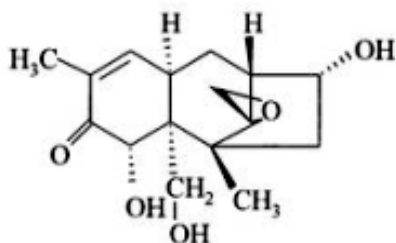
standardem (referenční materiál není k dispozici). LOQ hodnoty (hranice detekovatelnosti) pro jednotlivé toxiny: 0,2 mg.kg⁻¹ pro DON a 50 µg.kg⁻¹ pro ZEA a T-2 toxin.

Hypotéza o možnosti významu primárního napadení pšenice obligátním biotrofním patogenem *T. caries* jako biotického stresoru, který disponuje rostlinu k napadení fakultativními patogeny *Fusarium* spp. se nepotvrdila, nebyla prokázána přímá vazba mezi napadením *T. caries* a napadením *Fusarium* spp. Z výsledků byla patrná přímá vazba mezi četností napadení *Fusarium* spp. a obsahem DON, což potvrzuje dosud publikované výsledky (Chrpová *et al.*, 2009). Četnosti *Fusarium* spp. odpovídal i vyšší obsah ZEA. Tato vazba ale neplatila pro T-2 toxin, dosažené výsledky nepotvrdily v tomto případě předpoklad čím vyšší napadení, tím vyšší obsah toxinu. Nebyla zjištěna žádná prokazatelná vazba mezi napadením *T. caries* a obsahem DON. Průměrné víceleté výsledky ale ukazují, že napadení snětí může pravděpodobně ovlivnit produkci ZEA a T-2 toxinu. Čím větší množství klasů bylo napadeno snětivostí, tím vyšší byl zjištěn obsah zearalenonu - Graf 1 (Prokinová a kol., 2010). Obdobné výsledky byly získány i v roce 2011 (Graf 2).

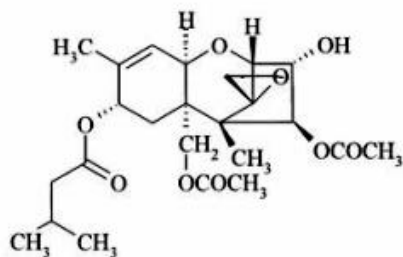
Obr. 18. Zearalenon.



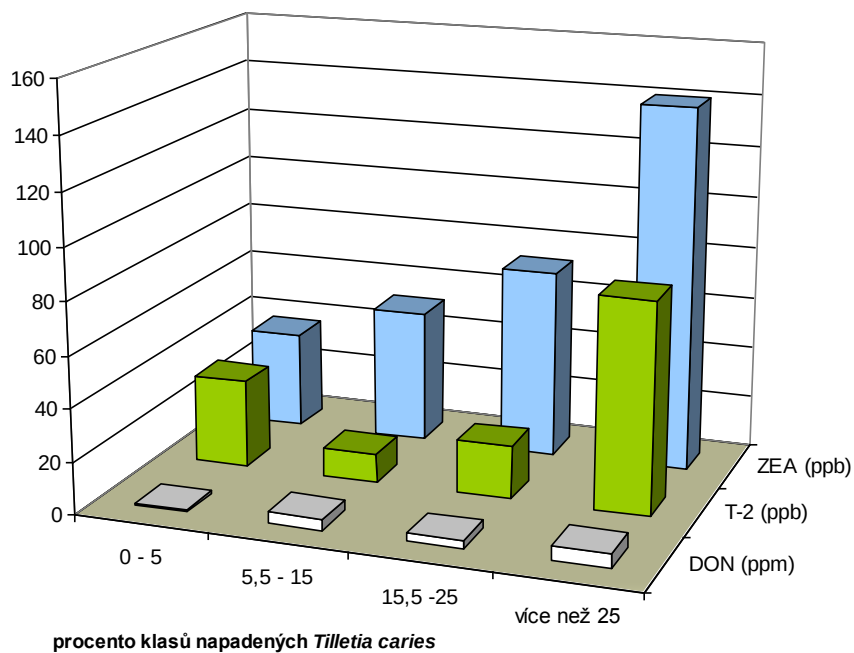
Deoxynivalenol.



T-2 toxin.



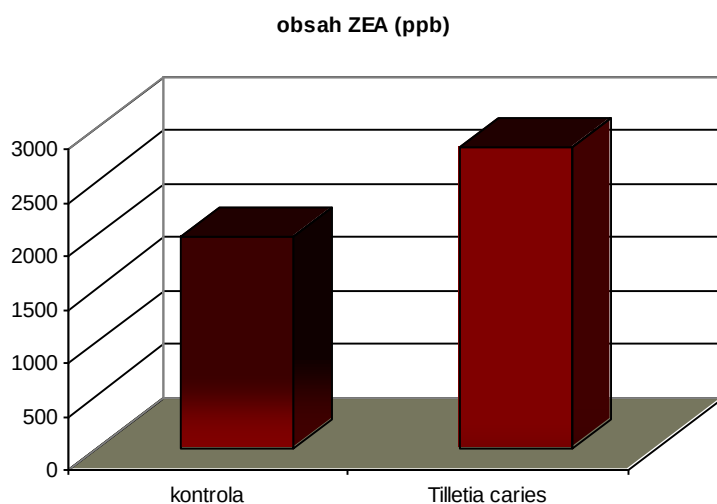
Graf 1. Obsah toxinů při různé míře napadení klasů *Tilletia caries*.



ppb= $\mu\text{g/kg}$

ppm= mg/kg

Graf 2. Obsah zearalenonu v kontrolní variantě a ve variantě napadené *T. caries*.



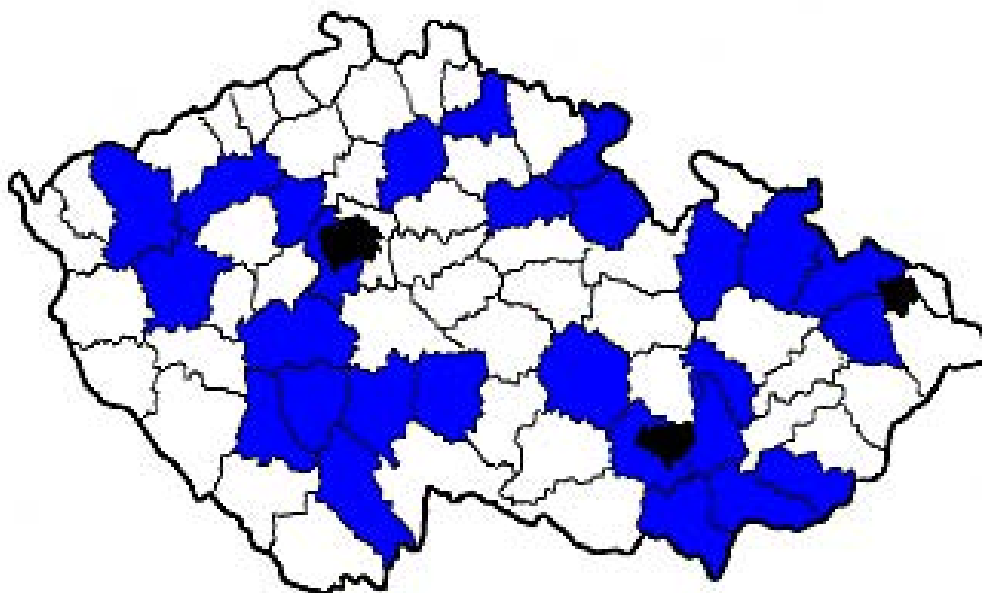
11. Výskyt *Tilletia caries* a *Tilletia controversa* v České republice

Snětivost pšenice způsobovaná houbami *Tilletia caries* (syn. *T. tritici*), *T. controversa* a *T. laevis*, (syn. *T. foetida*) je rozšířená v mnoha zemích světa, onemocnění se ale ve většině let vyskytuje s menší četností a malým dopadem na výši výnosu. Větší ztráty bývají kvalitativní díky zápachu napadeného obilí, jak už bylo zmíněno výše.

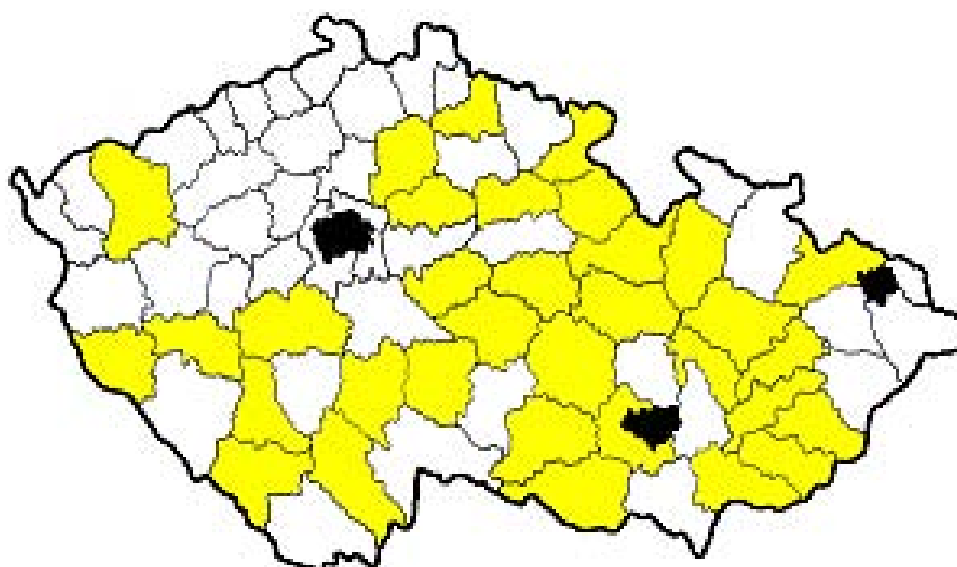
V našich podmínkách napadají ozimou pšenici nejčastěji druhy *T. caries* – mazlavá sněť pšeničná a *T. controversa* – zakrslá sněť pšeničná. Méně často se vyskytne napadení hladkou snětí pšeničnou – *T. laevis* (syn. *T. foetida*) i když v posledních dvou letech se nálezy objevily častěji. V ČR se napadení pšenice snětivostí vyskytuje pravděpodobně mnohem déle, než se o něm zmiňuje fytopatologická literatura. O tom, že onemocnění patří k velmi významným chorobám, psal již Baudyš (1929). V bývalém Československu se průzkumu zakrslé sněti pšeničné věnovali otec a syn Paulechovi, zmapovali její výskyt prakticky na celém území Slovenska (Paulech a kol., 1993a; Paulech a kol., 1993b; Paulech, Paulech, 1994). Paulech, Maglocky (1988) také dokumentovali výskyt *T. controversa* na pýru plazivém, pýru prostředním pravém a pýru chlupatém. Význam choroby výrazně klesl v době, kdy platila povinnost mořit veškeré partie osiva obilnin a navíc se ještě směla používat nyní již dlouho zakázaná rtuťnatá mořidla. Po roce 1990 se ponechalo na rozhodnutí pěstitelů, zda budou či nebudou používat fungicidně ošetřené osivo obilnin a vzhledem k ceně se většina pěstitelů přiklonila k verzi na moření osiv ušetřit. To spolu s dalšími faktory (postupné vyloučení klasických osevních postupů, změny v technologiích zpracování půdy, změny v odrůdové skladbě, ve výživě, změny sortimentu mořidel) vedlo k postupnému nárůstu výskytu patogenů přenosných osivem, včetně snětí rodu *Tilletia*. Impulsem pro to, aby se snětem na pšenici opět začala věnovat zvýšená pozornost, byl vysoký výskyt choroby v letech 2000 a 2002, kdy došlo ke značným ekonomickým ztrátám a omezení možnosti prodat pšeničné zrna do zahraničí. Náš tým se problematice začal věnovat v roce 2001, kdy v rámci řešení projektu NAZV QC 1264 bylo provedeno hodnocení více než tisíce vzorků zrna ozimé pšenice z provozních ploch z různých krajů ČR. Byla provedena sumarizace všech dostupných dat získaných výsledků z Agrotest fyto, s. r. o., ČZU a podkladů poskytnutých Státní rostlinolékařskou správou a byly zpracovány mapky pozitivních výskytů

(Obr. 19, 20). Už v té době jsme konstatovali a zdůrazňovali, že se zvyšuje počet pozemků s výskytem snětí.

Obr. 19. Výskyt *Tilletia caries* v letech 2001 – 2003. Modře označeny okresy s místy výskytu.



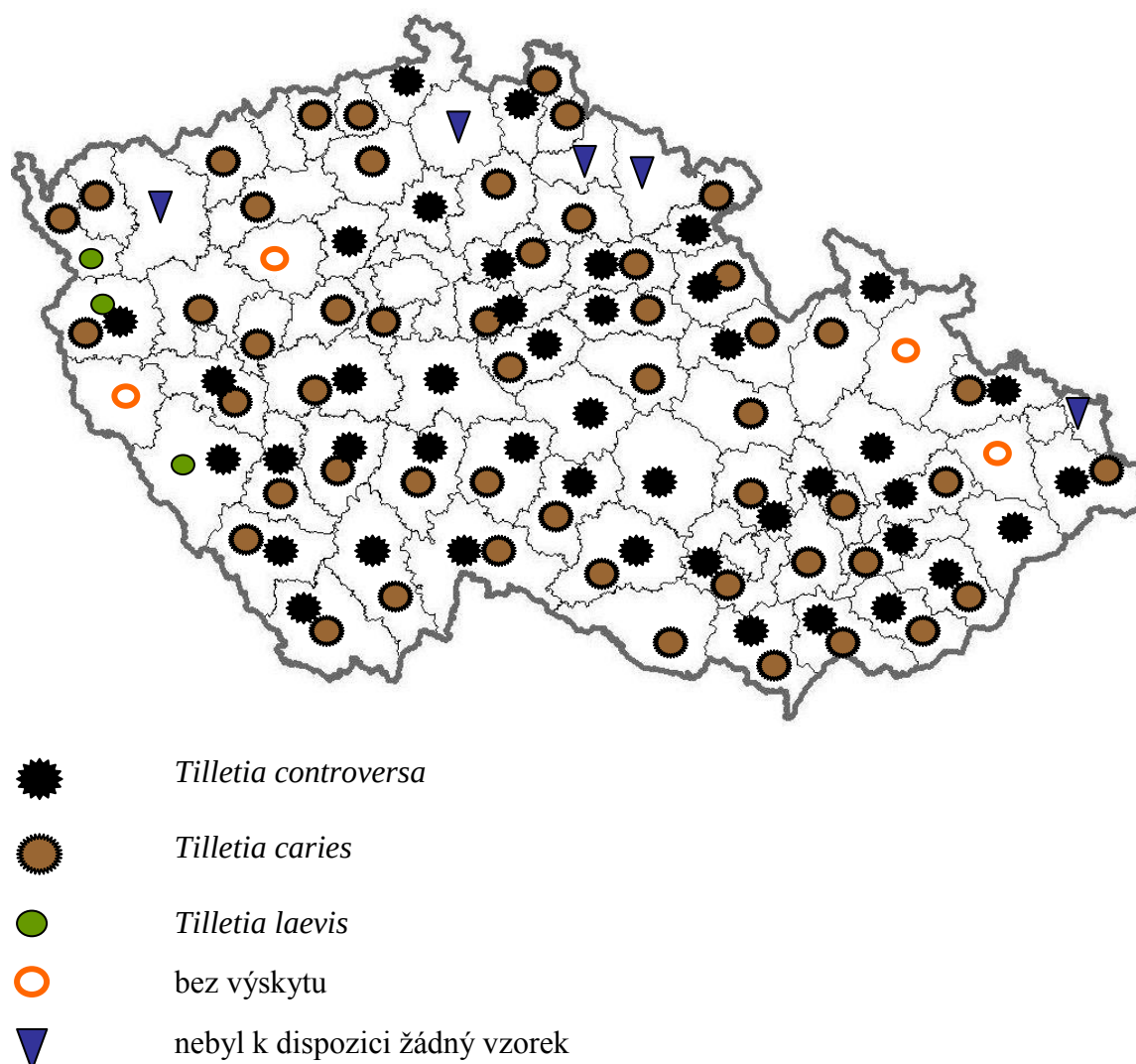
Obr. 20. Výskyt *Tilletia controversa* v letech 2001 – 2003. Žlutě označeny okresy s místy výskytu.



Potvrzení přítomnosti *T. caries* a *T. controversa* v Čechách i na Moravě v posledních letech najdeme i v popisné mykologické literatuře (Kokeš, Miller, 2004). Také v dalších letech pokračoval monitoring výskytu snětivosti pšenice na pracovišti Agrotest fyto, s. r. o. Používali jsme následující metodu detekce spor. Pro hodnocení byly odebírány vzorky zrna z kombajnové sklizně z různých krajů ČR. Z každého vzorku bylo odebráno 10 g nečištěného zrna a k vzorku přidáno 10 ml vody se smáčedlem. Po tříminutovém protřepávání byla vzniklá suspenze přelita a odstředěna. Kapka sedimentu byla přenesena na podložní sklíčko, překryta krycím sklíčkem a mikroskopována při 200 násobném zvětšení. Výtrusy *Tilletia* spp. byly determinovány podle mikroskopických morfologických znaků.

Výsledné hodnoty jsou udávány v procentech pozitivních vzorků. Jako pozitivní byl vyhodnocen vzorek, ve kterém byla pozorována alespoň 1 spora sněti. Ze sumarizovaných výsledků Státní rostlinolékařské správy, našich (a osobních ověření mimo seznam vzorků – není uvažováno v konečném vyhodnocení předkládaných výsledků) vyplývá, že jak *T. caries*, tak *T. controversa* se na našem území rozšířily do všech oblastí pěstování pšenice (Obr. 21).

Obr. 21. Rozšíření *T. caries* a *T. controversa* v ČR, stav k roku 2011.



Mapka ovšem nevypovídá nic o četnosti a intenzitě výskytu snětivosti v jednotlivých okresech, udává pouze, ze kterých okresů pocházely vzorky s pozitivními nálezy. Četnost a intenzitu výskytu nelze objektivně vyhodnotit, resp. porovnat výskyt v jednotlivých krajích, okresech, protože se liší počet vzorků z jednotlivých okresů, v některých případech se jednalo o 1 – 2 vzorky z okresu. Tento stav jsme nemohli nijak ovlivnit, protože nemáme oprávnění vzorky vymáhat, jejich poskytnutí je zcela dobrovolné a závislé na ochotě pěstitelů ke spolupráci. O té ve vztahu ke konkrétní oblasti orientačně vypovídá počet okresů, ze kterých se podařilo vzorky získat. Dlouhodobě se nedaří zajišťovat vzorky hlavně z okresů Karlovarského kraje a dále z Libereckého kraje, ve kterém jsou ale vzhledem ke krajinnému rázu srovnatelně menší plochy pěstování pšenice. Podrobnější údaje z let 2010 a 2011

uvádějí Tab. 5 a 6. (Výsledky monitoringu Státní rostlinolékařské správy jsou dostupné na webových stránkách instituce.) Z tabulek je vidět, že počet vzorků s výskytem *Tilletia* spp. koresponduje spíše s celkovým počtem zpracovaných vzorků než s konkrétní oblastí. Znepokojující je fakt, že i zakrslá sněť pšeničná, která je podle všech zatím dostupných údajů vázána spíše na chladnější vlhčí polohy, byla relativně často detekována ve vzorcích z jižní Moravy a Středočeského kraje. Graf 3 udává procento vzorků pšenice pozitivních na výskyt snětí rodu *Tilletia* z celkového počtu námi hodnocených vzorků v jednotlivých letech (minimálně 300 vzorků v každém roce). Také z tohoto grafu je zřejmý postupný nárůst výskytu onemocnění ve srovnání s rokem 2001. Přestože výskyt choroby silně ovlivňuje průběh počasí toho kterého ročníku, je nezpochybnitelné, že v posledních deseti letech se jak mazlavá, tak zakrslá sněť pšeničná ve srovnání s rokem 2001 významně rozšířily.

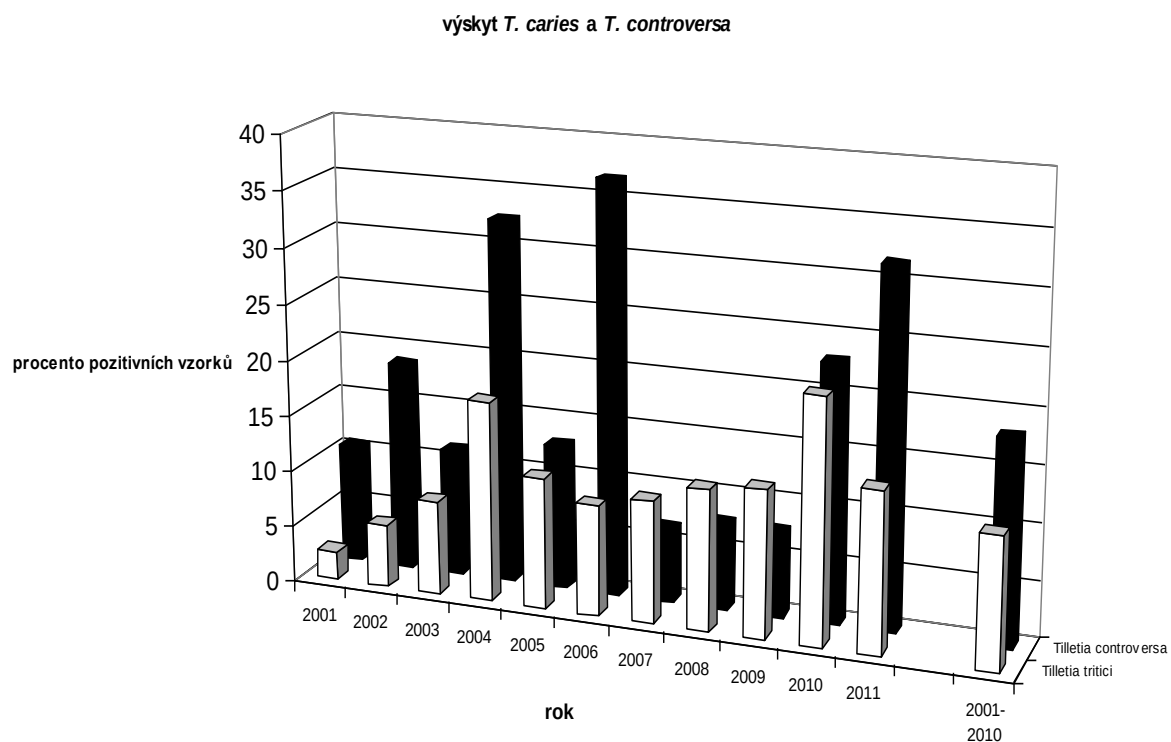
Tab. 5. Výskyt sněti *Tilletia caries* a *T. controversa* dle krajů a okresů v roce 2010.

Kraj	počet vyšetřených vzorků celkem	počet vzorků s výskytem <i>T. caries</i>	počet vzorků s výskytem <i>T. controversa</i>	počet vzorků se současným výskytem <i>T. caries</i> a <i>T. controversa</i>	počet okresů, ze kterých byly k dispozici vzorky
Jihočeský	33	17	14	8	7
Jihomoravský	57	18	12	7	6
Karlovarský	0	0	0	0	0
Královéhradecký	16	1	0	0	4
Moravskoslezský	16	1	2	1	4
Olomoucký	42	5	11	2	5
Pardubický	12	2	3	1	3
Plzeňský	25	3	9	1	7
Středočeský	33	3	8	3	9
Ústecký	14	5	0	0	3
Vysočina	28	5	6	4	5
Zlínský	24	4	5	3	3
Liberecký	1	1	0	0	1
celkem ČR počet	301	65	70	30	57
celkem ČR %	100	21,6	23,3	10	
celkem pozitivních vzorků ČR: 54,8 %					

Tab. 6. Výskyt sněti *Tilletia caries* a *T. controversa* dle krajů a okresů v roce 2011.

Kraj	počet vyšetřených vzorků celkem	počet vzorků s výskytem <i>T. caries</i>	počet vzorků s výskytem <i>T. controversa</i>	počet vzorků se současným výskytem <i>T. caries</i> a <i>T. controversa</i>	počet okresů, ze kterých byly k dispozici vzorky
Jihočeský	59	11	31	11	6
Jihomoravský	43	9	9	7	6
Karlovarský	1	0	1	0	1
Královéhradecký	24	2	5	2	4
Moravskoslezský	25	2	4	0	4
Olomoucký	34	4	10	3	5
Pardubický	13	0	4	0	3
Plzeňský	32	5	14	4	8
Středočeský	31	4	10	3	11
Ústecký	7	1	2	1	2
Vysočina	29	3	3	2	5
Zlínský	18	4	7	4	3
celkem ČR počet	316	45	100	37	58
celkem ČR %	100	14,24	31,65	11,71	
celkem pozitivních vzorků ČR: 57,6 %					

Graf 3. Procento vzorků s přítomností *Tilletia* sp. v jednotlivých letech.



12. Příčiny rozšíření *Tilletia controversa* a *Tilletia caries* a riziko dalších výskytů

12. 1. Osivo jako zdroj infekce

Zdrojem infekce jednotlivých druhů *Tilletia* spp. může být jak osivo, tak půda (Wilcoxon, Saari, 1996). Ve spolupráci s OSEVA PRO, s. r. o. jsme ověřovali přítomnost výtrusů sněti v přečištěném osivu a až na dva vzorky s minimálním výskytem (zachycena 1 spora v průměrném vzorku 0,5 kg) bylo všech ostatních 78 vzorků bez výskytu. Vzhledem k tomu, že osivo množitelských porostů prochází kontrolou i ve vzorku, je minimální pravděpodobnost, že zdrojem infekce je v našich podmínkách certifikované osivo, i když zcela to vyloučit nelze vzhledem k platnosti Vyhlášky 369/2009Sb, ve znění 289/2010 Sb., 168/2011 Sb. Ta povoluje maximální počet spor *Tilletia* spp. v osivu 10 spor/1 zrno. Je třeba zmínit, že kontrola osiva ve vzorku na přítomnost *Tilletia* spp. v ČR se týká pouze osiva české provenience. Osivo z EU mimo ČR neprochází ve smyslu dohod uvnitř EU kontrolou na našem území a akceptuje se listinný doklad a to i v případě, že dodavatelská země EU osivo nakoupila mimo EU. Zdrojem infekce dále může být farmářské osivo, které žádné kontrole nepodléhá. Přitom o tom, že v takovém osivu jsou přítomny výtrusy sněti, nemusí jeho producent vůbec vědět, protože kontaminace není okem zjistitelná a podle zápachu je možné rozpoznat pouze zrno ze silně napadených porostů. K zamoření půdy může dojít i v případě, že napaden není vlastní porost, ale porost na některém z okolních pozemků.

V letech 2007 – 2010 byly na pracovišti Agrotest fyto, s. r. o. prováděny maloparcelkové pokusy, ve kterých byla použita před setím umělá inokulace osiva sporama *T. caries* v dávce 2 g spor/1 kg osiva. Do těchto pokusů byly zařazeny různé odrůdy (26 – 46 odrůd ozimé pšenice v jednotlivých letech). Symptomaticky bylo hodnoceno napadení klasů, výsledek byl uváděn v procentech napadených klasů. Porovnáním hustoty inokula použitého ve tříletých maloparcelkových pokusech s výsledným průměrným napadením porostu a následným přepočtem (průměrný počet spor v jedné hálce vztažený k počtu vyšetých zrn) bylo zjištěno, že průměrné napadení porostu při hustotě inokula odpovídající cca 9 sporám na 1 zrno odpovídá přibližně 1 % klasů, samozřejmě v závislosti na průběhu počasí, odolnosti odrůdy a dalších faktorech. Přibližný počet výtrusů sněti v jedné hálce jsme ověřovali

jednoduchou metodou: hálka byla umístěna do 100 ml destilované vody, rozdrovena a 3 minuty protřepávána. Ze získané suspenze byla kapka přenesena do Bürkerovy komůrky a přepočtem byl stanoven počet spor v 1 ml suspenze. Vynásobením $100\times$ jsme získali počet spor v jedné hálce. Tímto způsobem bylo zhodnoceno 10 hálek, z každé hálky bylo spočítáno 4×100 velkých čtverců Bürkerovy komůrky. Po vyhodnocení údajů jsme dospěli k průměru 32 milionů výtrusů obsažených v jedné hálce. V případě napadení *T. caries* či *T. controversa* je obvykle napaden celý klas, tj. vytvoří se kolem 30 hálek. Tedy z pouhého jednoho napadeného klasu v celém porostu se může uvolnit kolem 9×10^8 výtrusů, které částečně ulpí na sklizených zrnech, částečně se uvolní do půdy a při jejím následném zpracování jsou rozšířeny po pozemku. K šíření patogenů napomáhá i používání fungicidně neošetřeného, popř. nesprávně namořeného osiva (výběr nevhodného přípravku, nebo jeho nesprávná dávka, případně nerovnoměrná aplikace). Fakt, že používání farmářských nemořených osiv stoupá, je dokladován přehledem o obměně osiv. Podle ústní informace Českomoravské šlechtitelské a semenářské asociace obměna osiva ozimé pšenice klesla z cca 75 % v r. 1990 na přibližně 40 % a je důsledkem zrušení povinnosti mořit všechny partie osiva se současným zrušením dotačního titulu pro osivo a ekonomické situace pěstitelů. V případě výsevu takového osiva je vysoké riziko výskytu choroby a při sklizni je pak i několik (často nezjištěných) napadených klasů v celém porostu zdrojem primárního zamoření jak daného pozemku, tak okolních polí.

12. 2. Půda jako zdroj infekce

Část výtrusů je při sklizni, kdy dojde k rozbití hálky, roznášena větrem i na okolní plochy. Jaká je maximální vzdálenost „doletu“ spor unášených větrem není známo, ale tyto údaje jsou k dispozici např. u výtrusů obilných rzí, u nichž jde o vzdálenosti až několika tisíců kilometrů. I když vezmeme v úvahu, že na okolní plochy se dostane třeba jen jedna třetina spor, je to 3×10^8 (z jednoho klasu). A pokud jen jedna desetina bude klíčivých (10^7) a z nich jen jedna desetina vyvolá infekci (10^6), přičemž choroba se rozvine jen u tisíce infikovaných rostlin, tak výsledkem bude 10^3 napadených rostlin v porostu. I kdyby u každé infikované rostliny byl napaden pouze jeden klas, tak je to pořád 1 000 napadených klasů na daném pozemku. Obvykle se uvádí, že na pozemku dlouhodobě přežívají pouze spory zakrslé sněti pšeničné (až osm let). Bylo však prokázáno, že půda může být zdrojem infekce i

v případě mazlavé sněti pšeničné, i když její výtrusy mají údajně životnost jen dva roky (Yarham, 1993; Borgen, 2000). Na základě dosud provedených pozorování a měření konstatujeme, že právě kontaminované pozemky jsou v našich podmínkách spolu s farmářským osivem hlavním zdrojem infekce. Nemalou měrou k tomu přispívá faktický zánik osevních postupů a zařazování pšenice na jeden pozemek ob jeden rok, v některých případech i po sobě. Jak už jsme se zmínili výše, prakticky není možné primární kontaminaci pozemku zabránit, pokud se v okruhu (předpokládáme) několika kilometrů sklízí byť jen slabě napadený porost.

13. Účinnost doporučovaných ochranných opatření

13. 1. Význam odrůdy

Odolná odrůda je pravděpodobně nejefektivnějším a k prostředí nejšetrnějším ochranným opatřením a to ve všech systémech hospodaření. Zcela nezastupitelnou roli má pak v systémech ekologického hospodaření (Ruzgas, 2005). Sněti rodu *Tilletia* jsou obligátními patogeny rostlin (jsou schopny růst, vyvíjet se a rozmnožovat se pouze v živé hostitelské rostlině). Obligátní patogeny obecně tvoří skupinu, u které jsou obvykle jednotlivá samostatná ochranná opatření málo účinná. Ze všech známých metod ochrany rostlin má v tomto případě největší účinnost jedna z preventivních metod – používání odolných odrůd. Odolné (rezistentní) odrůdy mají mechanismy, které je uchrání proti vzniku infekce a rozvoji onemocnění. Většina odrůd (nejen pšenice ozimé, ale všech kulturních plodin) nabízených jako rezistentní jsou ale obvykle jen vysoce tolerantní, tzn. že sice dojde k proniknutí patogena do pletiv hostitele, ale infekce se nerozvíjí, nedojde k rozvoji onemocnění. U náchylných odrůd pak jsou mechanismy obrany vůči danému patogenu slabé, dojde k infekci rozvoji choroby. Přesto jsou ale i mezi náchylnými odrůdami rozdíly v citlivosti k napadení a stejně tomu je i v případě *Tilletia* spp. Protože mazlavá a zakrslá sněť pšeničná jsou celosvětově rozšířené a představují dlouhodobý problém při produkci pšenice v řadě zemí především severní polokoule, věnují jim značnou pozornost i šlechtitelé. Ve světovém sortimentu odrůd ozimé pšenice tak již existují odolné odrůdy, které obsahují jeden či více Bt genů rezistence. Těchto genů je známo 15, z toho jen u 13 byl potvrzen

výskyt v kultivarech ozimé pšenice (Goates, 1996). Při výběru vhodných genů rezistence je potřeba mít informace o rasách sněti, které byly popsány (Hoffmann, Metzger, 1976) s tím, že nelze vyloučit objevení se nových ras. Hole *et al.* (1995) získali odrůdu Promontory, která je určena do aridních oblastí a je odolná vůči *T. controversa*. Windes *et al.* (1995) získali čtyři kultivary odrůdy Idaho, určené do aridních oblastí, které jsou odolné vůči *T. controversa*. Autoři udávají, že jejich většímu uplatnění brání nízká pekařská kvalita. Na Slovensku se mírou odolnosti odrůd ozimé pšenice k *Tilletia* spp. zabýval Huszár (1993), který zjistil vysokou odolnost vůči hladké sněti pšeničné u odrůd Ilona a Vlada, zatímco silně náchylné byly odrůdy Zdar, Sparta, Selecta a Iris. V Čechách se této problematice dlouhodobě věnuje pracoviště Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Praze – Ruzyni. V testech Dumasové, Bartoše (2006), ve kterých bylo na odolnost k *T. caries* a *T. laevis* (pozn. *T. foetida*) hodnoceno 90 odrůd evropského sortimentu, se z nabídky odrůd na českém trhu jako vysoce odolné projevíly odrůdy Globus a Bill. Jako vysoce náchylná se jevila odrůda Pitbull (Dumasová, Bartoš, 2010). Tyto výsledky nejsou zcela ve shodě s naším hodnocením. Také v našich testech patřily odrůdy Bill a Globus k odolnějším, u odrůdy Pitbull se míra napadení výrazně lišila mezi *T. caries* a *T. controversa*.

O významu snětivosti pšenice a s ním související snahou získat odolné odrůdy svědčí i fakt, že existuje snaha využít i nejnovější šlechtitelské metody, mezi které patří genetické inženýrství. O zlepšení odolnosti dvou odrůd pšenice k *Tilletia caries* vnesením specifického virového genu do jejího genomu se poměrně úspěšně pokusili Schlaich *et al.* (2006).

Hodnocení míry odolnosti odrůd k napadení *T. caries* a *T. controversa* bylo také jako součást řešení našeho projektu prováděno v polních testech na pracovišti Agrotest fyto, s.r.o. Maloparcelkové pokusy byly založeny na pozemcích v Kroměříži (test na odolnost vůči *T. caries*) a na pozemku ZD Ratiboř, okr. Vsetín (test na odolnost vůči zakrslé sněti pšeničné). Osivo bylo uměle inokulováno sporami sněti *T. caries* (pozemky Agrotest fyto, s. r. o.) a *T. controversa* (pozemky ZD Ratiboř) v dávce 2 g na 1 kg osiva. Každá varianta měla čtyři opakování při standardní velikosti jedné parcely (opakování) 10 m². V jednotlivých letech bylo do testů zařazeno 26 – 40 odrůd z aktuálního sortimentu na českém trhu. Ve snaze otestovat co nejvíce odrůd nebyly zcela shodné soubory odrůd pro testy citlivosti vůči *T. caries* a *T. controversa*. Vycházeli jsme z toho, že u odolných odrůd zakládají odolnost vůči oběma sledovaným druhům *Tilletia* stejné geny (Goats, 1996).

Stupnice pro hodnocení citlivosti odrůd jak proti *T. caries* tak *T. controversa* zatím neexistuje. Je používána stupnice dle Zwatz, Zedenbauer (1997), která uvádí následující

třídění: málo citlivé < 8 %, středně citlivé 8-20 %, silně citlivé 20-40 %, velmi silně citlivé > 40 %. Pro přesnější hodnocení navrhuji Wächter *et al.* (2007) dodatečné kategorie (rezistentní 0-0,01 %, velmi málo citlivé > 0,01 – 2 %). Pro naše hodnocení jsme použili kombinaci obou stupnic dle následujícího rozlišení (Tab. 7).

Tab. 7. Stupnice hodnocení četnosti napadených klasů.

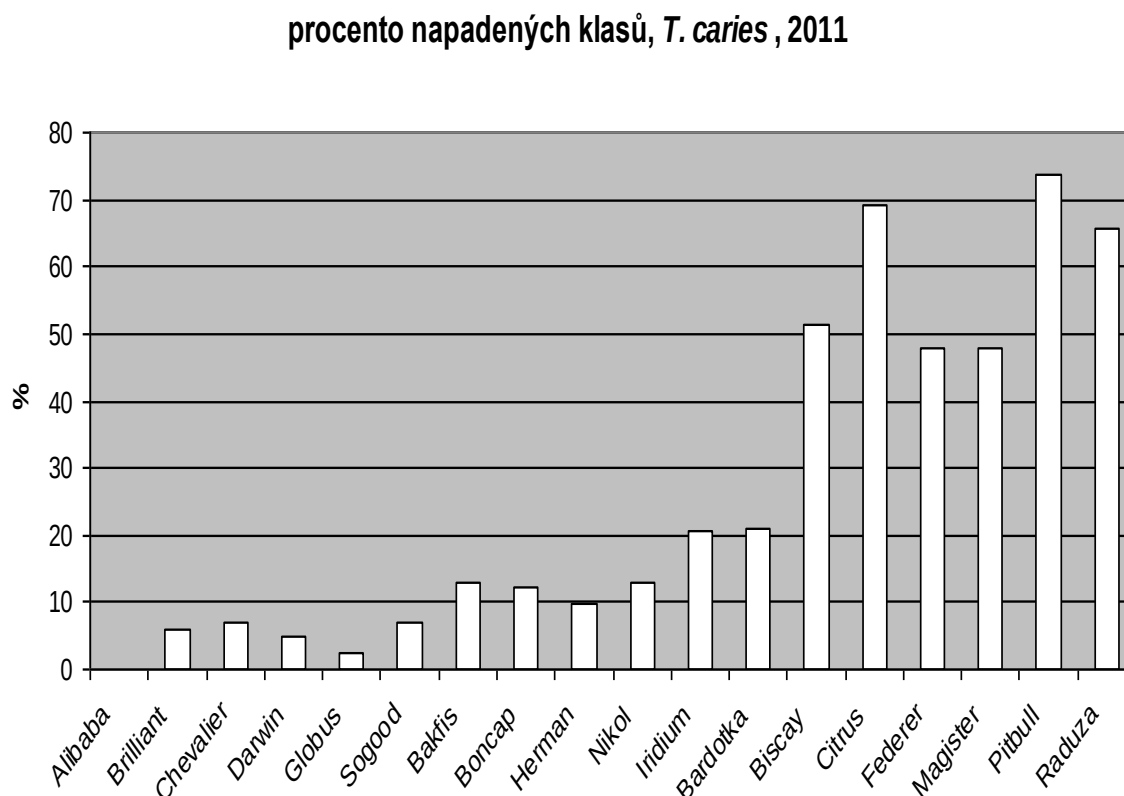
označení míry citlivosti	procento napadených klasů
rezistentní	0 - 0,01%
velmi málo citlivé	0,01 - 2 %
málo citlivé	< 8 %
středně citlivé	8 - 20 %
silně citlivé	20 - 40 %
velmi silně citlivé	> 40 %

13. 2. Citlivost odrůd k *Tilletia caries*

V případě mazlavé sněti pšeničné byly do hodnocení zahrnuty i výsledky, které jsme měli k dispozici z minulých let. Průměrné procento napadených klasů odrůd testovaných ve více letech udává Tab. 8. Jsou zařazeny pouze odrůdy, u kterých máme k dispozici nejméně tříleté výsledky. Jak z tabulky, tak z grafu je zřejmé, že ani jednu z testovaných odrůd nelze zařadit do kategorie „rezistentní“, ani do kategorie „velmi málo citlivé“. Málo citlivé byly v průměru hodnocených let odrůdy Alana, Stela, Banquet, Baroko, Bill, Brea a Versailles. V kategorii „silně citlivé“ je sedm odrůd, jako „velmi silně citlivá“ byla vyhodnocena odrůda Eurofit. Ke středně citlivým se zařadilo sedm odrůd, osm odrůd sejevilo jako málo citlivé, žádná se nezařadila ani do kategorie velmi málo citlivé ani do kategorie rezistentní. V grafu 4 je uvedeno průměrné procento napadení klasů odrůd zařazených do testu nově v r. 2011. Jako silně citlivé se v tomto rocejevily odrůdy Pitbull, Raduza, a Citrus a Biscay.

Tab. 8. Průměrné procento klasů různých odrůd pšenice napadených *T. caries*.

	2001	2002	2004	2007	2008	2009	2010	2011	průměr odrůdy
Akteur				6,59	5	39,8	9,38	10,65	14,3
Alana			5,93		1,2		11,67	8,8	6,9
Andurill					14,4	26	30,77	34,16	26,3
Astela	3,47	0,93	10,38						4,9
Banquet			10,56	5,43	2,2				6,1
Barroko				1,1		15,6	4,17	0,37	5,3
Barryton					24,4	48,1	30,04	53,49	39
Bill			5,48	5,41	1,9	0	4,9	0,51	3
Bohemia					3,6			26,24	14,9
Brea	1,18	1,16	11,06						4,5
Caphorn				8,84	13,8		31,21		17,9
Contra	3,15	9,78	20,2						11
Cubus				25,41	3,9	22,3	12,99	51,75	23,3
Darwin				8,33	2,4	14,1	19,88	5,03	10
Drifter	22,99	20,43	15,29		13,4	30,3	39,15	6,4	21,1
Ebi	12,61	34,34	24,05	14,74	28,8	51,1	28,24	50,2	30,5
Etela					7,5	8,5	18,28	39,73	18,5
Eurofit					20,1	58,4	45,03	59,59	45,9
Hedvika				10,06	16,8	34,4			20,4
Karolinum				0		35,1	0,84	4,1	10
Ludwig				6,84	7,3	22	6,42		10,6
Meritto				8,72	14,5	22,3	27,1	60,69	26,7
Mulan					6,4	31,6	1,24	2,76	10,5
Nela		0	59,97		1,2		2,16	0,61	12,8
Niagara	2,53	9,91	15,05	8,99					9,1
Rheia				10,91	23,1	31,5	26,92	43,56	27,2
Samanta	2,79	1,01	18,75		10,2	12,3		43,56	14,8
Saskia	5,98	1,83	33,97						13,9
Simila				13,37	6,9		24,38		14,9
Sulamit	8,61	6,06	16	5,71	4,7	36,3	23,39		14,4
Šárka	2,07	2,68	33,58						12,8
Trend			46,61	6,67		14,3			22,5
Versailles	3,79	2,75	6,26						4,3
Vlasta	3,41		31,57		9,7				14,9
průměr roku	6,9	7,9	23	10,63	11,1	28,6	17,8	26,4	

Graf 4. Procento klasů napadených *T. caries*, odrůdy nově zařazené do testů v r. 2011.

13. 3. Citlivost odrůd k *Tilletia controversa*

Pro zakrslou sněť pšeničnou máme k dispozici pouze výsledky získané při řešení projektu QH 71105, tj. z let 2008 – 2010. Všechny odrůdy nejsou zastoupeny ve všech letech. Tab. 9 informuje o procentu napadených klasů testovaných odrůd v jednotlivých letech. Na rozdíl od *T. caries* bylo do kategorie „rezistentní“ zařazeno sedm odrůd, pouze jedna odrůda (Megas) se jevila jako velmi silně citlivá. V Grafu 5 jsou uvedeny zjištěné výsledky u odrůd zařazených nově do testu v roce 2011. Žádná z těchto odrůd nebyla rezistentní ani velmi málo citlivá, relativně odolné se jevily odrůdy Darwin, Raduza a Eurofit. Nejvíce napadena byla odrůda Anduril – 29,6 % napadených klasů.

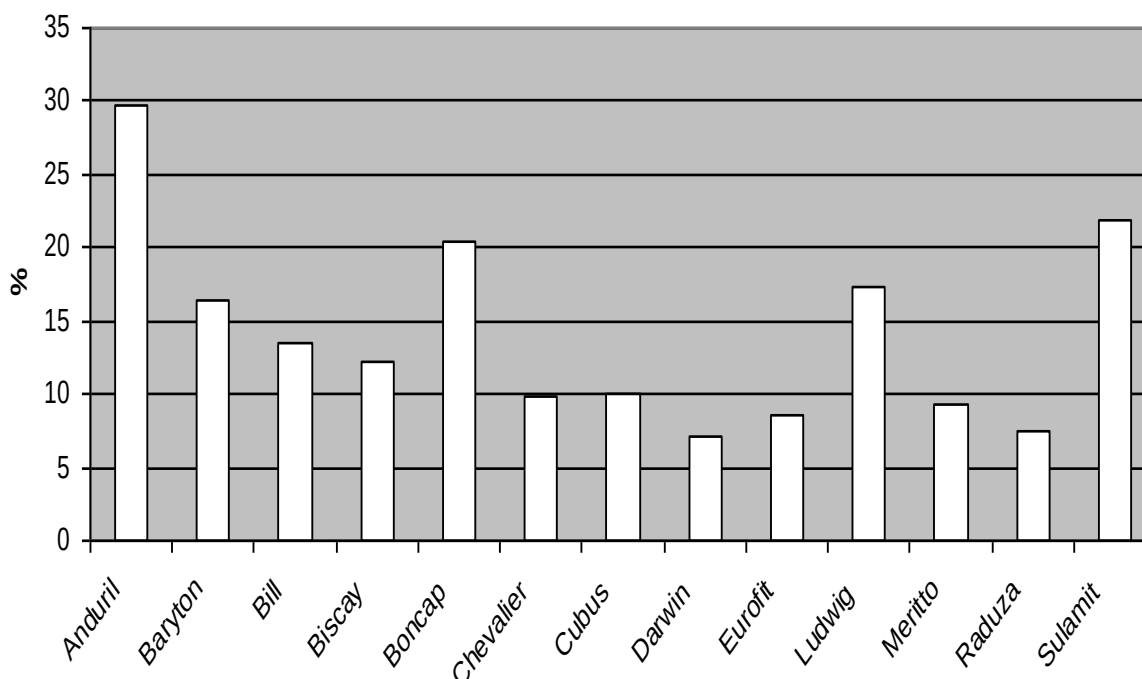
Tab. 9. Průměrné procento klasů napadených *T. controversa*.

odrůda	2008	2009	2010	2011	průměr odrůdy
Alana	4,72		7,9	7,98	6,9
Alibaba	1,98		7,6	8,52	6
Bagou		28,3			28,3
Bakfis		4,4	12,85	19,48	12,2
Baletka		6,6			6,6
Banquet	2,5				2,5
Bardotka		14,6	9,65	12,2	12,1
Barroko		15,6	18,35	15,49	16,5
Batis	0				0
Biscay		32	7,55	12,29	17,3
Bohemia	0	23,6		8,53	10,7
Boncap		32,2		20,44	26,3
Brilliant		0		7,45	3,7
Buteo	0				0
Caphorn	0				0
Citrus		55,2	3,6	7,45	22,1
Clever	0				0
Dromos	0	22,8			11,4
Federer		47,9	10,6	19,88	26,1
Florett	0				0
Globus	2,27		9,45	7,77	6,5
Hedvika	0	34,4			17,2
Hermann		54,1	5,5	6,43	22
Ilias	0				0
Iridium		28,8	6,8	3,15	13
Karolinum		35,1	11,6	19,53	22,1
Kerubino	0	57,7			29,9
Kodex		34,3			34,3
Magister			9,3	17	13,2
Manager		15,3			15,3
Megas		47,8			47,8
Mulan	0	31,6		8,74	13,4
Nela	0		20,6	8,74	9,8
Nikol		13,3		10,31	11,8
Orlando	21,8				21,8
Pitbull		57,1	8,75	6,89	24,2
Rheia	0	31,5		12,95	14,8

Rapsodia		17,5			17,5
Sakura	0	40,3			20,2
Samanta	0	12,3			6,2
Secese		8,2			8,2
Seladon		32,1			32,1
Simila	5,56		12,2	19,48	12,4
Sogod		11	13,7	7,21	10,7
Sultan		14,1			14,1
Trend		14,3			14,3
Vlasta	3,47				3,5
průměr roku	1,9	27,3	10,4	11,6	

Graf 5. Procento napadených klasů *T. controversa* odrůd zařazených do hodnocení v r. 2011, neuvedených v Tab. 9.

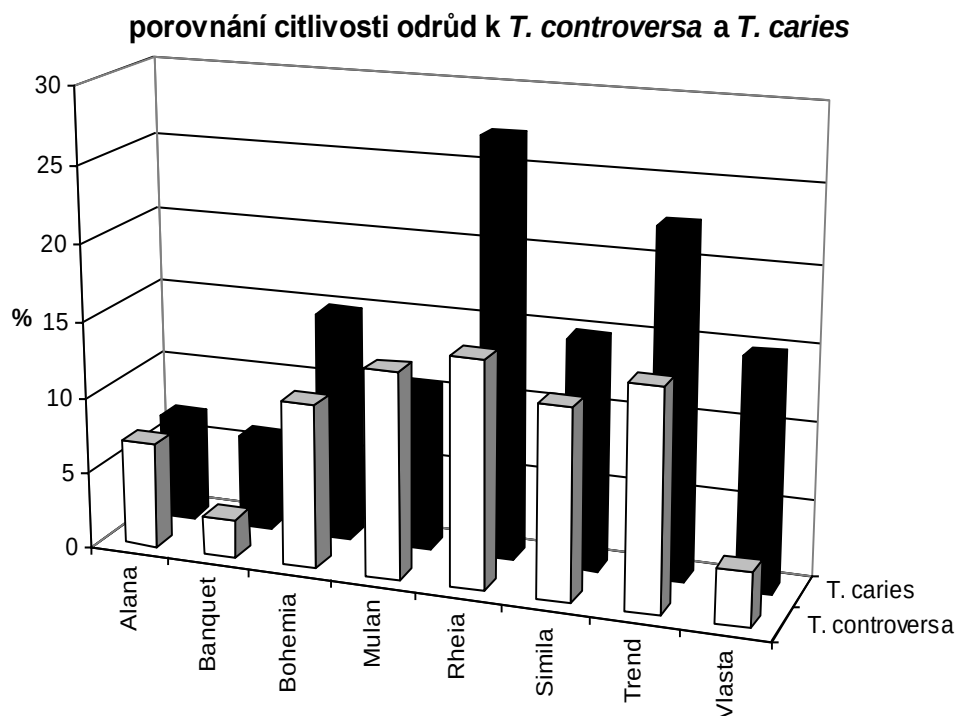
procento napadených klasů, *T. controversa*, 2011



U odrůd, které byly minimálně ve třech letech zařazeny v obou souborech testování, tj. jak na citlivost k *T. caries*, tak na citlivost k *T. controversa*, jsme porovnali výsledky. Ne u všech odrůd byla shoda v citlivosti vůči napadení druhu *Tilletia*, nejvíc byl patrný rozdíl v reakci odrůdy Vlasta. Stejnou zkušenost učinili i Huber, Bürstmayr (2006). V jejich

pokusech všechny odrůdy, které vykazovaly odolnost vůči *T. controversa*, byly odolné i vůči *T. caries*, ale naopak nikoli. Stejnou reakci k oběma druhům sněti vykazaly odrůdy Alana a Banquet (Graf 6). Výsledky je nutné brát pouze jako orientační, protože je nutno brát v úvahu jak rozdílné nároky obou druhů sněti na podmínky prostředí vhodné pro vznik infekce, tak na rozdíly v průběhu pošasí na sledovaných lokalitách.

Graf 6. Procento klasů napadených *T. caries* a *T. controversa*.



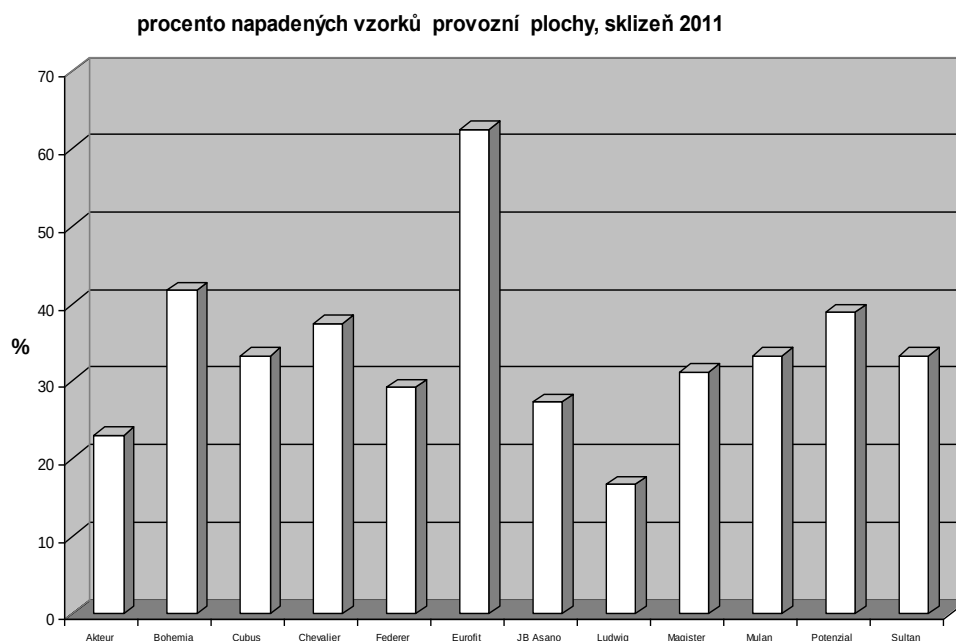
V roce 2011 jsme u většiny vzorků z provozních ploch měli k dispozici údaje o odrůdě. V Tab. 10 je uvedeno, kolik z celkem testovaných vzorků bylo pozitivních na výskyt sněti. Neuvádíme rozdělení na *T. caries* a *T. controversa*. Není také možné podrobně výsledky vyhodnotit, protože u některých odrůd byly k dispozici pouze 1 – 2 vzorky. Tabulka poskytuje mimo jiné informaci o tom, které odrůdy zaujímaly v r. 2011 největší podíl. Procento vzorků s výskytem spor *Tilletia* spp. u nejvíce zastoupených odrůd ve sklizni roku 2011 udává Graf 7. V Grafu 8 jsme se pokusili porovnat množství vzorků s pozitivním výskytem sněti z provozních ploch a míru napadení stejných odrůd v pokusu. Procento uvedené u vzorků z provozních ploch udává četnost napadených z celkového počtu hodnocených vzorků dané odrůdy. Procento u odrůd z pokusu udává procentické zastoupení napadených klasů dané odrůdy. Protože se jedná o hodnocení různých znaků, je porovnání pouze orientační. Přesto se domníváme, že na grafu můžeme dokladovat shodu mezi praxí a

výsledky testů odolnosti. Mezi nejvíce napadené odrůdy patřily v r. 2011 odrůda Eurofit a Federer, což plně odpovídá víceletému výsledku našeho hodnocení. Relativně málo časté bylo napadení odrůd Ludwig a Akteur, což také v podstatě odpovídá výsledkům našich pokusů a je tak důkazem věrohodnosti pokusného ověřování míry citlivosti jednotlivých odrůd vůči napadení snětí.

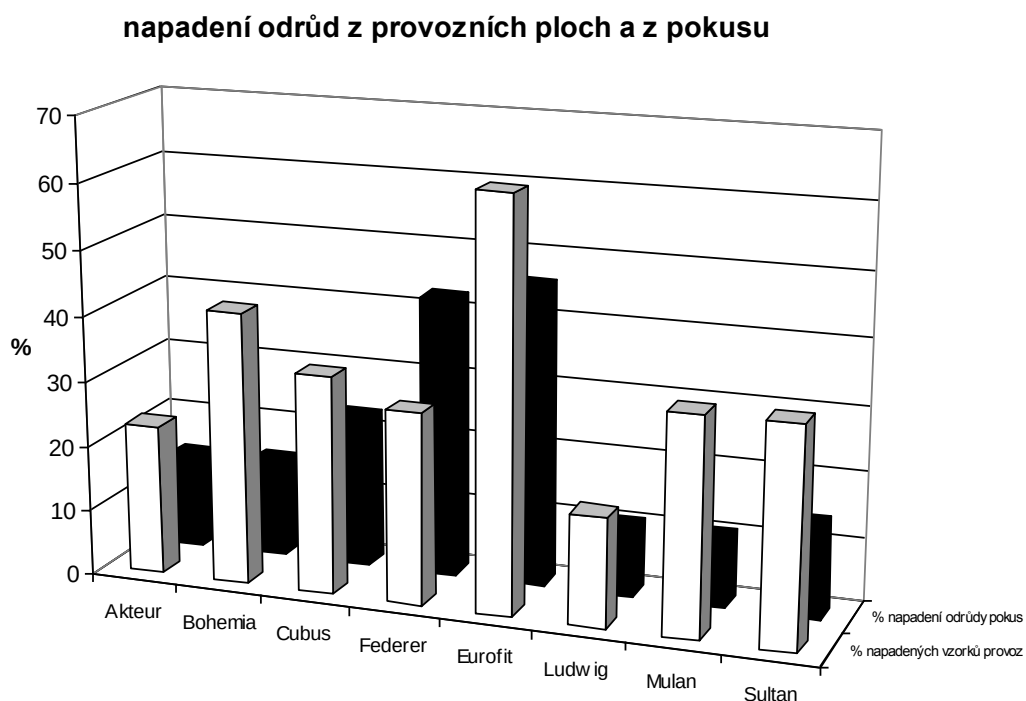
Tab. 10. Počet vzorků z provozních ploch, sklizeň 2011.

odrůda	celkem vzorků	z toho pozitivních	odrůda	celkem vzorků	z toho pozitivních
Akteur	13	3	Grany	2	1
Alana	5	2	Helmut	1	0
Altigo	2	1	Henrik	1	0
Apache	1	0	Hermann	4	0
Arida	1	1	IS Karpatia	1	0
Balada	3	0	JB Asano	11	3
Bakfis	3	1	Jindra	2	1
Baletka	5	1	Josef	1	0
Banquet	3	2	Kerubino	2	0
Bardotka	2	0	Košútka	1	0
Barryton	2	0	Ludwig	12	2
Batis	10	0	Magister	16	5
Biscay	2	2	Meritto	1	1
Bodyček	5	1	Midas	1	1
Bohemia	24	10	Mladka	4	0
Brilliant	3	0	Mulan	18	6
Brentano	1	0	orlando	3	0
Capo	1	1	Pannonia	5	3
Chevalier	8	3	Potenzial	18	7
Cubus	15	5	Preciosa	1	1
Dromos	3	1	Rapsodia	1	1
Ebi	2	1	Raduza	1	0
Elan	1	0	Rheia	1	0
Elly	6	3	TW Nadal	2	0
Etela	2	0	Sakura	2	1
Epos	4	0	Secese	1	0
Eurofit	8	5	Seladon	3	0
Federer	24	7	Sulamit	4	4
Florett	4	2	Sultan	12	4
Fiorina	1	0	SW Topper	1	1
Genius	2	0	Vánek	2	0
Globus	1	1	Verita	1	1
Graindor	1	0			

Graf 7. Procento vzorků s výskytem spor *Tilletia* spp. u nejvíce zastoupených odrůd, sklizeň 2011.



Graf 8. Porovnání napadení odrůd z provozních ploch a z pokusu.



Pozn.: Procento uvedené u vzorků z provozních ploch udává četnost napadených z celkového počtu hodnocených vzorků dané odrůdy.

Procento u odrůd z pokusu udává zastoupení napadených klasů dané odrůdy.

13. 4. Vývoj metod hodnocení odolnosti odrůd k *Tilletia* spp.

Základní metody hodnocení míry odolnosti pšenice k napadení *Tilletia* spp. vycházejí z nutnosti zjistit počet napadených klasů. Pro získání objektivních výsledků jsou tak nezbytné minimálně tři vegetační roky. V současné době je tato doba zcela nevyhovující díky rychlé obměně sortimentu odrůd na trhu. Pro zjištění napadení rostliny již v prvních vývojových fázích byla na ČZU vyvinuta metoda PCR (Polymerase Chain Reaction). V souvislosti s hodnocením citlivosti odrůd k *T. caries* a *T. controversa* byla možnost využít PCR metodu detekce patogena v raných fázích vývoje rostliny impulsem pro vyslovení předpokladu, že čím rychleji bude patogen po vzniku infekce v rostlině růst, čím větší množství mycelia v pletivech rostliny, především v jejím vzrostném vrcholu, bude, tím bude daná odrůda citlivější. Pro stanovení množství mycelia patogena ve vzrostných vrcholech vybraných odrůd pšenice v různých fázích vývoje bylo použito modifikované metody relativní kvantifikace pomocí real-time PCR s využitím SybrGreen. Pro absolutní kvantifikaci mycelia ve vzrostných vrcholech je nutné mít k dispozici stálou zásobu kvalitní standardní DNA, což může být při stanovení velkého počtu vzorků nevýhodné. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli modifikovat metodu dle Zouhar *et al.* (2010) a vytvořit tak relativní systém vyjadřující množství mycelia na úrovni DNA. Za tímto účelem byl amplifikovaný fragment ligován do vektoru pJET a jeho přítomnost byla ověřena sekvenací. Takto připravený plazmid byl použit jako standardní templát pro kvantifikaci a pro přípravu standardní ředící řady. Tímto způsobem lze dosáhnout kontinuálních výsledků bez opakované izolace DNA z patogena, a je tak zamezeno vzniku nežádoucích chyb. Odběry vzorků byly realizovány v roce 2010 v následujících termínech: 23. 3., 6. 4., 5. 5. a 24. 5. Z každého odběru a každé odrůdy bylo izolováno pět vzrostných vrcholů, z nichž byla následně izolována genomová DNA pomocí modifikované metody s využitím kitu GeneElute Plant Genomic DNA isolation kit (Sigma-Aldrich). DNA byla po eluci zakoncentrována pomocí isopropanolové precipitace s přidavkem glykogenu. Amplifikovatelnost získané DNA byla ověřena pomocí konvenční PCR a univerzálních primerů pro ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylázu. Takto připravená DNA byla použita pro kvantifikaci mycelia *T. caries* pomocí real-time PCR. Získané výsledky ukazují na časně detekovatelné napadení u odrůd pšenice Ebi, Darwin, Federer a Rheia a to již při druhém termínu odběru. Odrůdy s nejmenším množstvím mycelia ve vzrostném vrcholu a to i v posledním termínu odběru byly Anduril,

Drifter a Raduza. Ostatní testované odrůdy (Barryton, Bill, Cubus, Etela, Ludwig, Meritto, Nela, Simila, Sulamit, Akteur a Alana) byly zařazeny do homogenní skupiny napadení, kdy v prvním a druhém odběru nebyl patogen detekován, ale ve třetím a čtvrtém odběru dosáhla hranice napadení na úroveň cca 67 % u odrůd s největším množstvím mycelia (Ebi, Darwin, Federer a Rheia). Shoda mezi výsledky získanými molekulárně biologickou metodou a symptomatickým polním hodnocením byla zjištěna pouze u odrůdy Ebi. U odrůd Anduril, Raduza a Darwin byly výsledky dokonce protichůdné. Z toho vyvozujeme, že dosud nemáme dostatečné informace o průběhu patogeneze. Právě ty jsou ale podstatné pro pochopení vztahu mezi konkrétním průběhem vnějších i vnitřních podmínek a rozvojem choroby – a to je zase nezbytné pro navazující studium skutečně efektivního systému ochrany proti původcům choroby. Proto bychom rádi ve výzkumu pokračovali.

13. 5. Certifikované osivo

Přesto, že je v platnosti Vyhláška 369/2009 Sb., ve znění 289/2010 Sb., 168/2011 Sb., která povoluje kontaminaci osiva pšenice spory *Tilletia* spp. ve výši až 10 spor na jedno zrna, je minimální pravděpodobnost, že zdrojem infekce je v našich podmínkách certifikované osivo. V případě, že je při kontrole ve vzorku zjištěna uvedená míra kontaminace, je osivo uznáno pouze s podmínkou, že bude ošetřeno. Diskutabilní je fakt, že údajně kvůli zachování nestrannosti není doporučeno, jakým přípravkem a v jaké dávce má být osivo ošetřeno. Přitom je obecně známo, že ne všechna registrovaná mořidla mají dostatečnou účinnost proti *Tilletia*, především proti *T. controversa*. Sami výrobci těchto přípravků ani účinnost na zakrslou sněť pšeničnou nedeklarují. Pokud je kontaminace nižší – např. 7 spor na zrna, nemá příslušné pracoviště povinnost doporučit ošetření. V každém případě je ale i při použití takového osiva prakticky nulové riziko, že dané osivo bude příčinou většího (tj. v běžné provozní praxi symptomaticky zachytitelného) napadení porostu. Riziko spočívá spíše v možnosti, že se v porostu objeví jeden či dva napadené klasy a výtrusy z nich uvolněné zkontaminují pozemek, tj. stanou se primárním inokulem. Použití uznaného, ale neošetřeného osiva nebude mít přílišný efekt, pokud bude vyseto na zamořený pozemek.

13. 6. Ošetření osiva

Onemocnění pšenice vyvolané houbami rodu *Tilletia* je známé téměř dva tisíce let, ale po většinu té doby nebyla známá jeho příčina. Teprve kolem roku 1750 se jeho původci zabýval Mathieu du Tillet. V roce 1847 byl poprvé pojmenován druh *Tilletia caries* a to bratry Tulasneovými, kteří zvolili jméno právě na počest Tilleta. Choroba nabývala na významu se zvětšujícími se plochami pěstování pšenice. Od konce 18. století až do třicátých let 20. století byla pro porosty doslova devastující, především na severní polokouli (Mathre, 2000). Pak dostali pěstitelé do ruky přípravky pro ošetření osiva. V samých začátcích moření osiv to byly přípravky na bázi mědi. Později se objevily vysoce účinné (i díky fumigačnímu efektu) rtuťnaté přípravky, které účinkovaly proti celé řadě osivem přenosných patogenů. Pamětníci si jistě ještě vzpomenou na u nás používaný přípravek Agronal, který se používal do roku 1995, kdy byly spotřebovány (alespoň podle oficiálních údajů) poslední zbytky tohoto přípravku, toxického jak pro životní prostředí, tak pro pracovníky, kteří s ním přišli do styku. V EU platil zákaz používání rtuťnatých mořidel již od roku 1980. V roce 1945 následovaly přípravky s účinnou látkou hexachlorobenzene, které byly v některých státech široce používané proti infekci z půdy. Protože ale hexachlorbenzene byl potvrzen jako karcinogenní pro živočichy a vysoce toxický pro vodní organismy, bylo v roce 2001 s účinností od roku 2004 celosvětově zakázáno jeho používání v ochraně rostlin (Rozhodnutí Rady ze dne 14. října 2004 o uzavření Stockholmské úmluvy o perzistentních organických znečišťujících látkách jménem Evropského společenství). Od roku 1970 byla na trhu dostupná účinná látka carboxin, která je v některých přípravcích obsažena dodnes. Později se objevily látky systemické povahy, např. difenoconazole a tebuconazole. Různí autoři ale testovali i jiné látky. Například Smilanick *et. al.* (1992) ověřovali účinnost fumigace methyl bromidem. Zjistitli, že metoda je účinná, že výtrusy *T. caries* jsou citlivější než výtrusy *T. controversa*. Uvedená metoda ale není v praxi příliš použitelná, protože metyl bromid je vysoce toxický plyn. Johnsson (1991) testoval kombinaci látek bitertanol + fuberidazole, která podle jeho výsledků měla účinnost až 93 % proti zakrslé sněti pšeničné při zdroji infekce v půdě. Konstatoval ale, že účinnost ošetření klesala úměrně zvýšení hustoty inokula (tj. počtu spor sněti v prostředí). Bassi *et al.* (1994) získali velmi dobré výsledky a potvrdili vysokou účinnost triazolové látky difenoconazole a to i proti více osivem přenosným patogenům (*Ustilago tritici*, *Tilletia caries*, *Tilletia controversa* a *Septoria nodorum*). Na Slovensku prováděl v letech 1987 – 1990 polní pokusy zaměřené na ochranu pšenice proti

zakrslé sněti pšeničné Liška (1992). Ten testoval celkem 13 fungicidních přípravků, jak mořidel, tak přípravků určených pro foliární aplikaci. Při nízkém infekčním tlaku mělo největší efekt ošetření semen kombinací bitertanol + fuberidazole, dobré výsledky získal i při kombinacích flutriafol + thiabendazole, flutriafol + thiabendazole + ethirimol a difenoconazole. Při foliární aplikaci zjistil dobrou účinnost difenoconazole a cyproconazole. Foliární aplikace je ale značně diskutabilní především z ekonomických důvodů, protože výskyt sněti nedosahuje hospodářského významu každý rok a plošně a primární příznaky napadení nejsou symptomaticky zjištělné. Za zmínku stojí další výsledek, který Liška (1992) získal, když použil účinnou látku cyproconazole v přípravku Alto 40 WP na osivo. V tomto případě došlo k inhibici růstu až odumírání rostlin. Přitom stejná účinná látka obsažená v přípravku Alto 100 LS aplikovaná na list rostliny nejen nepoškodila, ale měla i dobrý efekt proti *T. controversa*. To je jeden z podkladů pro naše trvalé upozorňování, že „lidová tvořivost“ při používání přípravků na ochranu rostlin není na místě, vždy je třeba respektovat doporučení výrobce. Moření osiva je relativně levné (namoření značně zvyšuje cenu osiva, ale přináší vysoký efekt, u některých patogenů může ušetřit foliární aplikaci). Současně je moření pravděpodobně nejšetrnější formou aplikace pesticidu ve vztahu k životnímu prostředí, protože na jednotku půdy je aplikováno minimální množství účinné látky (ú. l.). Pokud bychom vyšli z obsahu účinné látky 50 g na 1 l mořidla (Celest Extra, 25 + 25 g ú. l.) při dávce 2 l/t a výsevu cca 200 kg/ha, pak zjistíme, že aplikujeme 10 g ú. l. na jeden hektar. V případě foliárního postřiku je v 1 l přípravku nejčastěji kolem 250 g ú. l. Pokud bychom uvažovali průměrnou dávku 1 l/ha, tak je to 250 g ú. l. na jeden hektar.

Stále častěji se však objevují případy, kdy pěstitel uvádí a dokladuje výsev certifikovaného mořeného osiva, a přesto došlo k napadení porostu snětivostí. To může mít několik důvodů.

1) Nekvalitní moření (nedodržení dávky přípravku, nerovnoměrnost)

2) Použití nevhodného přípravku. To se týká hlavně napadení rostlin zakrslou snětí pšeničnou, proti které mají dostatečnou účinnost tři mořidla (z přípravků dostupných na českém trhu). V roce 2011 jsou v Seznamu registrovaných přípravků a evidovaných prostředků na ochranu rostlin uvedena pouze tři mořidla s registrací účinnosti proti zakrslé sněti pšeničné: Sibutol (účinná látka bitertanol + fuberidazole) v dávce 2 l/t, Dividend 030 FS (účinná látka difenoconazole) v dávce 2 – 2,5 l/t s tím, že byla ukončena platnost přípravku, jeho použití je povoleno do 21. 5. 2014 a přípravek Celest Extra 050 FS (účinná látka difenoconazole + fludioxonil) v dávce 2 l/t. Proti mazlavé sněti pšeničné je účinná většina

registrovaných mořidel. Problematika moření osiv nebyla předmětem řešení projektu, přesto ale díky výsledkům jiné práce můžeme konstatovat, že by si zasloužila velkou pozornost. V současné době prakticky není objektivně plošně kontrolována kvalita moření ani jeho biologická účinnost, často jsou používána mořidla, která nejsou registrována proti zakrslé sněti pšeničné.

3) Přimíchání neošetřeného vlastního osiva do partie v případě, že zakoupené osivo nevystačí na osévanou plochu. Pak mohou být napadeny rostliny vzešlé z vlastního osiva.

4) Další otázkou je i dormance výtrusů sněti a jejich postupné klíčení, doba, kdy dochází k napadení rostliny v souvislosti s dobou účinnosti přípravku. *Tilletia caries* infikuje klíčící zrna, napadá koleoptile převážně před vzejitím. Jako optimální teplota pro vznik infekce se udává rozmezí 7 - 10 °C a sušší, nezamokřená půda. Právě fakt, že k infekci dochází již při klíčení, je důvodem vysoké účinnosti mořidel. *Tilletia controversa* napadá rostliny až při vzcházení, doba možného vzniku infekce trvá až do fáze odnožování. Dispoziční pro vznik onemocnění je teplota 0 - 5 °C a déletrvající sněhová pokrývka (Dressler, 2010). Jako optimální pro vznik infekce v případě *T. controversa* uvádějí teplotu 5° - 10°C půdy při setí Purdy *et al.* (1963). Dále je nutno mít na paměti, že zdrojem zakrslé sněti pšeničné je především půda (Grey *et al.*, 1986; Goates, Peterson, 1997). Při pozdější infekci z půdy (třeba až 8 -10 týdnů po zasetí) nelze již naprosto spolehlivou účinnost i kvalitu moření očekávat. V tomto případě závisí četnost napadených rostlin jak na průběhu počasí, tak na míře kontaminace pozemku a dalších faktorech, včetně míry citlivosti odrůdy vůči napadení.

5) Lze spekulovat o variabilitě populací *Tilletia* spp. a případném vzniku rezistence některé populace vůči používaným fungicidním látkám. Do současné doby ale nebyla nikde nalezena rezistence *Tilletia* spp. vůči některé registrované účinné látce. Jeden z důvodů je pravděpodobně i fakt, že houba prodělává jen jeden vývojový cyklus za rok (Mathre, 2000). Mezi patogeny s minimálním rizikem vzniku rezistence vůči fungicidům řadí sněti rodu *Tilletia* i FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) (2005).

13.6.1. Nechemické ošetření osiva

Vzhledem k závažnosti snětivosti pšenice a významu rizika především pro ekologický způsob hospodaření, ale i v souvislosti s tlakem na minimalizování chemických metod ochrany rostlin je inenzivně zkoumána i možnost nechemické ochrany proti *Tilletia* spp. Sitton *et al.* (1995) ověřovali možnost fyzikálního ošetření osiva pšenice ozařováním

elektrony. Zjistili, že *T. caries* je citlivější než *T. controversa*, u které bylo zapotřebí zvýšit dávku ozáření k usmrcení spor. Smilanick *et al.* (1994) testovali použití peroxidu vodíku (H₂O₂), ověřovali tři metody použití a dospěli k závěru, že látka je použitelná pro desinfekci zrn pšenice a ječmene za předpokladu, že v partii nejsou obsaženy celé hálky sněti. Nejnovějším objektem výzkumu je možnost využití plasmy pro ošetření semen. U nás se tématem zabývá pracoviště Akademie věd v Českých Budějovicích (Šerá a kol., 2010). Veškeré fyzikální metody ošetření osiva (dojde vlastně k povrchové sterilizaci semen), bez ohledu na jejich účinnost, neřeší možnost infekce v půdě, stejně tak neřeší patogeny přenosné uvnitř semene, v případě pšenice a ječmene např. prašná sněť ječná (*Ustilago* spp.). Naopak při zamořeném pozemku nelze vyloučit tzv. „bumerang efekt“, kdy půdní patogeny nemají na povrchu semene žádné konkurenty o prostor (a živiny) a mohou tedy osídlit klíčící semeno podstatně snadněji, než u semene neošetřeného. Tato metoda se zatím zdá být do budoucna využitelná pro ošetření osiva v ekologickém systému hospodaření, kde je díky vyšší variabilitě půdních mikroorganismů a tím většímu přirozenému odporu prostředí menší pravděpodobnost „bumerang efektu“.

Mnohem větší potenciál praktického uplatnění má biologická ochrana (tj. využití vztahů mezi organismy, především využití specifických vlastností organismů, které se v daném prostředí přirozeně vyskytují). Jednou z možností perspektivních pro budoucí použití se jeví využití chvostoskoků, hlavně *Folsomia fimetaria*, kteří se živí (mimo jiné) sporama rodu *Tilletia*. Dobré výsledky v tomto směru získali ve svých pokusech Dromph, Borgen (2001). Zajímavé jsou rovněž výsledky s použitím nechemických „přípravků“. Bänziger *et al.* (2001) měli úspěch s ošetřením osiva sušeným odstředěným mlékem a práškem ze žluté hořčice. Kombinaci bioagens a sušeného mléka úspěšně testovali i Borgen, Mehrnaz (2000). V budoucnu se dá také očekávat možnost využití látek získávaných z rostlin, které mají účinnost na původce chorob či škůdce rostlin a obvykle označovaných jako rostlinné pesticidy. Na našem pracovišti je ve spolupráci s VÚRV testována účinnost několika rostlinných esenciálních olejů na klíčivost *Tilletia caries*.

Ve srovnání s jinými původci chorob je v případě *Tilletia* spp. na pšenici dostupných poměrně málo údajů o využití antagonistických mikroorganismů proti snětivosti a pokud jsou k dispozici, jsou výsledky variabilní. Poměrně dobrých výsledků dosáhli v pokusech McManus *et al.* (1993) při použití mutovaného kmene bakterie *Pseudomonas fluorescens*.

Na našem pracovišti jsme zatím dostatečně přesvědčivé výsledky při použití dostupných biologických přípravků na ochranu rostlin nezískali. Předběžně jsme ověřovali účinnost

přípravků Gliorex (účinnou složku tvoří spory hub *Trichoderma harzianum* a *Clonostachys rosea*, přípravek byl v ČR registrován), Rhizobac (pracovní název, účinnou složku tvoří spory houby *Trichoderma harzianum* a směs bakterií rodu *Bacillus* a *Pseudomonas*, přípravek není v ČR k dispozici), Ceral (účinnou složku tvoří bakterie *Pseudomonas chlororaphis*, přípravek není v ČR registrován), Polyversum (výrobce deklaruje jako účinnou složku oospory *Pythium oligandrum*, přípravek je v ČR registrován). Ani jeden z přípravků není určen proti snětem, s výjimkou přípravku Polyversum, kde výrobce účinnost na *Tilletia* spp. udává (zatím není k tomuto účelu přípravek registrován). V našem pokusu všechny přípravky zlepšily vzházení a rychlost počátečního růstu pšenice, na výskyt onemocnění ale zásadní vliv neměly. V případě *Tilletia* spp. předpokládáme u biologických přípravků spíše efekt indukce rezistence rostliny než přímé antagonistické působení.

13. 7. Osevní sled

Nedodržování osevního postupu, zařazování hostitelské rostliny pšenice ob jeden rok nebo dokonce po sobě přispívá k tomu, že v půdě přežívají spory i mazlavé sněti pšeničné (Borgen, 2000), které nemají v půdě tak dlouhou životnost jako spory zakrslé sněti pšeničné. Dodržování odstupu čtyři a více let při pěstování ozimé pšenice by znamenalo téměř vyloučení možnosti napadení rostlin *T. caries* z půdy. V případě zakrslé sněti pšeničné nejsou k dispozici žádné údaje, které by potvrzovaly vliv osevního sledu na výskyt choroby.

14. Navrhovaná opatření

1) Doporučujeme nadále pokračovat v monitoringu výskytu choroby s tím, že bude běžně dostupnou mikroskopickou metodou prováděna základní determinace druhu *Tilletia*. V případě výskytu *Tilletia caries* by neměl být postižený pozemek používán pro produkci osiva nejméně čtyři roky. V případě prokazatelného výskytu *T. controversa* a v případě výskytu obou, resp. všech tří snětí tj. včetně *T. foetida*, by měl být pozemek vyřazen z možnosti produkce osiva nejméně na osm, raději deset let.

2) Doporučujeme znovu zavést ekonomickou pobídku k používání uznaného, kvalitně ošetřeného osiva.

3) Bez výjimky povinně mořit doporučeným přípravkem osivo určené pro množitelské porosty.

4) Povinně mořit farmářské osivo a to i s vědomím, že takové opatření najde řadu odpůrců argumentujících právem svobodné volby a svou ekonomickou situací – souvislost s bodem 2. Pěstitelé si ale musí uvědomit, že se mohou velmi snadno jejich porosty stát (a podle naší zkušenosti se stávají) zdrojem infekce pro okolní pozemky. A v tomto případě se dostávají do rozporu s platným Zákonem o rostlinolékařské péči, který v hlavě III, § 3 odst. a) ukládá jako základní povinnost fyzických a právnických osob „zjišťovat a omezovat výskyt a šíření škodlivých organismů včetně plevelů tak, aby nevznikla škoda jiným osobám nebo nedošlo k poškození životního prostředí anebo k ohrožení zdraví lidí nebo zvířat“. Státní orgán by měl důsledně dbát na vymáhání tohoto zákona a při prokázání porušení tohoto zákona by měl příslušný subjekt nést následky. V případě výskytu *Tilletia* spp. by pak porušením povinnosti „omezovat výskyt a šíření škodlivých organismů včetně plevelů tak, aby nevznikla škoda jiným osobám“ bylo především použití farmářského nemořeného nebo nevhodně mořeného osiva. Vyvrátit podezření z použití takového osiva lze velmi snadno předložením platného dokladu o nákupu osiva.

5) Směřovat k zavedení systému (kapacita, kompetence) plošné kontroly kvality namoření a biologické účinnosti moření osiv s tím, že informace budou poskytovány a garantovány odběratelům. V tomto směru doporučujeme zvážit navýšení kapacit pro kontrolu zdravotního stavu osiv (počet [i sezónních] kvalifikovaných pracovníků odboru osiv a sadby ÚKZÚZ, akreditovaná pracoviště). Podmínkou proto je dostupná jednoduchá a přitom relativně spolehlivá metodika kontroly.

6) V odůvodněných případech (v případě podezření u plochy určené pro množitelské porosty, ekologické farmy) zajistit ověření zamořenosti pozemku sporami *Tilletia* spp. podle dostupné metodiky (Babadoost, Mathre, 2000; Prokinová a kol., 2009).

7) Cíleně směřovat k získání a zavedení vysoce tolerantních a především rezistentních odrůd pšenice na český trh. K tomu by přispělo i vypracování rychlé, časově méně náročné než je současná metoda metodiky hodnocení odolnosti odrůd.

8) Systematicky pracovat na tom, aby bylo možné skutečně v praxi obnovit široké osevní sledy.

15. Nevyřešené otázky týkající se *Tilletia* spp. jako původce významné choroby pšenice

a) organizační

1. Podle našeho názoru je dosavadní způsob provádění monitoringu výskytu *Tilletia* spp. na pšenici značně nahodilý, neumožňuje získat naprosto spolehlivé údaje o výskytu choroby z celého našeho území.
2. Domníváme se, že především kapacita pracovních sil neumožňuje včas a detailně zkontrolovat veškeré partie osiva ve vzorku pšenice před jejím prodejem pěstiteli.
3. Není dořešen systém kontroly kvality a biologické účinnosti namořenosti osiv.
4. Není zaveden systém ověřování míry citlivosti pšenice k napadení *Tilletia* spp. (souvislost s bodem b) odst. 9).

b) náměty pro výzkum

1. Nemáme poznatky o aktuálním hostitelském spektru a tedy možných zdrojích infekce na našem území. Již v roce 1992 publikoval Paulech nález *Tilletia controversa* na *Elytrigia intermedia* v západní části Malých Karpat. V současné době se podle našich informací touto problematikou nikdo nezabývá.
2. Nemáme informace o křížení druhů rodu *Tilletia* napadajících pšenici ani o jejich křížení s druhy napadajícími plané hostitelské rostliny v našich podmínkách.
3. Stále přetrvávají nejasnosti v druhové skladbě a není známa jednoznačná, citlivá, rychlá a na subjektivním hodnocení nezávislá metoda determinace zájmových druhů rodu.
4. Chybí aktuální přehled o složení populací *T. caries*, *T. controversa* a *T. foetida* v České republice (rasy, jejich virulence, patogenita izolátů).
5. Protože nejsou informace uvedené v bodech 3 a 4, není jasné, které geny rezistence ze známých 15 Bt genů rezistence proti *Tilletia* spp. na pšenici by bylo vhodné použít pro získání odolných odrůd na našem území. Bylo by potřeba ověřit alespoň patogenitu izolátů *Tilletia* spp. z území ČR a účinnost jednotlivých genů rezistence proti nim. Nelze vyloučit ani to, že existují jiné, zatím neznámé zdroje rezistence.
6. Získání odolné odrůdy vhodné do našich podmínek, při zachování jejích kvalitativních parametrů a odolnosti k dalším významným chorobám.

7. Chybí v praxi snadno použitelná a přitom spolehlivá metoda kontroly biologické účinnosti ošetření osiva proti *Tilletia* spp.
8. Stále jsou nedostatečné informace o interakci patogen – hostitel. Nejvíce nejasností je zatím ve fázi patogeneze, kdy po vzniku infekce dochází k rozvoji choroby.
9. Stále je k dispozici jen zdlouhavá metoda hodnocení odolnosti odrůd vázaná na celou dobu vegetace a navíc na podmínky průběhu počasí. Zatím chybí spolehlivá, rychlá, objektivní metoda hodnocení odolnosti odrůd k *Tilletia* spp.

c) legislativní

1. V souvislosti se stoupajícími nálezy snětivosti pšenice na pozemcích, na kterých dosud nebyl výskyt choroby zaznamenán a současně pěstitel prokazatelně používá pouze ošetřené, certifikované osivo se nabízí otázka nutnosti přísnějších opatření nebo alespoň důsledného vymáhání dodržování stávajícího zákona, jak jsme uvedli výše (kapitola Navrhovaná opatření, bod 4).
2. diskutabilní zůstává ve vztahu k legislativě EU zavedení kontroly zdravotního stavu (nejen pro zjištění přítomnosti *Tilletia* spp.) importovaného osiva.

d) ekonomické

Ze všech dosud získaných poznatků jak zahraničních, tak našich vyplývá, že ochrana proti *Tilletia* spp. na pšenici musí být, stejně jako v případě mnoha dalších původců chorob polních plodin, vypracovaným systémem, souborem vzájemně provázaných opatření. Žádné samostatné opatření nebude dostatečně účinné samo o sobě, a tedy nebude optimální ani z hlediska ekonomického. Mimo to nelze přehlížet ani ekologické aspekty systému ochrany rostlin. Systém, který akceptuje a realizuje všechny dostupné metody ochrany rostlin s preferencí metod minimálně zatěžujících životní prostředí, je označován jako Integrovaná ochrana rostlin. Požadavek na jeho uplatňování je plně v souladu se směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2009/128/ES, kterou se stanoví rámec pro činnost Společenství za účelem dosažení udržitelného používání pesticidů. Ze směrnice jasně vyplývá, že členské státy musí zajistit urychleně zavádění systému integrované ochrany rostlin do praxe pěstování polních plodin. Základním opatřením pro realizaci úkolu musí být vypracování takových ekonomických nástrojů, které fakticky pěstitelům umožní systém zavést, aniž by je to ekonomicky poškodilo a aniž by je to oproti podnikatelům jiných odvětví a vůči zahraniční konkurenci znevýhodnilo. Konkrétně v případě ochrany proti snětivosti pšenice tvoří systém

integrované ochrany opatření, která uvádíme v kapitole „navrhovaná opatření“. Je zřejmé, že není možné všechna potřebná opatření financovat a realizovat okamžitě. Především v oblasti výzkumu bude jistě možné využít i výsledky získané pracovníky v jiných evropských státech. Pokud se ale nadále nemá význam snětivosti ozimé pšenice zvyšovat tak jako v posledních deseti letech, a tím napomáhat ke zhoršení uplatnění naší produkce na mezinárodním i domácím trhu, je nezbytné alespoň finančně dostupné kroky k řešení stávající situace dále neodkládat.

Seznam citované literatury

- Anonym 1, 2011: COS News – Week ending 19 August 2011. Week ending 19 August 2011. No. 171. *Tilletia controversa* (dwarf bunt) are quarantine pests of China.
- Anonym 2, 2011: EPPO A1 a A2 List of pests recommended for regulation as Quarantine pests XI 2011). Dostupné na: <http://www.eppo.org/QUARANTINE/quarantine.htm>
- Anonym 3, 2011: MAF BIOSECURITY NEW ZEALAND, STANDARD 155.02.05. Importation of Seed for Swing. Dostupné na: http://members.wto.org/crattachments/2011/sps/NZL/11_1341_00_e.pdf
- Anonym 4, 2004: Metodika zkoušení osiva. Věstník MZe, částka 3, vydáno v listopadu 2004 - závazné předpisy pro zkoušení osiva, s. 139-292.
- Anonym 5, 2011: Mycobank: Fungl Databases, Nomenclature and Species Bank, online Taxonomic Novelties Submission. Administered by the International Mycological Association. Dostupné na: <http://www.mycobank.org/mycotaxo.aspx>
- Anonym 6, 2011: United States Department of Agriculture, Agricultural research Service, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, Fungus-host distributions. Dostupné na: [http://nt.arsgrin.gov/fungaldbases/new_allView.cfm?whichone=FungusHost&thisName=Tilletia caries&organismtype=Fungus&fromAllCount=yes](http://nt.arsgrin.gov/fungaldbases/new_allView.cfm?whichone=FungusHost&thisName=Tilletia%20caries&organismtype=Fungus&fromAllCount=yes)
- Babadoost, M., Mathre, D. E., 1998: A method for extraction and enumeration of teliospores of *Tilletia indica*, *T. controversa*, and *T. barclayana* in soil. Plant Disease: 1359–1361.
- Bagga, P. S., Kaur, S., 2004: Interactions between wheat aphids and Fusarium head blight and their integrated management in durum wheat in India. 2nd International symposium on Fusarium head blight incorporating the 8th European Fusarium seminar, Wyndham Orlando Resort, Orlando, Volume 2, 2004: 287-290.
- Banowetz, G. M., Doss, R. P., 1994: A Comparison of Polypeptides from Teliospores of *Tilletia controversa* (Kuhn) and *Tilletia tritici* (Bjerk) Wint. Journal of Phytopathology, 140(4): 285-292.
- Bassi, A. B. Jr., Laird, D., Zang, L., Leadbitter, N. J., 1994: Seed treatments on wheat in the USA using difenoconazole. In: Martin, T., (ed.), 1994: Seed treatment: progress and prospects. Proceedings of a Symposium held at the University of Kent, Canterbury, 5-7 January, Farnham, UK: British Crop Protection Council Registered Office (BCPC), pp. 91-96.

- Baudyš, E., 1929: Hospodářská fytopathologie I. Brno In: Baudyš E., Benada J., Špaček J. (eds.), 1958: Zemědělská fytopatologie, díl II, ČAZV, s. 62-69.
- Baudyš, E., Benada J., Špaček, J. (eds.), 1958: Zemědělská fytopatologie, díl II, ČAZV, 776 s.
- Borgen, A., 2000: Perennial survival of common bunt (*Tilletia tritici*) in soil under modern farming practice. *Journal of Plant Disease and Protection*, 107(2): 182-188.
- Borgen, A., Mehrnaz, D., 2000: Biological control of common bunt (*Tilletia tritici*) in organic farming. *Journal of Plant Production*, 3(5): 159-174.
- Boyd, M. L., Carris, L. M., 1998: Enhancement of teliospore germination in wheat- and wild grass-infecting species of *Tilletia* on activated charcoal medium. *Phytopathology*, 88(3): 260-264.
- Brennan, J. M., Egan, D., Cooke, B. M., Doohan, F. M., 2005: Effect of temperature on head blight of wheat caused by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum*. *Plant Pathology*, 54: 156-160.
- Buczacki, S. T., Ockendon, J. G., 1978: A method for the extraction and enumeration of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* from infested soil. *Annual Applied Biology*, 88: 363-367.
- Castlebury, L. A., Carris, L. M., Vánky, K., 2005: Phylogenetic analysis of *Tilletia* and allied genera in order Tilletiales (Ustilaginomycetes; Exobasidiomycetidae) based on large subunit nuclear rDNA sequences. *Mycologia*, 97(4): 888-900.
- Chrpová, J., Váňová, M., Šíp, V., 2009: Využití různých metod pro hodnocení rezistence k fuzarióze klasu u odrůd pšenice ozimé registrovaných v ČR. *Obilnářské listy*, XVII. ročník, č. 4: 98-102.
- Čonková, E., Laciaková, A., Kováč, G., Seidel, H., 2003: Fusarial toxins and their role in animal diseases. *The Veterinary Journal*, 165: 214-220.
- Creppy, E. E., 2002: Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127: 19-28.
- Daniels, B. A., Skipper, H. D., 1982: Methods for recovery and quantitative estimation of propagules from soil. In: Schenck N.C. (ed): *Methods and principles of mycorrhizal research*, APS Press, pp 29-35.
- Dhingra, O. D., Sinclair, D. B., 1995: *Basic plant pathology methods*. 2nd Ed., CRC Press, Lewis Publisher USA, 434 p.
- Doležal, P., Dvořáčková, J., Zeman, L., 2010: Kvalita krmné dávky a napájecí vody. Agroweb. Dostupné na: http://www.agroweb.cz/Kvalita-krmne-davky-a-napajeci-vody__s531x45299.html

- Dressler, M., Voit, B., Killermann, B., 2010: Survey of the infestation of dwarf bunt (*Tilletia controversa*) and common bunt (*Tilletia caries*) of wheat on seeds and in the soil. ISTA SeedSymposium 2010, Cologne. Dostupné na:
http://www.lfl.bayern.de/ipz/saatgutankerennung/39779/survey_infestation_dwarf_bunt.pdf
- Dromph, K. M., Borgen, A., 2001: Reduction of viability of soil borne inoculum of common bunt (*Tilletia tritici*) by collembolans. Soil Biology and Biochemistry, 33(12-13): 1791-1795.
- Dumalasová, V., Bartoš, P., 2006: Resistance of winter wheat cultivars to common bunt, *Tilletia tritici* (Bjerk.) Wint. and *T. laevis* Kühn. Journal of Plant Diseases and Protection, 113(4): 159-163.
- Dumalasová, V., Bartoš, P., 2010: Reaction of Wheat, Alternative Wheat and Triticale Cultivars to Common Bunt. Czech Journal Genetics and Plant Breeding, 46(1): 14-20.
- Eibel, P., Wolf, G. A., Koch, E., 2005: Detection of *Tilletia caries*, Causal Agent of Common Bunt of Wheat, by ELISA and PCR. Journal of Phytopathology, 153(5): 297-306.
- Fuentes-Dávila, G., Goates, B. J., Thomas, P., Nielsen, J., Ballantyne, B., 2002: Smut diseases. In: Bread Wheat, FAO Corporate Dokument Repository, 2002, FAO Plant Production and Protection Series, 567 p.
- Gang, D. R., Weber, D. J., 1995: Preparation of genomic DNA for RAPD analysis from thick-walled dormant teliospores of *Tilletia* species. BioTechniques Euro Edition, 13: 53-56.
- Goates, B. J., 1996: Common bunt and dwarf bunt. In: Wilcoxon R. D., Saari E. E. (Eds.), 1996: Bunt and smut diseases of wheat: concepts and methods of disease management. CIMMYT, Mexico, pp. 12-25.
- Goates, B. J., Peterson, G. L., 1997: Relationship between levels of soil-borne and seed-borne *Tilletia controversa* and the incidence of dwarf bunt of wheat. Phytopathology, 87(6): 34.
- Grammer, L., Greenberger, P. A., 2009: Patterson's Allergic Diseases. 7th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, 736 p.
- Grey, W. E., Mathre, D. E., Hoffmann, J. A., Powelson, R. L, Fernández, J. A., 1986: Importance of seedborne *Tilletia controversa* for infection of winter wheat and its relationship to international commerce. Plant Disease, 70: 122-125.
- Halász, A., 2011: National survey of the economically important *Tilletia* species (*T. controversa*, *T. caries*, *T. foetida*) on winter wheat in Hungary (2007-2009). Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica, 46(1): 27-33.
- Hoffmann, J. A., Metzger, R. J., 1976: Current status of virulence genes and pathogenic races of the wheat bunt fungi in the northwestern USA. Phytopathology, 66: 657-660.

- Hole, D. J., Dewey, W., Albrechtsen, R. S., 1995: Registration of 'Promontory' wheat. Crop Science, 35(4): 1206-1207.
- Huber, K., Bürstmayr, H., 2006: Development of methods for bunt resistance breeding for organic farming. Bericht über die 57. Tagung 2006 der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs. HBLFA Raumberg - Gumpenstein, 21. - 23. November 2006.
- Huszar, J., 1993: Reakcia pšenice k hubam rodu *Tilletia* a biologická účinnost chemických moridiel voči *T. laevis* Kuhn a *Blumeria graminis* (DC.) Speer. Ochrana Rostlin, 29(1): 61-68.
- Ismail, S., Mamluk, O. F., Azmeh, M. F., 2002: Geographical distribution and host preference of common bunt *Tilletia foetidae* (Wallr.) Liro and *Tilletia caries* (DC) Tul. on bread wheat and durum wheat. Mededelingen Rijksuniversiteit Te Gent Fakulteit Van De Landbouwkundige En Toegepaste Biologische Wetenschappen, 67(2): 333-339.
- Johnsson, L., 1991: Experiments with seed-borne and soil-borne dwarf bunt (*Tilletia controversa* Kuhn) in winter wheat in Sweden. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 98(2): 162-167.
- Josefsen, L., Christiansen, S. K., 2002: PCR as a tool for the early detection and diagnosis of common bunt in wheat, caused by *Tilletia tritici*. Mycological Research, 106(11): 1287-1292.
- Kawchuk, L. M., Kim, W. K., Nielsen, J., 1988: A comparison of polypeptides from the wheat bunt fungi *Tilletia laevis*, *T. tritici* and *T. controversa*. Canadian Journal of Botany, 66(12): 2367-2376.
- Kochanová, M., Prokinová, E., 2008: Molekulárně biologická kvantifikace původců snětí pšenice. Pšenice od genomu ke kvalitě, s. 116-119.
- Kochanova, M., Prokinova, E., Rysanek, P. 2008: Molecular biological quantification in bunt diagnostics. XVth biennial workshop on the smut fungi. Agricultural Research Center Beltsville, pp. 16.
- Kochanová, M., Prokinová, E., 2004: Metody diagnostiky *Tilletia* spp. v teorii a praxi. Česká fytopatologická společnost, 68 s.
- Kochanová, M., Zouhar, M., Prokinová, E., Ryšánek, P., 2004: Detection of *Tilletia controversa* and *Tilletia caries* in wheat by PCR Metod. Plant Soil and Environment, 50(2): 75-77.
- Kokeš, P., Müller, J., 2004: Seznam fytopatogenních plísňí, rzí a snětí Moravy a Slezska. Czech Mycology, 56(1-2): 121-148.

- Kubiak, K., Weber, Z., 2008: Virulence frequency of *Tilletia caries* and the occurrence of common bunt on 20 winter wheat cultivars. *Phytopathologia Polonica*, The Polish Phytopathological Society, 47: 11-19.
- Liška, M., 1992: Možnosti ochrany pšenice ozimnej proti mazlavke trpasličej. *Ochrana Rostlin*, 28(2):135-145.
- Mamluk, O. F., 1998: Bunt and smuts of wheat in North Africa and the Near East. *Euphytica*, 100 (1-3): 45-50.
- Mathre, D. E., 2000: Stinking smut (common bunt) of wheat. Dostupné na: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/StinkingSmut.aspx>
- McManus, P. S., Ravenscroft, A. V., Fulbright, D. W., 1993: Inhibition of *Tilletia laevis* Teliospore and Suppression of Common Bunt of Wheat by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Plant Disease*, 77:1012-1015.
- Menniti, A. M., Pancaldi, D., Maccaferri, M., Casalini L., 2003: Effect of Fungicides on Fusarium Head Blight and Deoxynivalenol Content in Durum Wheat Grain. *European Journal of Plant Pathology*, 109(2): 109-115.
- Paulech, P., 1992: Charakteristika huby *Tilletia controversa* Kuhn a jej novej lokality na pyre (Elytrigia Desv.). *Česká mykologie*, 46(1-2): 131-137.
- Paulech, P., Paulech, C., 1994: Rozšírenie a charakteristika mazlavky trpasličej (*Tilletia controversa* Kuhn) v porastoch pšenice ozimnej na zapadnom Slovensku. *Ochrana Rostlin*, 30(1): 43-48.
- Paulech, P., Paulech, C., 1995: Distribution and ecophysiological characteristics of the fungus *Tilletia controversa* in Slovakia. *Czech Mycology*, 48(3): 207-215.
- Paulech, P., Paulech, C., Liška M., 1993 a: Distribution and characteristics of the fungus *Tilletia controversa* Kuhn in stands of winter wheat in eastern Slovakia. *Czech Mycology*, 47(1): 73-80.
- Paulech, P., Paulech, Jankulík, A., 1993 b: Rozšírenie a charakteristika mazlavky trpasličej (*Tilletia controversa* Kuhn) v porastoch pšenice ozimnej na strednom Slovensku. *Ochrana rostlin*, 29(2): 115-124.
- Pimentel, G., Carris, L. M., Peever, T. L., 2000: Characterization of interspecific hybrids between *Tilletia controversa* a *T. bromi*. *Mycologia*, 92(3): 411-420.
- Polišenská, I., Salava J., 2009: Analýza rizika kontaminace obilovin fuzáriovými mykotoxiny studiem kritických faktorů s využitím spektrálních, imunologických a molekulárních metod a predikce napadení klasovými fuzárii. Závěrečná zpráva projektu NAZV č. QG60047, 24 s.

-
- 73

- Sitton, J., Borsa, W. J., Schultz, T. R., Maguire, J. D., 1995: Electron beam irradiation effects on wheat quality, seed vigor, and viability and pathogenicity of teliospores of *Tilletia controversa* and *T. tritici*. Plant Disease, 79(6): 586-589.
- Smilanick, J. L., Goates, B. J., Denis-Arrue, R., Simmons, T. F., Peterson, G. L., Henson, D. J., Rij, R. E., 1994: Germinability of *Tilletia* spp. teliospores after hydrogen peroxide treatment. Plant Disease, 78(9): 861-865.
- Smilanick, J. L., Hartsell P. L., Denis-Arrue R, Henson D. J., McKinney, J. D., Tebbets, J. C., Goates B. J., 1992: Survival of Common and Dwarf Bunt Teliospores and Intact Sori after Fumigation of High and Low Moisture-content Winter-wheat. Plant Disease, 76(3): 293-296.
- Sullivan, J. B., Krieger, J. R. jr. (eds.), 2001: Clinical Environmental Health and Toxic Exposures. 2nd Edition, Lippincott Williams and Wilkins, 1323 p.
- Swinburne, T. R., 1963: Infection of wheat by *Tilletia caries*, the causal organism of bunt. Transaction of British Mycological Society, 46:145-156.
- Thinggaard, K., Leth V., 2003: Use of fluorochrome vital dye acridine orange to determine viability and germination of *Tilletia indica* teliospores in soil. Seed Science and Technology, 31(2): 329-340.
- Trail, F., Mills, D., 1990: Growth of Haploid *Tilletia* Strains in Planta and Genetic Analysis of a Cross of *Tilletia caries* x *T. controversa*. Phytopathology, 80(4): 367-370.
- Trione, E. J., 1977: Endogenous Germination Inhibitors in Teliospores of the Wheat Bunt Fungi. Phytopathology, 67: 1245-1249.
- Trione, E. J., Krygier, B. B., 1977: New tests to distinguish teliospores of *Tilletia controversa* the dwarf bunt fungus, from spores of other *Tilletia* species. Phytopathology, 67: 1166-1172.
- Vánky, K., 1994: European Smut Fungi. Gustav Fischer verlag. New York, 570 p.
- Veisz, O., Szunics, L., Szunics, L., 2000: Effect of common bunt on the frost resistance and winter hardiness of wheat (*Triticum aestivum* L.) lines containing Bt genes. Euphytica, 114: 159-164.
- Vielwerth, V., 1936: Biologická studie o mazlavých snětech *Tilletia foetens* a *Tilletia tritici*. Sborník výzkumných ústavů zemědělských ČSR, sv. 148. In: Baudyš, E., Benada, J., Špaček, J. (eds.), 1958: Zemědělská fytopatologie, díl II, ČAZV, 776 s.
- Wächter, R., Waldow, F., Müller, K. J., Spieß, H., Heyden, B., Furth, U., Frahm, J., Weng, W., Miedaner, T., Stephan, D., Koch, E., (2007): Charakterisierung der rezistenz von Winterweizensorten und zuchtlinien gegenüber Steinbrand (*Tilletia tritici*) und

- Zwergsteinbrand (*T. controversa*). Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes, 59: 30-39.
- Wilcoxon, R. D., Saari, E. E., 1996: Bunt and smut diseases of wheat: Concepts and methods of disease management. Mexico. D.F.: CIMMYT, 66 p.
- Willingale, J., Mantle, P.G. 1987: Interaction between *Claviceps purpurea* and *Tilletia caries* in wheat. Transactions of British Mycological Society, 89(2): 145-153.
- Windes, J. M., Souza, E., Sunderman, D. W., Goates, B. J., 1995: Registration of four wheat germplasms resistant to dwarf bunt: Idaho 352, Idaho 364, Idaho 443, and Idaho 444. Crop Science, 35(4): 1239-1240.
- Winter, W., Bänziger, I., Rüegger, A., Schachermayr, G., Krebs H., Gindrat, D., 2001: Skim milk powder and yellow mustard-meal treatment: Alternatives to the chemical seed-dressing for the control of common bunt in wheat. Agrarforschung, 8(3): 118-123.
- Xu, X., Nicholson, P., Ritieni, A., 2007: Effects of fungal interactions among Fusarium Head Blight Pathogens on Disease Development and Mycotoxin Accumulation. International Journal of Food Microbiology, 19(1-2): 67-71.
- Yarham, D., 1993: Soil-borne spores as a source of inoculum for wheat bunt (*Tilletia caries*), Plant Pathology, (42)4: 654-656.
- Zouhar, M., Mazáková, J., Prokinová, E., Váňová, M., Ryšánek, P., 2010: Quantification of *Tilletia caries* and *Tilletia controversa* mycelium in wheat apical meristem by real-time PCR. Plant Protection Science, 46: 107-115.
- Zwatz, B., Zedenbauer, R., 1997: Weizensteinbrand: Eine „explosive“ Krankheit. Der Pflanzenarzt, 1/2: 24-26.

Název: Mazlavá sněť pšeničná (*Tilletia caries*) a zakrslá sněť pšeničná (*Tilletia controversa*) v České republice
Autoři: Evženie Prokinová, Miloslav Zouhar, Jana Mazáková, Marie Váňová, Lenka Štočková
Vydavatel: Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, Praha 6
Povoleno: Děkanátem FAPPZ ČZU
Počet stran: 76
Tisk: PowerPrint Praha, 2011
Rok vydání: 2011
ISBN 978-80-213-2240-0

© Česká zemědělská univerzita v Praze